

ISSN 0136-3549
0320-3395

TALLINNA
POLÜTEHNILISE INSTITUUDI
TOIMETISED
510

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО
ИНСТИТУТА

ТРИ
'81

ПРИКЛАДНЫЕ
ВОПРОСЫ
БИООРГАНИЧЕСКОГО
КАТАЛИЗА





510

ТР
'81

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.002.237

ПРИКЛАДНЫЕ
ВОПРОСЫ
БИООРГАНИЧЕСКОГО
КАТАЛИЗА

Инженерная энзимология II

Под общей редакцией А. И. Кёстнера

Таллин 1981



КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Сообщение IV

Исследование гидролиза дисахаридов

Интегральная кинетика реакций ферментативного гидролиза дисахаридов является интересным объектом исследования, так как этим реакциям характерно ингибирование продуктами, а часто также субстратом. Поэтому применение уравнения Михаэлиса-Ментен для описания кинетики реакции в данном случае обычно невозможно, в частности, при описании процесса глубокого гидролиза, в некоторых случаях можно упрощенно учитывать только конкурентное ингибирование одним превалирующим продуктом (аналогом субстрата) и пренебречь другими ингибирующими эффектами. В этом случае уравнение Михаэлиса может удовлетворительно описывать кинетику и по эффективному значению константы K_m возможен расчет константы ингибирования. Так, например, В.С. Баева и др. применяли интегрированное уравнение Михаэлиса-Ментен для описания гидролиза лактозы с помощью иммобилизованной β -галактозидазы из *Curvularia inaequalis* в колонке [1]. По данным анализа интегральной кинетики этой же реакции нами предположено, что наряду с конкурентным ингибированием галактозой имеет место неконкурентное ингибирование глюкозой [2]. У некоторых видов β -галактозидазы может наблюдаться активация субстратом [3]. Сложная кинетика характерна ферментативному гидролизу сахарозы. Полуэмпирическое описание этой реакции в ультрафильтративной системе дано Бовским и др. [4]. Кинетика этой реакции обсуждена также в наших работах [5, 6], где показано, что продукты реакции — фруктоза и глюкоза — являются конкурентным и неконкурентным ингибиторами соответствен-

но, также ингибирует реакцию сахарозы. Интересные результаты получены при исследовании гидролиза мальтозы с α -глюкозидазой [7] и определено значение константы ингибирования глюкозой.

В данной статье приводятся результаты исследования интегральной кинетики в периодическом реакторе с перемешиванием двух реакций: гидролиза сахарозы с помощью β -фруктофуранозидазы (инвертазы) (КФ 3.2.1.26) и гидролиза мальтозы с помощью экзо-1,4- α -глюкозидазы (глюкоамилазы) (КФ 3.2.1.3) в следующих целях.

1) проверить возможность описания этих реакций предложенным ранее обобщенным кинетическим уравнением одно-субстратных реакций [8, 9] (Интересно отметить также стремление других исследователей к обобщению кинетических уравнений, например [10]),

2) практически использовать один из вариантов предложенных нами статистических методов анализа полных кинетических кривых (уравнение (15) в [11]), полученных физико-химическими методами.

Материалы и методы

Гидролиз сахарозы проводился в 0,05-молярном ацетатном буфере (рН 4,9) с помощью β -фруктофуранозидазы (инвертазы) Олайнского завода химических реактивов со стандартной активностью 830-1170 мк-кат/г (50 000 $\pm$ 70 000 Е/г).

Гидролиз мальтозы исследовался также в 0,05-молярных растворах ацетатного буфера (рН 4,9), применяя экзо-1,4- α -глюкозидазу (глюкоамилазу) фирмы Reanal.

Интегральная кинетика исследовалась в периодических реакторах с перемешиванием (в случае применения термохимического метода реактором служил калориметрический сосуд).

Кинетика ферментативного гидролиза сахарозы изучалась двумя физико-химическими методами - термохимическим и поляриметрическим методами, кинетика гидролиза мальтозы - только последним методом. Схема калориметра с изотермической оболочкой представлена на фиг. 1. Калориметр состоит из сосуда Дьюара емкостью 0,25 л, погруженного в

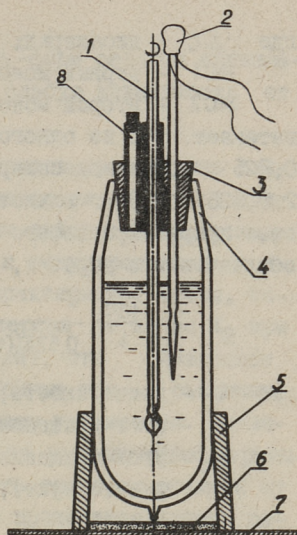
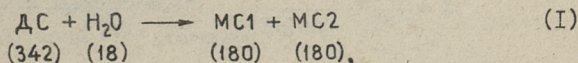
водяной термостат. Калориметр снабжен мешалкой, температура реакционной смеси измерялась термистором Михельсона [12].

Термистор, который при 20 °С имел температурный коэффициент сопротивления 3,0 %/град и сопротивление 27 кΩ, включали в мост постоянного тока. Измерения проведены по микроамперметру типа Ф И6/2 (0-7,5 μА), применив метод неполной компенсации.

Методика расчета результатов калориметрических опытов приведена в нашем предыдущем сообщении [13]. Температурный коэффициент скорости реакции гидролиза сахарозы около 20 °С был равен 1,086 (определялся специальными опытами). Суммарная поправка на температурный ход (в основном зависящая от теплообмена) обычно не превышала 10 % от общего изменения температуры. Продолжительность опытов составляла 1-4 часа.

Поляриметрические измерения проводились на поляриметре Polamata фирмы Carl Zeiss (ГДР) при длине волны 578 нм в кюветах длиной 1 дм и 2 дм. Гидролиз мальтозы исследовался при температурах 20, 35 и 50 °С, гидролиз сахарозы — при 20 °С. За определенные промежутки времени из реакционной смеси брали пробы в количестве 15 мл, прибавляли для инактивации фермента и ускорения мутаротации 0,1 мл 1 н раствора NaOH и проводили измерения угла вращения. Показания прибора умножали на эмпирически найденный коэффициент 0,957, чтобы получить величину угла вращения при длине волны λ = 589 нм.

Из уравнения реакции



Фиг. 1.
Схема калориметра.
1 — мешалка, 2 — термистор, 3 — пробка, 4 — сосуд Дьюара, 5 — резиновая пробка, 6 — поролон, 7 — металлическая нагрузка, 8 — трубка для ввода реагентов.

где ДС - дисахарид;

МС1 - первый моносахарид;

МС2 - второй моносахарид,

вытекает, что из одного грамма дисахарида образуется по 0,525 г обоих моносахаридов (в случае мальтозы образуется $2 \times 0,525 = 1,05$ г глюкозы). Поэтому для вычисления количества прореагировавшего субстрата (дисахарида) в 100 мл, обозначенного через x , применимо уравнение (2):

$$x = \frac{100}{l} \cdot \frac{\alpha - \alpha_0}{0,525([\alpha]_{D(MC1)}^{20} + [\alpha]_{D(MC2)}^{20}) - [\alpha]_{D(AC)}^{20}}, \quad (2)$$

где l - длина кюветы, дм;

α - угол вращения реакционной смеси;

α_0 - угол вращения исходного раствора (моносахариды отсутствуют);

$[\alpha]_{D(MC1)}^{20}$; $[\alpha]_{D(MC2)}^{20}$; $[\alpha]_{D(AC)}^{20}$ - удельное вращение при длине волны D при 20°C первого моносахарида, второго моносахарида и дисахарида соответственно.

Исходная концентрация C_0 (г/100 мл) рассчитывалась по величине α_0 :

$$C_0 = \frac{\alpha_0}{\frac{l}{100} \cdot [\alpha]_{D(AC)}^{20}}. \quad (3)$$

В этом случае степень конверсии субстрата $X = \frac{x}{C_0}$ на основе уравнений (2) и (3) может быть найдена с помощью следующего уравнения:

$$X = \frac{\alpha - \alpha_0}{\alpha_0} \cdot \frac{[\alpha]_{D(AC)}^{20}}{0,525 [\alpha]_{D(MC1)}^{20} + [\alpha]_{D(MC2)}^{20} - [\alpha]_{D(AC)}^{20}}. \quad (4)$$

Как видно из уравнения (4), степень конверсии дисахарида линейно зависит от угла вращения α , что было найдено ранее при исследовании ферментативного гидролиза мальтозы при 30°C [7].

В случае гидролиза мальтозы уравнение (4) упрощается:

$$X = \frac{\alpha - \alpha_0}{\alpha_0} \cdot \frac{[\alpha]_{D(\text{мальтоза})}^{20}}{1,05 [\alpha]_{D(\text{глюкоза})}^{20} - [\alpha]_{D(\text{мальтоза})}^{20}}. \quad (5)$$

Для равновесных смесей α - и β -форм сахаров принимались значения $[\alpha]_D^{20}$, учитывающие слабую зависимость от концентрации [14].

Для математической обработки опытов применялись следующие экспериментальные данные: исходная степень конверсии субстрата X_1 , степень конверсии субстрата X_2 , исходная концентрация субстрата $[S]_0$ (М) и редуцированный промежуток времени $\Delta\tau_{\text{ред}}$. Последний характеризует время, необходимое для изменения степени конверсии от X_1 до X_2 при единичной концентрации фермента (1 г/л), что позволяет сравнивать между собой опыты, проведенные при различных концентрациях фермента. $\Delta\tau_{\text{ред}}$ вычислен умножением наблюдаемого времени (промежутка времени) на концентрацию фермента. (Предположена линейная зависимость скорости реакции от концентрации фермента. В этом случае продолжительность реакции обратно пропорциональна концентрации фермента).

Для опытов гидролиза мальтозы применялась величина $X_1 = 0$. Гидролизу сахарозы характерно аномальное протекание реакции в начале опыта, обусловленное нестационарностью системы. Поэтому в данном случае принимали X_1 равным 0,15 - 0,30.

Математическая обработка проведена по [11], доверительные границы найденных величин вычислены по методике [15], используя доверительную вероятность 0,95. Целью расчетов было нахождение шести коэффициентов $a_1 \dots a_6$ в интегрированном кинетическом уравнении (см. уравнение (15) в [11]):

$$a_1 \frac{\Delta\tau_{\text{ред}}}{[S]_0} + a_2 \frac{Y}{[S]_0} + a_3 Y [S]_0 + a_4 (Y + X_2 - X_1) + a_5 [S]_0 (X_2 - X_1) + a_6 [S]_0 (X_2^2 - X_1^2) = -Y. \quad (6)$$

Применялись два весовых коэффициента: $\frac{X_2 - X_1}{Y}$ и $\frac{1}{Y}$, при использовании которых для умножения уравнения (6) получают свободные члены - $(X_2 - X_1)$ и -1 соответственно.

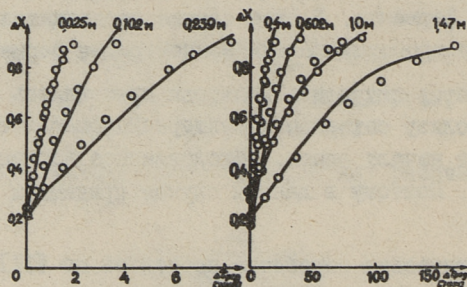
Расчеты проводились на ЭВМ "Наири-2" по специальной, составленной нами программе.

Результаты и обсуждение

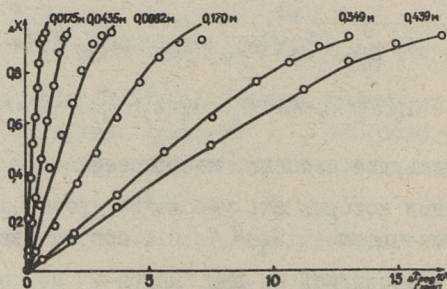
Калориметрические опыты ферментативного гидролиза сахарозы приведены в диапазоне исходных концентраций субстрата 0,025–1,47 м. Для математической обработки применялись результаты 10 опытов, проведенных при различных исходных концентрациях сахарозы, из которых составляли 78 условных уравнений типа (6) для системы уравнений, решаемой методом наименьших квадратов.

Поляриметрический анализ реакционных смесей использовался для опытов, проведенных в реакторе с перемешиванием при $[S]_0$ 0,025 – 0,8 М.

По этим данным составляли систему из 48 условных уравнений.



Фиг. 2. Гидролиз сахарозы при $t = 20^\circ\text{C}$: изменение степени конверсии в зависимости от времени $\Delta\tau_{\text{ред}}$; экспериментальные точки, расчетные кривые.



Фиг. 3. Гидролиз мальтозы при $t = 35^\circ\text{C}$: изменение степени конверсии в зависимости от времени $\Delta\tau_{\text{ред}}$; экспериментальные точки, расчетные кривые.

Ферментативный гидролиз мальтозы проводился при $[S]_0$ 0,017 – 0,434 М при температурах 20, 35 и 50 °С. Данные этих опытов служили основой для составления систем уравнений из 37,55 и 50 условных уравнений соответственно.

Результаты опытов представлены на фиг. 2 и 3. На этих фигурах экспериментальные точки могут быть сравнены с расчетными кривыми, полученными использованием найденных величин коэффициентов $a_1 \dots a_6$ в случае применения весового коэффициента.

Результаты математической обработки экспериментальных данных приведены в таблице I. Единица коэффициента $a_1 = V_m$ равна кат/г, так как величина a_1 в данном случае характеризует каталитическую активность при концентрации фермента 1 г/л (величина $\Delta \tau_{\text{рег}}$ в уравнении (6) рассчитана в секундах именно при этой концентрации фермента). Поэтому численно величина a_1 показывает активность одного грамма ферментного препарата в каталах в примененных условиях.

Как видно из фиг. 1 и 2, расчетные кривые (уравнение (6)) с использованием найденных значений коэффициентов $a_1 \dots a_6$ хорошо согласуются с экспериментальными данными во всем использованном диапазоне концентраций субстрата.

На основе результатов статистической обработки экспериментальных данных можно в данном конкретном случае заключить следующее:

а) из выбранных весовых коэффициентов можно рекомендовать величину $\Delta X/Y$. В этом случае минимизация квадратов отклонений проводится в отношении ΔX .

б) более узкие доверительные границы имеют коэффициенты a_1 (V_m) и a_4 , при 20 °С также a_2 (K_m).

в) на основе величин a_3 , a_5 и a_6 не обоснован расчет кинетических констант μ , f и g (см. [III]) и констант ингибирования. Широкие доверительные границы могут быть обусловлены несколькими причинами, в данной статье не подвергаемых детальному анализу. Использование величин $a_1 \dots a_6$ для нахождения значений истинных кинетических

Т а б л и ц а I

Расчетные коэффициенты уравнения (6) для ферментативного гидролиза дисахаридов

Характеристика и условия опытов	Исп. ве- сової коэффи- циент	Остаточная дисперсия	Значения					коэффициентов		
			$a_1, \text{кат/г}$ $\times 10^6$	$a_2, \text{М}$ $\times 10^3$	$a_3, \text{М}^{-1}$	a_4	$a_5, \text{М}^{-1}$	$a_6, \text{М}^{-1}$		
Гидролиз сахарозы β -фруктофуранозид- азой, 20 °С, рН 4,9	$\frac{\Delta X}{Y}$	0,09368	450 $\pm$ 103	19,5 $\pm$ 5,3	1,56 $\pm$ 0,42	-1,37 $\pm$ $\pm$ 0,10	0,580 $\pm$ $\pm$ 0,499	0,865 $\pm$ $\pm$ 1,145		
	$\frac{1}{Y}$	0,7311	508 $\pm$ 166	23,5 $\pm$ 10,2	1,86 $\pm$ 1,14	-1,45 $\pm$ $\pm$ 0,25	0,691 $\pm$ $\pm$ 0,962	0,988 $\pm$ $\pm$ 2,380		
Термохимический метод исследо- вания	$\frac{\Delta X}{Y}$	0,1325	472 $\pm$ 87	16,2 $\pm$ 4,4	1,02 $\pm$ 0,51	-1,40 $\pm$ $\pm$ 0,12	1,77 $\pm$ $\pm$ 1,52	0,86 $\pm$ $\pm$ 1,26		
Гидролиз сахарозы β -фруктофуранозид- азой, 20 °С, рН 4,9	$\frac{\Delta X}{Y}$	0,01889	1,29 $\pm$ 0,14	0,4433 $\pm$ $\pm$ 1,15	0,530 $\pm$ $\pm$ 1,57	-0,924 $\pm$ $\pm$ 0,105	3,55 $\pm$ $\pm$ 1,53	-2,72 $\pm$ $\pm$ 3,53		
	$\frac{\Delta X}{Y}$	0,02578	5,48 $\pm$ 0,32	0,489 $\pm$ $\pm$ 0,672	0,156 $\pm$ $\pm$ 0,403	-0,865 $\pm$ $\pm$ 0,054	-0,203 $\pm$ $\pm$ 0,449	0,553 $\pm$ $\pm$ 0,986		
Гидролиз мальтозы экзо-1,4- α -глюко- зидазой (гликоами- лазой) рН 4,9. По- ляриметрический метод исследования а) 20 °С	$\frac{\Delta X}{Y}$	0,02625	14,3 $\pm$ 1,1	0 $\pm$ 1,04	1,148 $\pm$ $\pm$ 0,305	-0,895 $\pm$ $\pm$ 0,063	0,368 $\pm$ $\pm$ 0,446	0 $\pm$ 0,661		
б) 35 °С	$\frac{\Delta X}{Y}$									
в) 50 °С	$\frac{\Delta X}{Y}$									

констант будет рассмотрено в следующих сообщениях данной серии. Очевидно, дополнительная информация из других кинетических опытов (например, нахождение величин V_m и K_m из специальных опытов) может значительно способствовать резкому уменьшению средней квадратической ошибки значений других коэффициентов.

В данной статье подтверждена целесообразность применения двух физико-химических методов для исследования ферментативного гидролиза дисахаридов и доказана применимость предложенного ранее математического метода обработки полных кинетических кривых. Цифровые значения найденных коэффициентов могут быть, в первую очередь, применены как полуэмпирические, позволяющие использовать уравнение (6) для количественного описания ферментативного гидролиза в широком диапазоне исходных концентраций субстрата.

Л и т е р а т у р а

1. Баева В.С., Козлов Л.В., Антонов В.К., Тихомирова А.С. Ферментативные свойства иммобилизованной β -галактозидазы из *Curvularia inaequalis*. - Биохимия, 1977, т. 42, вып. 4, с. 706-711.
2. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кестнер А.И., Куликова А.К., Тихомирова А.С. Количественная характеристика гидролиза лактозы иммобилизованной β -галактозидазой. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 19-28.
3. L i s m a n, J.J.W., H o o g h w i n k e l, G.J.M. Kinetic properties of β -galactosidase of human brain tissue. - Neurobiology, 1974, 4, 167-179.
4. B o w s k i, L., S h a h, P.M., R u u, D.Y., V i e t h, W.R. - Biotechn. and Bioeng. Symp., 1972, N 3, 229-239.
5. Сиймер Э.Х., Кросинг В.А., Мандель М.О., Кёстнер А.И. О механизме ферментативных реакций, ингибируемых субстратом и продуктами. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1974, № 367, с. 3-7.

6. Кросинг В.А., Ярвет Ю.И., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И. Кинетика реакции водных растворов сахарозы, катализируемой иммобилизованной в полиакриламидном геле инвертазой. - Там же, с. 17-26.

7. Wandrey, C., Hönig, W., Kula, M.R. Integral kinetics of the cleavage of maltose catalysed by α -glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. - Eur. J. Appl. Microbiol. 1977, 3, N 4, 257-265.

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

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

10. Hsu, T.A., Tsaio, G.T. Convenient method for studying enzyme kinetics. - Biotechn. and Bioeng., 1979, 21, 2235-2246.

11. Сиймер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение II. Определение коэффициентов обобщенного кинетического уравнения. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 15-21.

12. Михельсон В.Я. Эбуллиометрический метод определения молекулярных весов с применением термометров сопротивления. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1964, серия А, № 210, с. 267-279.

13. Менерт А.А., Сиймер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение III. Термохимический метод исследования стационарной кинетики ферментативных реакций. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 23-32.

14. Handbook of Chemistry and Physics II. Cleveland, Ohio, 1955, 2760 p.

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

A. Menert, M. Ruse, E. Siimer

The Kinetics of One-substrate Enzymatic Reactions IV

Investigation of the Hydrolysis of Disaccharides

Summary

The integral kinetics of the enzymatic hydrolysis of sucrose and maltose has been studied using native β -fructofuranosidase (3.2.1.26) and exo-1,4- α -glucosidase (glucoamylase) (3.2.1.3). The kinetic curves have been obtained by thermochemical and polarimetric methods. From the experimental data the values of the kinetic coefficients in the kinetic equation have been calculated.

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Сообщение У

Стационарная кинетика в проточных реакторах
с перемешиванием

Проточные реакторы с перемешиванием (ПРП) находят частое применение при исследовании ферментативных реакций. Общие закономерности кинетики реакций в открытых системах известны ранее [1]. ПРП называют также реакторами идеального перемешивания, если учитывать, что в любой момент времени обеспечивается однородный по всему объему реактора состав продуктов реакции (и субстратов). Современные результаты исследования кинетики действия ферментов в открытых системах приведены в монографии И.В. Березина и С.Д. Варфоломеева [2]. Согласно авторам книги проточный безградиентный реактор (проточный реактор идеального перемешивания) представляет собой замкнутый объем, содержащий фермент, в который с постоянной скоростью подается раствор субстрата и отводится раствор продукта и непрореагировавшего субстрата. В этой работе рассматривается также вариант импульсного введения субстрата.

Работа ПРП может быть изучена в стационарном или нестационарном режиме. Большинство опубликованных работ посвящено исследованию стационарного состояния в ПРП. Гидролиз сахарозы с помощью растворимой β -фруктофуранозидазы исследовался в ультрафильтрационной системе [3], что свидетельствует о возможности достигать интересных результатов при использовании мембранных реакторов. Чаще всего ПРП применяются для исследования кинетики реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами [4]. В этом случае реакторы могут работать или в диффузионном или в кинетическом

режиме. Если диффузионный массоперенос играет значительную роль, то ПРП могут иметь явные преимущества перед колоночными реакторами (реакторами с вытеснением). Часто ПРП для иммобилизованных ферментов могут быть использованы в кинетическом режиме. В этом случае открывается возможность исследования ПРП как одного из кинетических типов реакторов, и для описания кинетики реакций могут быть использованы обычные кинетические уравнения (например, уравнение Михаэлиса). Следует учитывать, что в этом случае найденные кинетические параметры не соответствуют истинной кинетике фермента, а характеризуют т.н. эффективную кинетику гетерогенного катализатора.

В данном сообщении рассматривается стационарная кинетика в ПРП на основе обобщенного кинетического уравнения для одностратных реакций. В качестве катализатора могут быть применены растворимый фермент в мембранном реакторе, а иммобилизованный фермент в любом реакторе типа ПРП. При этом имеется в виду, что ферментативные реакции протекают в кинетическом режиме.

Материальный баланс ПРП в стационарном режиме

В стационарном режиме ПРП концентрации субстрата и продуктов имеют постоянные (стационарные) величины. Если пренебрегать инактивацией фермента и возможными механическими потерями его, то скорость ферментативной реакции будет иметь некоторую постоянную стационарную величину, обозначаемую через v_{st} (кат/м³).

Если объем жидкости (раствора субстрата) в реакторе равен V (м³), объемная скорость потока жидкости — q (м³/с), исходная концентрация субстрата $[S]_0$ (моль/м³) и если исходную и стационарную степени конверсии обозначить через X_0 и X_{st} соответственно, то нетрудно составить уравнение материального баланса ПРП. В стационарном режиме, очевидно, количество образующегося в ходе ферментативной реакции продукта (моль/с) равно произведению $V \cdot v_{st}$. Такое же количество продукта отводится из реактора. Следовательно,

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

Стационарная скорость v_{st} может быть описана в принципе любым кинетическим уравнением или его модификацией, если это уравнение соответствует конкретной схеме и механизму реакций в ППП. Чаще всего применяется уравнение Михаэлиса-Ментен, мы рекомендуем для многих односубстратных реакций более обобщенное кинетическое уравнение, учитывающее ингибирование продуктами и субстратом [5].

При условиях $[S]_0 = \text{const}$ (например, работа ППП исследуется при постоянной исходной концентрации субстрата), варьируя концентрацию фермента или объемную скорость q , v_{st} описывается уравнением

$$v_{st} = \frac{V_m(1 - X_{st})}{a + bX_{st} + cX_{st}^2} \quad (\text{кат/м}^3). \quad (2)$$

Обозначая

$$R = \frac{V}{q[S]_0} \left(\frac{\text{м}^3 \cdot \text{с}}{\text{моль}} \right). \quad (3)$$

На основе уравнений (1) и (2) может быть получено следующее (в отношении X_{st} кубическое) уравнение, описывающее стационарный режим в ППП:

$$cX_{st}^2(X_{st} - X_0) + bX_{st}(X_{st} - X_0) + (a + RV_m)X_{st} - (aX_0 + RV_m) = 0 \quad (4)$$

Очевидно, все члены в уравнении (4) являются безразмерными. В частном случае, если $X_0 = 0$, уравнение (4) упрощается:

$$cX_{st}^3 + bX_{st}^2 + (a + RV_m)X_{st} - RV_m = 0. \quad (5)$$

Так как данное кубическое уравнение может в принципе иметь три реальных решения ($0 < X_{st} < 1$), в литературе аналогичные проблемы обсуждались неоднократно. Наличие трех (из них два нестабильные) стационарных состояний возможно в случае ингибирования субстратом [6]. По всей вероятности, если такое ингибирование сопровождается ингибированием продуктами, наличие нескольких стационарных состояний невозможно.

В более общем случае, если для исследования ППП применяются различные исходные концентрации субстрата, коэффициенты a, b и c придется рассматривать как функции от $[S]_0$ и уравнения (2) и (4) соответственно модифицируются.

Во II сообщении (см. уравнения (19)–(24) в [7]) был рассмотрен нами вопрос практического определения всех шести кинетических параметров из экспериментальных данных, полученных с помощью ПРП.

Кинетика реакции в каскаде соединенных последовательно проточных реакторов с перемешиванием

Схема каскада ПРП приведена на фиг. 1.

В первый реактор P_1 подается раствор субстрата с концентрацией $[S]_0$, со степенью конверсии X_0 . Объем жидкости в реакторе V_1 ; величина максимальной скорости, характеризующая концентрацию фермента, $V_{m(1)}$. В стационарном состоянии достигается степень конверсии

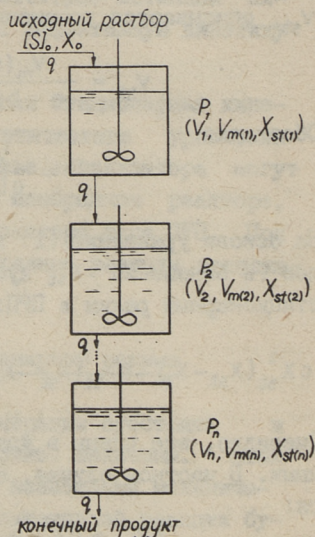
$X_{st(1)}$. Соответствующий по составу этой величине раствор подается в реактор P_2 . Соответствующие величины в реакторе P_i равны V_i , $V_{m(i)}$, $X_{st(i)}$, соответственно.

Конечно, в простейшем случае могут быть последовательно соединены одинаковые по размерам реакторы, с равным объемом субстрата в каждом, а также может ферментативная активность быть распределена равномерно (величина $V_{m(i)}$ для всех реакторов одинаковая).

Материальный баланс любого реактора P_i может быть составлен аналогично уравнению (1) с учетом уравнения (2):

$$V_i \cdot \frac{V_{m(i)}(1 - X_{st(i)})}{a + bX_{st(i)} + cX_{st(i)}^2} = q[S]_0(X_{st(i)} - X_{st(i-1)}), \quad (6)$$

откуда



Фиг. 1. Схема каскада из последовательно соединенных проточных реакторов с перемешиванием.

$$c X_{st(i)}^2 (X_{st(i)} - X_{st(i-1)}) + b X_{st} (X_{st(i)} - X_{st(i-1)}) + \\ + a (X_{st(i)} - X_{st(i-1)}) - \frac{V_{m(i)} \cdot V_i (1 - X_{st(i)})}{q [S]_0} = 0. \quad (7)$$

Для вычисления величины $X_{st(i)}$, степени конверсии субстрата при выходе из каскада $X_{st(n)}$ и других величин следует составить систему уравнений (7) и решать их последовательно, начиная с первого реактора. Такой, относительно неудобный метод должен быть применен при решении различных интересных проблем с применением каскада ПРП (например, проблемы оптимального распределения фермента между реакторами с целью достижения максимальной производительности каскада).

Сравнение эффективности реакторов двух кинетических типов

Существует два основного кинетического типа ферментативных реакторов.

Один из них – проточный реактор с перемешиванием.

Второй – проточный реактор с (идеальным) вытеснением. К этому типу относится также периодический реактор с перемешиванием (не учитывая периодов загрузки и выгрузки реактора).

Для сравнения эффективности реакторов предположим, что проточный реактор с вытеснением и периодический реактор с перемешиванием работают также в кинетическом режиме. (На практике для колонок с иммобилизованным ферментом часто характерно переходное к диффузионному состояние, что создает предпосылки для предпочтения реакторов других типов). В данном сообщении вопрос эффективности каскада ПРП не рассматривается. Можно лишь отметить, что при увеличении количества реакторов в каскаде последний по эффективности приближается к проточному реактору с вытеснением. Коротко рассматривались нами проблемы эффективности реакторов с конкретным примером уже ранее [8].

Было проведено сравнение эффективности реакторов двух типов при постоянной и равной исходной концентрации субстрата $[S]_0$. Сравнивали также скорость ферментативной реакции в единице объема реактора при равных концентрациях фермента (величина V_m в обоих реакторах равная).

Интегрированное уравнение скорости для проточного реактора с вытеснением и периодического реактора с перемешиванием приведено ранее [8]:

$$\frac{V_m \tau}{[S]_0} = -(a+b+c) \cdot \ln \frac{1-X}{1-X_0} - (b+c)(X-X_0) - \frac{c}{2}(X^2-X_0^2), \quad (8)$$

где τ - время контакта (для реактора с вытеснением равно соотношению объема жидкости в реакторе V к объемной скорости q_v);

X_0 - исходная степень конверсии субстрата;

X - конечная степень конверсии субстрата.

Продуктивность реактора Π_1 , очевидно, равна

$$\Pi_1 = \frac{[S]_0(X-X_0)}{\tau} \quad (9)$$

или (см. уравнения (8) и (9))

$$\Pi_1 = \frac{V_m(X-X_0)}{[-(a+b+c) \cdot \ln \frac{1-X}{1-X_0} - (b+c)(X-X_0) - \frac{c}{2}(X^2-X_0^2)]}. \quad (10)$$

Продуктивность ПРП Π_2 равна стационарной скорости (см. уравнение (2)):

$$\Pi_2 = \frac{V_m(1-X_{st})}{a+bX_{st}+cX_{st}^2}. \quad (11)$$

Относительная эффективность реакторов может быть выражена соотношением продуктивностей

$$\frac{\Pi_1}{\Pi_2} = \frac{(X-X_0)(a+bX_{st}+cX_{st}^2)}{(1-X_{st})[-(a+b+c) \cdot \ln \frac{1-X}{1-X_0} - (b+c)(X-X_0) - \frac{c}{2}(X^2-X_0^2)]} \quad (12)$$

или принимая

$$m_1 = \frac{b}{a} \quad \text{и} \quad m_2 = \frac{c}{a},$$

$$\frac{\Pi_1}{\Pi_2} = \frac{(X - X_0)(1 + m_1 X_{st} + m_2 X_{st})}{(1 - X_{st}) \left[-(1 + m_1 + m_2) \ln \frac{1 - X}{1 - X_0} - (m_1 + m_2)(X - X_0) - \frac{m_2}{2}(X^2 - X_0^2) \right]}. \quad (13)$$

Эффективность реакторов целесообразно обычно сравнивать при равных превращениях субстрата ($X_{st} = X$). В частном случае при $X_0 = 0$ получаем

$$\frac{\Pi_1}{\Pi_2} = \frac{X(1 + m_1 X + m_2 X^2)}{(1 - X) \left[-(1 + m_1 + m_2) \ln(1 - X) - (m_1 + m_2)X - \frac{m_2}{2}X^2 \right]}. \quad (14)$$

Настоящее сообщение не содержит экспериментальных материалов. В последних публикациях мы коснулись некоторых вопросов, связанных с материалом настоящей статьи. Так, например, продуктивность реакторов двух типов рассматривалась как один из объектов экономико-кинетической оптимизации [9], а результаты исследования кинетики ферментативного гидролиза лактозы в ПРП доложены на всесоюзном симпозиуме [10]. Более детально результаты различных исследований, связанных с применением ПРП, будут рассмотрены в дальнейших сообщениях данной серии.

В ы в о д ы

1. На базе обобщенного кинетического уравнения и материального баланса выведено кинетическое описание ферментативной реакции в проточном реакторе с перемешиванием (ПРП) и каскаде ПРП.

2. Приведены уравнения для сравнения эффективности (продуктивности) реакторов двух кинетических типов.

Л и т е р а т у р а

1. Э м а н у э л ь Н.М., К н о р р е Д.Г. Курс химической кинетики. М., Высшая школа, 1969, гл. X.

2. Б е р е з и н И.В., В а р ф о л о м е е в С.Д. Биокинетика. М., Наука, 1979, гл. V.

3. B o w s k i, L., S h a h, P.M., R y u, D.Y., V i e t h, W.R. Process simulation of sucrose hydrolysis on invertase in a continuous flow stirred tank ultrafiltration

reaction system. - Biotechnol. and Bioeng. Symp., 1972, N 3, p. 229-239.

4. Имобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы / Под ред. И.В. Березина, В.И. Антонова, К. Мартинек. Изд-во МГУ, 1976.

5. С и й м е р Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение I. Обобщенное кинетическое уравнение для формально двухступенчатых реакций. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. II-18.

6. M c G r a t h, M.J., Y a n g, R.Y.K. On substrate-inhibited enzymatic reaction in a continuous stirred-tank reactor. - Chem. Eng. J., 1975, 2, p. 187-196.

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

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

9. K ö s t n e r, A., S i i m e r, E. Problems of efficiency and optimization in enzyme engineering. Enzyme Engineering, Future Direction. New York and London, Plenum Press, 1980, p. 415-435.

10. С и й м е р Э.Х., П а п п е л ь К.Э. Стационарная кинетика ферментативного гидролиза лактозы в проточном реакторе с перемешиванием. Тезисы докладов III Всесоюзного научного симпозиума "Получение и применение иммобилизованных ферментов в научных исследованиях, промышленности и медицине", Л., 1980, с. 120.

E. Slimer

The Kinetics of One-substrate Enzymatic Reactions V

The Steady State Kinetics in Continuous Stirred Tank Reactors

Summary

On the basis of the generalized rate equation and the material balance, kinetic equations have been derived to describe the kinetics in continuous stirred tank reactors (CSTR) and in the battery of CSTR in the case of the kinetic regime. The productivities for two types of reactors (CSTR and plug flow) have been compared and the ratio expressed as the relative efficiency. The appropriate formulae for describing the CSTR relative efficiency have been derived.

РАСЧЕТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ ИНЖЕНЕРНОЙ
ЭНЗИМОЛОГИИ. II

РАСЧЕТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА ЛАКТОЗЫ

Введение

Целесообразность внедрения разрабатываемых процессов обработки молочной сыворотки с помощью иммобилизованных ферментов будет во многом определена их экономической эффективностью. По литературным данным проблема мало изучена [1-3]. Учитывая, что мы имеем дело со сравнительно дешевым материалом (стоимость 1 т молочной сыворотки 3 рубля), достижение экономической эффективности требует комплексной разработки получения и применения иммобилизованной β -галактозидазы.

Целью настоящей работы являлось изучение зависимости экономической эффективности процесса гидролиза лактозы от условий проведения его, т.е. от технологических параметров гидролиза, от стоимости материалов, оборудования и эксплуатации и расчет лимитирующих показателей процесса. Для оптимизации условий проведения гидролиза использована математическая модель экономической эффективности процесса, предложенная одним из авторов ранее [4].

Методы расчета

Экономическая эффективность процесса (E_p) рассчитывалась по уравнению (I) как соотношение стоимости продукта (C_p) и эксплуатации (C_E) (см. [4]):

$$E_p = \frac{P_p \cdot A_0(A_s) \cdot Y(S_0, X_F, T, \tau)}{P_s A_0(A_s) \cdot Y(S_0, X_F, T, \tau) / X_F + C_s(A_s) + C_R \cdot \tau} \quad (I)$$

С помощью основной программы (см. [1]) проведено циклическое изменение вышеописанных переменных и для каждого варианта выполнен расчет значений E_p по ур. (I) для реакторов двух типов.

При расчете лимитирующих показателей процесса в основную программу введено изменение: вместо значений E_p вычислено удорожание молочной сыворотки вследствие обработки её иммобилизованной β -галактозидазой. Для расчета коэффициента удорожания применено ур. (I) в следующей модифицированной форме:

$$K_{yg} = \frac{P_s \cdot A_0(A_s) \cdot Y(S_0, X_F, T, \tau) + C_s(A_s) + C_R \tau}{P_s A_0(A_s) \cdot Y(S_0, X_F, T, \tau)} \quad (2)$$

Следует подчеркнуть, что уравнение (2) не содержит в явном виде степени конверсии X_F и поэтому K_{yg} монотонно увеличивается с повышением X_F . По уравнению (2) невозможно провести оптимизацию по X_F , и эта величина должна быть определена на минимальном уровне, допускаемом техническими требованиями.

Все расчеты проведены на ЭВМ ЕС-1022 с помощью составленной нами программы.

Исходные данные для расчета

При расчете пользовались результатами экспериментальных данных, проведенных нами [5, 6], а также приблизительными оценками экономических показателей. При этом предполагали, что общий объем реакторов гидролиза в опытно-технологическом процессе 2 м³. Значения характерных показателей, принятых при расчете эффективности процесса, представлены в табл. I.

Значения констант скорости инактивации I_p , K_s , K_m и приведенная энергия активации ферментативной реакции (H_1) и реакции инактивации (H_2) рассчитаны на основе результатов многочисленных лабораторных и полупромышленных опытов гидролиза лактозы в реакторах различного типа. Значение эмпирической постоянной H_3 определено по экспериментальным данным на основе вычисления температурной зависимости реакции

Т а б л и ц а I

Значения характерных показателей, принятых при
расчете эффективности процесса

Показатель	Обозначение	Размерность	Значение
Константа скорости энзиматической инактивации при стандартных условиях	K_s	ч^{-1}	0,000053
Константа скорости механической инактивации	K_m	ч^{-1}	0,0005
Приведенная энергия активации ферментативной реакции	H_1	$^{\circ}\text{K}$	5800
Приведенная энергия активации реакции энзиматической инактивации	H_2	$^{\circ}\text{K}$	20 000
Эмпирическая постоянная	H_3	$^{\circ}\text{K}^{-1}$	0,12
Эмпирическая постоянная	A_m	моль/ч	1400
Эмпирическая постоянная	A_c	моль/ч	2200
Кинетические коэффициенты	S_1	м	0,012
Кинетические коэффициенты	S_2	м^{-1}	0,92
Кинетические коэффициенты	S_3	безразм.	2,087
Кинетические коэффициенты	S_4	м^{-1}	29,60
Кинетические коэффициенты	S_5	м^{-1}	-30,52
Цена субстрата	P_s	руб./моль	0,0244
Цена продукта	P_p	руб./моль	0,122
Цена ед. активности нативного фермента	P_E	руб	3,13
Стоимость иммобилизации	C_1	руб.	11900
Стоимость эксплуатации реакторов	C_R	руб./ч	4

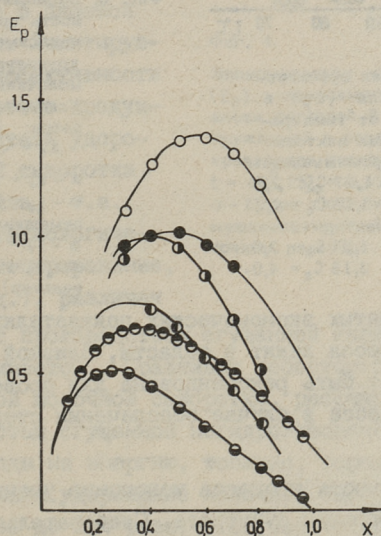
гидролиза по уравнению (I4) [1]. Значения A_m и A_s рассчитаны из данных зависимости активности препарата ИГ от количества использованного нативного фермента A_s , т.е. A_m определяет максимально возможную суммарную активность ИГ в эксплуатационных реакторах. Значения коэффициентов $S_1, \dots, S_5$ (см. [1]), характеризующих кинетику процесса гидролиза, рассчитаны из данных зависимости относительной скорости реакции от степени конверсии при различных исходных концентрациях субстрата [5]. Цена исходного субстрата (молочной сыворотки) — P_s — определена по действующим прейскурантам. Цена вырабатываемого продукта (P_p) оценивалась ориентировочно, учитывая литературные данные. Значения P_s и P_p выражены в рублях на моль лактозы, что необходимо для связывания кинетических данных с экономическими показателями. Цена единицы активности нативного фермента (P_e) определена на основе предварительной калькуляции, составленной в ВНИТИАФ. Приблизительные значения стоимости иммобилизации (C_i) и стоимости эксплуатации реакторов (C_R) определены на основе данных, полученных при испытании полупромышленных реакторов гидролиза в лабораториях ТПИ и на Таллинском комбинате молочных продуктов. Параметром C_R обозначены расходы на заработную плату со всеми начислениями, на энергию, на амортизацию оборудования и косвенные расходы. При расчете значений C_i учтено все количество катализатора (ИГ), загружаемое в реактор. При изучении зависимости экономической эффективности процесса от стоимости иммобилизации и стоимости эксплуатации реакторов значения C_i и C_R варьировали в пределах от 3000 до 18000 рублей и соответственно от 1 до 32 руб./ч.

Оптимизация условий гидролиза

Для оптимизации условий гидролиза лактозы выявлены зависимости эффективности процесса от начальной концентрации субстрата $[S_0]$, температуры проведения реакции (T) и требуемой степени конверсии лактозы (X_F), а также от исходного количества активности нативной β -галактозидазы (A_s), вводимого в реактор для получения ИГ. Так как значение pH молочной сыворотки совпадает с pH-оптимумом активности и стабильности ИГ, то его pH как влияющий на значение E_p параметр в расчетах не учитывается. Характерные зависимости

E_p от T , X_F , $[S_0]$ и A_s представлены на фиг. 1-4. На основе результатов вычислений можно сделать следующие выводы:

I. Глубокая степень гидролиза лактозы в сыворотке молока экономически не оправдана. В зависимости от применяемого типа реактора и условий проведения процесса оптимальная конверсия находится в пределах 0,25-0,5. При повышении X_F выше 0,6 эффективность процесса резко падает. Такая оптимальная конверсия характерна для процессов с применением дешевого субстрата, в частности, для ферментативных реакций, в которых сильное ингибирование продуктами реакции ведет к резкому уменьшению скорости реакции в результате накопления продуктов в обрабатываемом растворе.



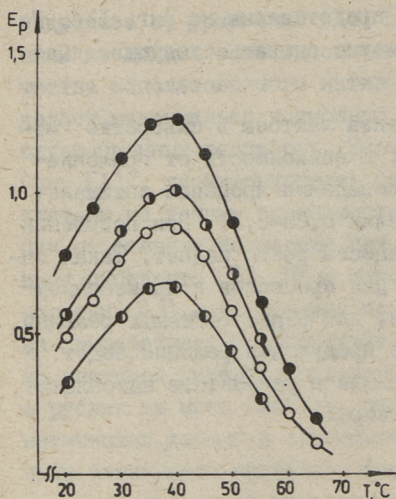
Фиг. 1. Экономическая эффективность процесса (E_p) в зависимости от степени конверсии лактозы (X).

Условия проведения процесса: $t = 40^\circ$, $[S]_0 = 0,12$ M, гидролиз в реакторе с перемешиванием

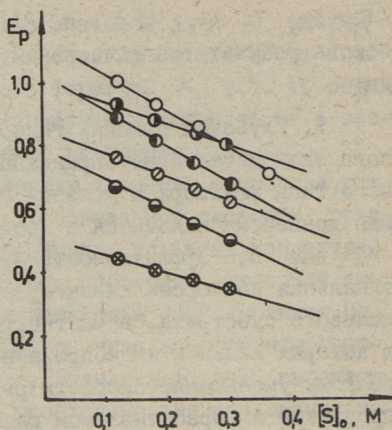
○ — E_p при	$P_E = 0,783$	$C_R = 2,0$	$A_s = 4000$
● — E_p при	$P_E = 3,13$	$C_R = 4,0$	$A_s = 4000$
◐ — E_p при	$P_E = 0,783$	$C_R = 2,0$	$A_s = 600$
◑ — E_p при	$P_E = 3,13$	$C_R = 4,0$	$A_s = 600$

гидролиз в проточном реакторе

○ — E_p при	$P_E = 0,783$	$C_R = 2,0$
● — E_p при	$P_E = 3,13$	$C_R = 4,0$



Фиг. 2. Экономическая эффективность процесса (E_p) в зависимости от температуры гидролиза лактозы. реактор с перемешиванием
 ● — E_p при $P_E = 1,57$ $C_R = 2,0$
 ○ — E_p при $P_E = 3,13$ $C_R = 4,0$ проточный реактор
 ○ — E_p при $P_E = 1,57$ $C_R = 2,0$
 ○ — E_p при $P_E = 3,13$ $C_R = 4,0$.



Фиг. 3. Экономическая эффективность процесса (E_p) в зависимости от начальной концентрации лактозы в молочной сыворотке $[S]_0$. Условия проведения процесса: $t = 40^\circ$
 $A_S = 4000$ моль/ч
 ○ — $x_F = 0,3$, ○ — $x_F = 0,5$,
 ○ — $x_F = 0,7$ (реактор с перемешиванием)
 ○ — $x_F = 0,3$, ○ — $x_F = 0,5$,
 ○ — $x_F = 0,7$ (проточный реактор).

2. При принятых экономических показателях оптимальная температура процесса лежит в области, близкой к 40°C . Эта температура может быть рекомендована для проведения технологического процесса в случае обеспечения стерилизации реакторов.

3. Эффективность процесса монотонно уменьшается при повышении концентрации субстрата. Следовательно, концентрирование молочной сыворотки до ее обработки препаратом ИГ себя не оправдывает. Гидролиз лактозы следует проводить в исходной сыворотке, а концентрирование ее осуществлять после гидролиза.

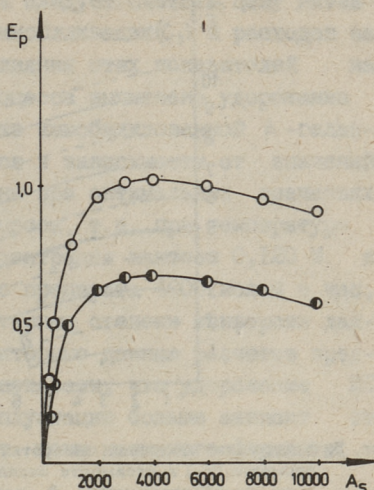
4. Эффективность процесса резко зависит от общей активности катализатора, загружаемого в реактор. Оптимальной загрузкой нативного фермента следует считать 2000 моль/ч на 1 м^3 реакционной смеси, т.е. перечисленные на г сухого катализатора свыше 434 Е. Эта величина действительна при раз-

работанной нами методике иммобилизации и может существенно меняться при переходе к другим методам получения катализатора.

Расчет лимитирующих показателей

Гидролизованную молочную сыворотку, полученную при обработке творожной или подсырной сыворотки с помощью β -галактозидазы, целесообразно применять в сгущенном виде в пищевой промышленности. Лимитирующим фактором эффективности производства этого продукта следует считать удорожание молочной сыворотки в ходе гидролиза, т.е. на остальных технологических этапах (сепарирование, сгущение и т.д.), различая

по сравнению с производством сгущенной негидролизованной сыворотки не имеется. Сравнивая себестоимость сгущенной гидролизованной молочной сыворотки, рассчитанную в ВНИИМС, со себестоимостью сгущенной негидролизованной сыворотки и считая расходы на энергию, топливо, зарплату и сырье равными, получаем удорожание молочной сыворотки в процессе гидролиза до 5,2 раза, в случае творожной сыворотки и до 6,3 раза в случае подсырной сыворотки. Применение иммобилизованного фермента целесообразно при получении в процессе дополнительного экономического эффекта, т.е. при удорожании молочной сыворотки меньше чем в 5,2 раза в случае творожной сыворотки и меньше чем в 6,3 раза в случае подсырной сыворотки. Исходя из вышеописанного проведен расчет лимитирующих показателей гидролиза молочной сыворотки с помощью иммобилизованной β -галактозидазы. Лими-

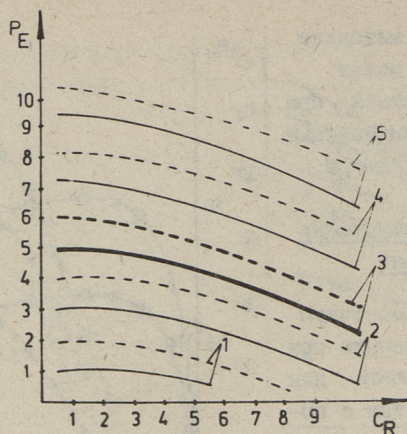


Фиг. 4.

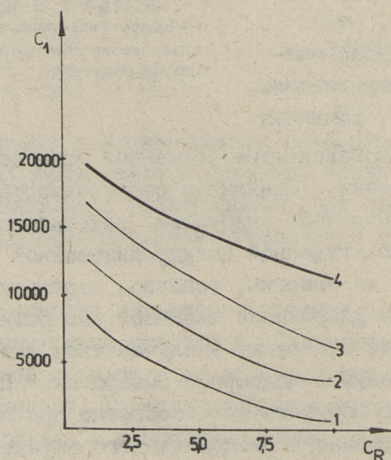
Экономическая эффективность процесса (E_p) в зависимости от исходной активности нативной β -галактозидазы, загружаемой в реактор (A_s). Условия проведения процесса:

$t = 40^\circ$, $[S]_0 = 0,12$ М, $x_F = 0,5$.

○ — E_p при гидролизе в реакторе с перемешиванием; ● — E_p при гидролизе в проточном реакторе.

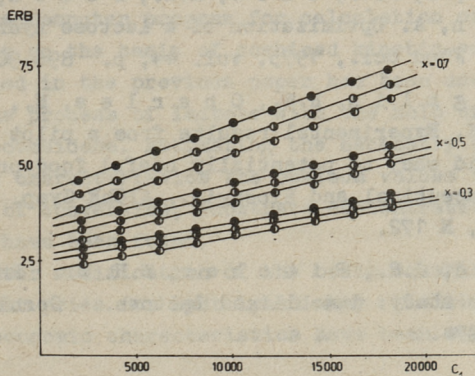


Фиг. 5. Удорожание молочной сыворотки в зависимости от цены нативного фермента (P_E) и стоимости эксплуатации (C_R) при гидролизе лактозы иммобилизованной β -галактозидазой.
Условия гидролиза: $\chi = 0,5$, $t = 40^\circ$, $A_5 = 4000$ моль/ч, реактор с перемешиванием.
Удорожание: 1 - в три раза, 2 - в четыре раза, 3 - в пять раз, 4 - в шесть раз, 5 - в семь раз,
— = 10 000 руб., --- = 8000 руб.



Фиг. 6. Удорожание молочной сыворотки в зависимости от стоимости эксплуатации (C_R) и иммобилизации (C_1) при гидролизе лактозы иммобилизованной β -галактозидазой.
Условия гидролиза: $\chi = 0,5$, $t = 40^\circ$, $A_5 = 4000$ моль/ч, реактор с перемешиванием.
Удорожание: 1 - в три с половиной раза, 2 - в четыре раза, 3 - в четыре с половиной раза, 4 - в пять раз.

тирующими показателями процесса следует считать цену нативного фермента (P_E), стоимости иммобилизации (C_I) и расходов на эксплуатацию (C_R). Для оценки влияния этих показателей на экономическую эффективность процесса вычислено удорожание молочной сыворотки при обработке иммобилизованной β -галактозидазой в реакторах двух типов в зависимости от значений P_E , C_I и C_R . Расчеты проведены при оптимальных значениях технологических параметров процесса, т.е. при температуре гидролиза 40°C , начальной концентрации лактозы $0,120\text{ M}$ и исходной активности ферментного препарата 4000 молей в час, соблюдены технологически характерные степени конверсии лактозы $X_F = 0,3, 0,5$ и $0,7$. Характерные данные расчетов представлены на фиг. 5-7. Расчеты показали, что удорожание МС при постоянных расходах на эксплуатацию больше зависит от стоимости иммобилизации, чем от цены нативного фермента.



Фиг. 7. Удорожание молочной сыворотки в зависимости от стоимости иммобилизованной β -галактозидазы (C_I)
 Условия гидролиза: $t = 40^\circ$, $A_S = 4000$ моль/ч,
 реактор с перемешиванием,
 $P_E = 3,0$ руб., $\circ - C_R = 2,0$, $\circ - C_R = 4,0$, $\bullet - C_R = 6,0$.

При повышении расходов эксплуатации в два раза расходы на иммобилизацию или цена нативного фермента должны уменьшаться соответственно в 1,5 и 1,2 раза, чтобы удорожание МС при гидролизе 50 % лактозы осталось постоянным. При увеличении требуемой степени конверсии МС зависимость удорожания ее от роста экономических показателей увеличивается (фиг. 7). Так, например, при увеличении степени конверсии лактозы в МС от

0,5 до 0,7 удорожание МС в ходе гидролиза повышается в 1,5 раза.

При выбранных нами исходных данных (см. табл. I), где $P_E = 3,13$, $C_1 = 11900$ и $C_R = 4,0$ (а также при повышении C_R до 6,0 и значении $C_1 = 10000$, т.е. при значениях C_R и C_1 , полученных из расчетов опытно-промышленной установки барботажного типа с производительностью 3 т/ч), удорожание молочной сыворотки приблизительно в 4,5 раза, что при производстве дает экономию приблизительно 210 тысяч рублей в год. Этим доказывается, что при тщательной оптимизации процесса можно при переходе от нативного к иммобилизованному ферменту добиться заметного экономического эффекта.

Л и т е р а т у р а

1. Кнорф, F.C., Окос, M.R., Фолтс, D.A., Сыверсон, A. Optimization of a lactose hydrolysis process. - J. Food Sci., 1975, vol. 44, p. 896-900.
2. Коуэглин, R.W., Чарльс, M., Жуковский, K. Experimental results from a pilot plant for converting acid whey to potentially useful food products. - Food, Pharmaceutical and Bioengin., AIChE Symp. Ser., 1977, vol. 74, N 172.
3. Форд, J.R., Питчер, W.H. Jr. Enzyme engineering case study: immobilized lactose. - Corning Glass Works, N-Y, 1974.
4. Кёстнер А.И. Расчет эффективности процессов инженерной энзимологии. I. Принципы и структура программы для расчета на ЭВМ. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 3.
5. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И. Количественная характеристика гидролиза лактозы иммобилизованной β -галактозидазой. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 19-28.
6. Паппель К.Э., Куликова А.К., Тихомирова А.С. Дезинфекция реактора с иммобилизованной β -галактозидазой. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. 29-31.

A. Köstner, K. Pappel

Calculation of Efficiency for the Processes in

Enzyme Engineering II

Calculation of Efficiency for the Process of
Lactose Hydrolysis

Summary

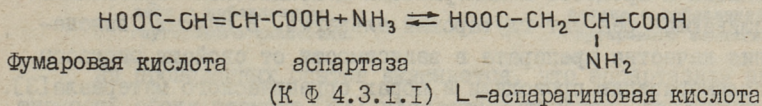
The computer program for calculation of economic efficiency on the basis of combined kinetic-economic equation described in the previous paper has been used for optimizing the process of lactose with the help of immobilized β -galactosidase. Estimating the necessary economic and kinetic characteristics the optimum values for temperature, degree of conversion, substrate concentration and total activity have been found.

After modification of the basic equation and defining the limit price for hydrolyzed whey limiting values for basic economic characteristics have been calculated.

А.Х. Калда, Л.И. Воробьева

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ
С АСПАРТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, II.Имобилизация клеток *Escherichia coli*

L-аспарагиновая кислота широко употребляется в качестве добавки к продуктам пищевого и медицинского назначения. В промышленности ее производят методом ферментации или с помощью энзимов из фумарата аммония по следующей реакции:



Эта реакция проводится циклическим процессом, но более перспективным в производственном масштабе является непрерывный процесс в колонке с иммобилизованными клетками микроорганизмов, продуцентов аспартазы, так как выделенная внутриклеточная аспартаза по большей части нестабильная, инактивируясь в ходе иммобилизации [1].

Самыми распространенными продуцентами аспартазы являются разные штаммы *Escherichia coli* [2]. Целью настоящей работы являлось изучение аспартазной активности штаммов *E. coli* К и К 12 в виде свободных и иммобилизованных в полиакриламидном геле клеток и определение стабильности полученных препаратов, а также установление некоторых свойств биомассы, необходимых для приготовления хороших производственных катализаторов.

Материалы и методы

Культуру *E. coli* К получили с кафедры микробиологии МГУ. Биомассу выращивали в колбах на качалке при температуре 37 °С в течение 24 часов в среде следующего со-

става, %: кукурузный экстракт - 2; фумарат аммония - 3; двухзамещенный фосфат калия - 0,2; сульфат магния - 0,05; карбонат кальция - 0,05; pH среды 7,0. Клетки выделили из культуральной среды путем отцентрифугирования и включили в 10 %-ный полиакриламидный гель. Биомассу *E.coli* K 12 получили из Рижского завода "Биохимреактив".

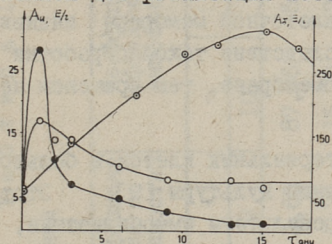
Для иммобилизации приготовили полимеризационную смесь следующего состава: 1 г биомассы; 300 мг натриевой соли L-аспарагиновой кислоты; 3 мл фосфатного буфера (pH 8,5: 0,05 M); 1 мл 50-процентного раствора акриламида и N,N'-метиленабисакриламида в отношении 9:1; 0,16 мл 50-процентного раствора N,N,N',N'-тетраэтилметилendiамина. Полимеризацию полиакриламидного геля (ПААГ) в присутствии клеток *E.coli* с аспартазной активностью проводили в ледяной бане. Блок геля раздробили через сито (0,6 мм) и несколько раз промывали водопроводной водой. В некоторых опытах в процессе полимеризации дополнительно прибавляли сшивающий реагент глутаровый альдегид. В опытах выяснения качества препарата в зависимости от свойств биомассы полимеризацию проводили в порах органического материала [3]. Так называемый армированный гель обладает довольно хорошими механическими и каталитическими свойствами.

Аспартазную активность биомассы и готового препарата определяли по ранее опубликованным методам на 1 M фумарата аммония при 37 °C (pH 8,5) спектрофотометрическим определением непрореагировавшей фумаровой кислоты [4]. Активность выражают в мк молях в мин на грамм препарата мк моль/мин г. Стабильность препаратов изучали путем инкубации иммобилизованного биокатализатора при 40 °C в субстрате или при непрерывной работе в колонке.

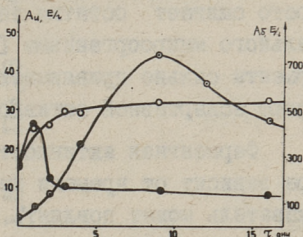
Результаты и обсуждение

Исследовали аспартазную активность клеток *E.coli* K и K 12. В первую очередь была определена зависимость аспартазной активности обоих штаммов *E.coli* от времени инкубации в 1-молярном растворе фумарата аммония при 40 °C. Иммобилизация клеток проведена без сшивающего реагента и с добавлением глутарового альдегида. Две активные альдегидные группы глутаральдегида на обоих концах молекулы реа-

гируют со всевозможными органическими функциональными группами, имеющимися в бактериях. Данная реакция приводит к полной дезорганизации построения клеток [5].



Фиг. 1. Аспартазная активность свободных и иммобилизованных в ПААГ клеток *E. coli* K в зависимости от времени инкубации в субстрате при 40 °C.
 ○ — активность биомассы,
 ● — иммобилизация проведена без сшивающего реагента,
 ○ — иммобилизация проведена с добавлением глутарового альдегида.



Фиг. 2. Аспартазная активность свободных и иммобилизованных в ПААГ клеток *E. coli* K 12 в зависимости от времени инкубации в субстрате при 40 °C.
 ○ — активность биомассы,
 ● — иммобилизация проведена без сшивающего реагента,
 ○ — иммобилизация проведена с добавлением глутарового альдегида.

Из проведенных опытов выясняется, что аспартазная активность обоих штаммов (A_g) удовлетворительная, увеличиваясь постепенно наверно ввиду автолиза клеток микроорганизмов и достигая до 325 Е/г у *E. coli* K и 729 Е/г у *E. coli* K 12, после чего быстро снижается по-видимому вследствие инактивации фермента, так как поврежденные лизисом клеточные стенки плохо защищают фермент от термических воздействий (см. фиг. 1, 2). Кривые, предъявляемые на фигурах, показывают, что активность всех препаратов (A_u) в начале работы резко повышается. Такое повышение активности фермента, локализованного в иммобилизованных микроорганизмах, объясняется автолизом клеток [6]. Препараты, включенные в ПААГ без сшивающего реагента, быстро инактивируются в ходе работы наверно потому, что фрагменты разрушенных клеток диффундируют из геля, вследствие чего материал утратит каталитическую способность. Параллельно с названным процессом возможна термическая инактивация фермента. Препараты, при иммобилизации которых добавляли глутаровый альдегид, сохраняют реакционную способность на долгое время. Из литературы известно, что клеточные стенки, обработанные глутаровым альдегидом, становятся более прочными к воз-

действию лизиса. В то же время, как показывают электронно-микроскопические исследования, морфология клеточных стенок не изменяется [7]. Возможно, что глутаровый альдегид просто сшивает остатки внутри клеточной мембраны индивидуального микроорганизма [8]. Вследствие такой обработки ферменты сильно привязываются к мембране, тем временем не теряют аспартазной активности.

Ферментная активность бактериальных клеток в большой мере зависит от времени выращивания культуры [9]. Этот показатель может повлиять и на результаты иммобилизации, так как при старении многие свойства клетки (а также построение клеточной стенки) заметно изменяются [10]. Чтобы выяснить самое подходящее время выращивания биомассы *E.coli* с целью получения активных и стабильных иммобилизованных препаратов клеток *E.coli* К 12 выращивали 6, 8, 10 и 12 часов, биомассу отцентрифугировали от культуральной среды и сразу провели иммобилизацию путем включения клеток в армированный ПААГ.

Как следует из таблицы I, по полученным данным невозможно сделать однозначного вывода о преимуществе длиннейшего или кратчайшего времени выращивания биомассы для их поздней иммобилизации в армированном геле. Чтобы уточнить результаты, проводили опыты по определению стабильности данных препаратов в условиях непрерывной работы в колонке. Колонки работали при 37 °C со скоростью притекания субстрата 0,73 мл/мин (см. табл. 2).

На основе этих результатов можно сказать, что стабильность у всех препаратов невелика. Препараты, иммобилизованные с добавлением глутаральдегида, обладают при любом времени выращивания большей рабочей стабильностью. Данные, приведенные в таблицах I и 2, показывают, что сохранение активности при иммобилизации, и, в частности, кинетика инактивации иммобилизованных препаратов (см. фиг. 3) существенно зависят от возраста биомассы. Наиболее обнадеживающие результаты получены в случае длительного времени выращивания. В дальнейшей работе необходимо оптимизировать возраст биомассы в комплексе с условиями иммобилизации, обращая при этом внимание также на более длительное выращивание.

Иммобилизация клеток *E. coli* K 12 с разной длительностью выращивания

Время вы- ращивания биомассы, ч	Активность биомассы, Е/г	Введенная в гель активность, Е	Вес иммобилизо- ванного препа- рата, г		Активность иммобилизован- ного препарата, Е/г	Коэффициент выхода по активности			Коэффициент эффективности иммобилизации	
			-	+		-	+	-		+
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II
6	160,00	160,00	7,83	7,83	42,30	33,33	2,07	1,63	87,56	54,28
8	115,51	115,51	7,93	7,51	15,12	20,90	1,04	1,36	15,70	28,42
10	121,30	121,30	7,51	7,74	12,42	22,83	0,77	1,45	9,55	33,06
12	136,80	136,80	7,29	7,52	46,70	28,40	2,49	1,56	116,28	44,30

- иммобилизация проведена без сшивающего реагента
 + иммобилизация проведена с добавлением глутарового альдегида

Т а б л и ц а 2

Степень конверсии субстрата (%) в зависимости
от времени непрерывной работы препаратов
в колонках

Время работы препарата, дни Время вы- рачивания, часы		I	2	3	4	5	6
6	-	10,5	9,5	6,3	2,0	2,0	1,1
	+	71,9	72,6	60,4	53,4	50,5	21,7
8	-	37,5	25,6	22,1	5,8	6,0	3,2
	+	63,5	62,1	56,8	38,8	33,0	8,7
10	-	17,7	11,6	10,0	7,8	6,8	1,0
	+	55,3	54,7	52,6	36,9	35,0	8,7
12	-	33,3	21,1	23,2	14,6	16,5	1,0
	+	45,8	38,9	22,1	20,4	20,2	14,1

- иммобилизация проведена без сшивающего реагента

+ иммобилизация проведена с добавлением глутарового альдегида.

Исследовали зависимость активности и стабильности препаратов от длительности хранения биомассы *E.coli* K 12 в холодильнике при температуре 0...+5 °C. Клетки разного времени хранения включали в армированный ПААГ с добавлением глутаральдегида, определяли активность полученных препаратов и стабильность при инкубации в растворе субстрата при 40 °C. Основные результаты приведены в таблицах.

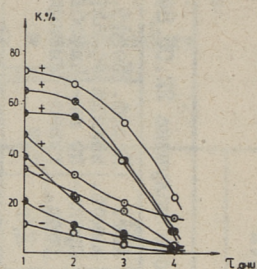
На основании серии проведенных опытов выявляется, что хотя аспартазная активность биомассы при старении микроорганизмов сильно возрастает ввиду увеличения проницаемости клеточной оболочки и цитоплазматической мембраны в результате частичного лизиса клеток, выход активности иммобилизованных препаратов и эффективность иммобилизации в то же время существенно снижается (см., табл. 3), так как клеточные стенки уже не так хорошо защищают ферментную систему от вредного действия акриламидных мономеров и инициаторов полимериза-

Результаты иммобилизации клеток *E. coli* K 12 в зависимости от длительности хранения биомассы в холодильнике

Длительность хранения клеток, дни	Биомасса получена 10.04.80				Биомасса получена 24.04.80				Биомасса получена 22.05.80			
	Акт. биомассы, Е/г	Акт. иммоб. рата, Е/г	Коэфф. выхода по ак-тивности	Коэфф. эффект. иммобилизации	Акт. биомассы, Е/г	Акт. иммоб. рата, Е/г	Коэфф. выхода по ак-тивности	Коэфф. эффект. иммобилизации	Акт. биомассы, Е/г	Акт. иммоб. рата, Е/г	Коэфф. выхода по ак-тивности	Коэфф. эффект. иммобилизации
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
I					26,64	11,70	3,20	37,44	136,80	28,42	1,52	42,63
2	72,00	30,50	3,15	94,55	27,00	6,58	1,72	11,05				
4	128,01	22,22	1,38	28,86					341,30	23,63	0,50	11,80
5	179,57	26,41	1,16	29,04	35,40	3,53	0,72	2,45				
6									440,02	32,00	0,55	17,60
8									400,00	30,32	0,54	16,36

ции. Исследование стабильности этих препаратов (см. табл. 4) позволяет утверждать, что длительность хранения биомассы в большой степени влияет на свойства иммобилизованных препаратов. Для приготовления иммобилизованных в армированном ПААГ препаратов с удовлетворительной стабильностью можно использовать биомассу *E.coli* К I2 с длительностью хранения до четырех дней.

На основе проведенной экспериментальной работы можно сделать следующие выводы:



Фиг. 3. Степени конверсии субстратов (К) в зависимости от времени непрерывной работы препаратов в колонках.
 ○ — клетки 6 часов выращивания,
 ⊗ — клетки 8 часов выращивания,
 ● — клетки 10 часов выращивания,
 ⊙ — клетки 12 часов выращивания.

Т а б л и ц а 4

Стабильность иммобилизованных в армированном ПААГ клеток *E.coli* К I2 в зависимости от длительности хранения биомассы в холодильнике

Время работы препарата, дни	Остаточная активность препаратов, %					
	Длительность хранения биомассы, дни					
	I	2	4	5	6	8
5	82	100				
7	70			55	52	50
11		98	86			38
12	71					
14			86	50	46	
21	75	92		41		
25	75	95				

1. Аспартазная активность штаммов *E.coli* К и К I2 достаточная для приготовления иммобилизованных препаратов.

2. Препараты, включенные в полиакриламидный гель без спшивающего реагента, быстро инактивируют в ходе работы. Глу-

таровый альдегид, добавленный в полимеризационную смесь, в заметной мере повышает стабильность иммобилизованных препаратов.

3. Результаты иммобилизации существенно зависят от возраста используемой биомассы. В дальнейшей работе надо обратить внимание на более длительное время выращивания клеток.

4. Длительность хранения клеток в холодильнике заметно влияет на свойства иммобилизованных препаратов. Для получения хороших производственных катализаторов можно рекомендовать биомассу, сохраненную не более четырех дней.

Автор выражает благодарность доценту А.И. Кёстнеру за участие в обсуждении, а также инженеру Х. Арунийт и лаборанту Х. Тийтсо за помощь в проведении экспериментов.

Л и т е р а т у р а

1. Chibata, I. Immobilized microbial cells with polyacrylamide gel and carrageenan and their industrial applications. - ACS Symp. Ser., 1979, vol. 106, pp. 187-202.

2. Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. Immobilized aspartase-containing microbial cells preparation and enzymatic properties. - Appl. Microbiol., 1974, vol. 27, pp. 878-885.

3. А.с. 530885 (СССР). Способ получения водонерастворимых ферментов / Таллинский политехн. ин-т; Авт. изобрет. А.И. Кёстнер, М.О. Мандель, В.Н. Федосеев, Э.Х. Сиймер. - Заявл. 08.02.74, № 1989900/13; опубл. в Б.И., 1977, № 37, МКИ C076 7/00.

4. А.с. 697521 (СССР). Способ получения иммобилизованных клеток микроорганизмов / Таллинский политехн. ин-т, Авт. изобрет. А.И. Кёстнер, М.О. Мандель, И.В. Березин, В.И. Яковлева, Н.Н. Зуева, И.А. Хинт, Л.С. Ванаселья. - Заявл. 12.07.77, № 2505482/04; опубл. в Б.И., 1980, № 42.

5. R u b b o, S.D. Biological activities of glutaraldehyde and related compounds. - J. Appl. Bact., 1967, vol. 30, pp. 78-87.

6. S u e m i t s u, R., S a s a k a w a, K., H o r i, T., Y a m a m o t o, H., S a w a i, M. The production of maltose by immobilized *Bacillus natto* H74B cells. - Sci. and Eng. Rev. Doshisha Univ., 1978, vol. 19, N 1, pp. 22-30.

7. H u g h e s, R.C., T h u r m a n, P.F. Crosslinking of bacterial cell walls with glutaraldehyde. - Biochem. J., 1970, vol. 119, N 5, pp. 925-926.

8. S c h n a r r, G.W., S z a r e k, W.A., J o n e s, J.K.N. Preparation and activity of immobilized *Acetobacter suboxydans* cells. - Appl. and Environ. Microbiol., 1977, vol. 33, N 3, pp. 732-734.

9. F r a n k s, N.E. Catabolism of L-arginine by entrapped cells of *Streptococcus faecalis* ATCC 8043. - Biochim. Biophys. Acta, 1971, vol. 252, N 2, pp. 246-255.

10. M a r t i n, C.K.A., P e r l m a n, D. Conversion of L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid by mixtures of immobilized cells of *Gluconobacter melanogenus* and *Pseudomonas* sp. - 5th Int. Ferm. Symp., Berlin, 1976, p. 297.

II. Г у л е в с к а я С.А., Л у с т а К.А., С у х о д о л ь с к а я Г.В., К р а с н о в а Л.А. Морфология и некоторые особенности размножения иммобилизованных микроорганизмов. - II Всесоюзный симп. "Пол. и прим. имм-ных ферм-тов", Абовян, 1977, с. 100.

12. К а л д а А.Х., В о р о б ь е в а Л.И. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение I. Изучение влияния иммобилизации на аспартазную активность и жизнеспособность пропионовокислых бактерий. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 63-74.

Immobilization of Microbial Cells with Aspartase

Activity II

Immobilization of Escherichia Coli Cells

Summary

Aspartase activity of free and entrapped into 10 percent polyacrylamide gel *Escherichia coli* K and K 12 cells was investigated. It was shown that aspartase activity of both microorganisms is sufficient for preparing immobilized preparations. The stability of preparations of immobilized microbial cells was determined by employing the incubation of the preparates in a solution of 1 M ammonium fumarate (pH 8,5, containing 1 mM MnCl_2) at 40 °C by continuous column processes. Adding the crosslinking reagent to the polymerisation mixture, the stability of entrapped cells was increased. The proper growing time of *E. coli* K 12 cells for preparing the productive immobilized preparation and the maximum preserving time of the cells at 0...+5 °C was determined. It was proved that the success of aspartase reaction with immobilized microorganisms is based on the properties of cells.

УДК 577.15

Л.В. Гаевая

СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НУКЛЕОЗИДФОСФОТРАНСФЕРАЗЫ

Нуклеозидфосфотрансфераза из моркови (нуклеотид: 2'-дез-оксинуклеозид 5'-фосфотрансфераза; НФ 2.7.1.77), впервые описанная Браверманом и Чаргаффом [1-2], катализирует перенос фосфатной группы от органического эфира, например, п-нитрофенилфосфата, 5'-АМФ и т.д. к нуклеозиду с образованием 5'-нуклеотида. В настоящее время свойства этого фермента изучены достаточно подробно [3-5]. Показано, что этот фермент способен использовать в качестве субстрата некоторые нуклеозиды, например, 1- β -D-арабинозил 5-флуоропиримидины [6], а также целый ряд неприродных нуклеозидов, модифицированных по азотистому основанию и остатку сахара [7]. Столь широкая специфичность фермента делает его пригодным для практического использования при получении природных и неприродных 5'-нуклеотидов, необходимых для исследовательских работ в области биохимии и молекулярной биологии.

В данной работе описываются некоторые свойства нуклеозидфосфотрансферазы, иммобилизованной в полиакриламидном геле. Для иммобилизации использовали вариант метода включения ферментов в структуру геля в присутствии модификаторов [8, 9]. Присутствие бифункциональных модификаторов обеспечивает дополнительное закрепление фермента в геле путем поперечной сшивки белковых молекул. Используемый метод иммобилизации обеспечивает выход активности, достигающий 30-40 % от исходной.

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

Материалы и методы

Нуклеозидфосфотрансфераза из моркови предоставлена нам СКТБ БАН (г. Новосибирск). Содержание белка в препарате 70–80 %, нуклеозидфосфотрансферазная активность – 300–400 ед. акт. на мг препарата, активность фосфатазы 1000–1500 ед. акт. на мг препарата. Нуклеозиды производства фирмы "Koch. Light" (Англия), п-нитрофенилфосфат (п-НФФ) производства фирмы "Fluka AG" (Швейцария), хроматографическая бумага Ватман № I фирмы "Whatman" (Англия).

Активность нуклеозидфосфотрансферазы определяли по скорости фосфорилирования тимидина в реакционной смеси, содержащей 50 М фосфат-цитратный буфер с pH 5,5, 20 М тимидин, 200 М п-НФФ и ферментный препарат в количестве, обеспечивающем превращение не более 10–20 % субстрата за 1 час инкубации при 37 °C. Разделение продуктов реакции проводили путем хроматографии на Ватман № I в системе растворителей (изо-масляная кислота : аммиак : 0,1М а-ЭДТА : вода : толуол = 160:2:3:22:20). Количество образовавшегося ТМФ определяли спектрофотометрически при $\lambda = 267$ нм после элюции вырезанного пятна ТМФ в 0,05 N HCl. За единицу активности принимаем количество фермента, катализирующее образование 1 нмоля ТМФ в минуту при 37 °C.

Фосфатазную активность в препаратах нуклеозидфосфотрансферазы определяли по скорости образования п-нитрофенола, путем измерения оптической плотности при $\lambda = 400$ нм и при щелочных значениях pH. Состав реакционной смеси: 50 М фосфат-цитратный буфер с pH 5,5, 200 м п-НФФ и ферментный препарат в количестве, приводящем к превращению не более 10–20 % субстрата за 1 час инкубации при 37 °C. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 нмоля п-нитрофенола в минуту при 37 °C.

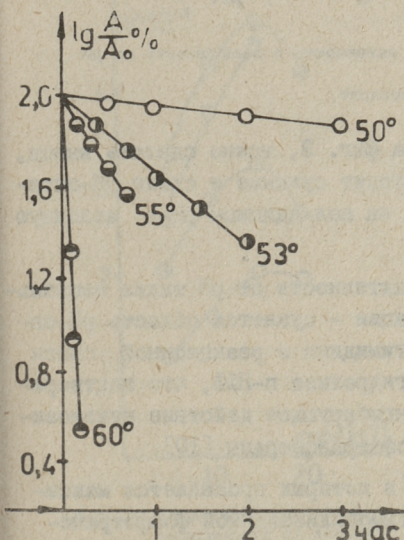
Результаты и обсуждение

При иммобилизации нуклеозидфосфотрансферазы в ПААГ в присутствии модификаторов были получены препараты с активностью 400–440 ед. на г преп., что составляло 30–

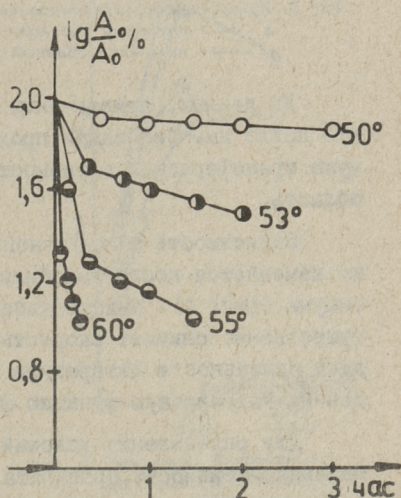
40 % от активности нативного фермента, использованного для иммобилизации. Соотношение трансферазной и фосфатазной активностей в препарате иммобилизованного фермента составляло 0,3-0,4, т.е. практически не изменялось по сравнению с нативным препаратом.

При хранении иммобилизованной нуклеозидфосфотрансферазы в буфере при 4-6 °C в течение месяца сохраняется до 80 % исходной активности.

На фиг. 1 и 2 показаны результаты, полученные при изучении термоинактивации нативной и иммобилизованной фосфотрансферазы. Можно видеть, что препарат иммобилизованного фермента состоит по крайней мере из двух фракций с отличающейся стабильностью. Причем константа скорости инактивации при 55 °C "стабильной" фракции в 3 раза меньше константы скорости инактивации нативного фермента ($-3,3 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ и $-10,3 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ соответственно). Это свидетельствует о том, что ковалентная сшивка ферментных молекул способствует увеличению их стабильности при повышенных температурах.

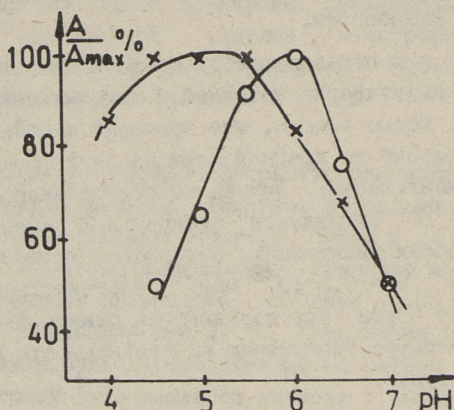


Фиг. 1. Термоинактивация нативной нуклеозидфосфотрансферазы.



Фиг. 2. Термоинактивация иммобилизованной нуклеозидфосфотрансферазы.

Для выяснения влияния иммобилизации на характер зависимости активности от pH определяли скорость фосфорилирования тимидина нативной и иммобилизованной фосфотрансферазой при изменении pH в пределах 4,5–7,0. Кроме того изучали зависимость скорости гидролиза п-НФФ от pH в опытах в присутствии и в отсутствии тимидина в реакционной смеси.



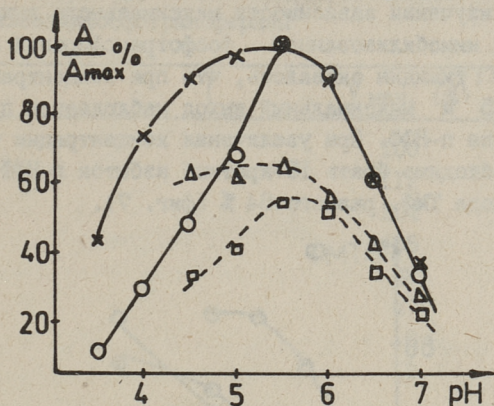
Фиг. 3. Нуклеозидфосфотрансферазная активность в зависимости от pH
 x — x нативный препарат,
 o — o иммобилизованный препарат.

Из данных, приведенных на фиг. 3, можно сделать вывод, что после иммобилизации происходит сужение и сдвиг pH-оптимума трансферазной активности на пол-единицы pH в щелочную область.

Зависимость фосфатазной активности от pH также несколько изменяется после иммобилизации — сужается область pH-оптимума (фиг. 4). Присутствие тимидина в реакционной смеси существенно снижает скорость гидролиза п-НФФ, что подтверждает описанное в литературе ингибирующее действие нуклеозидов на гидролазную функцию фосфотрансферазы [10].

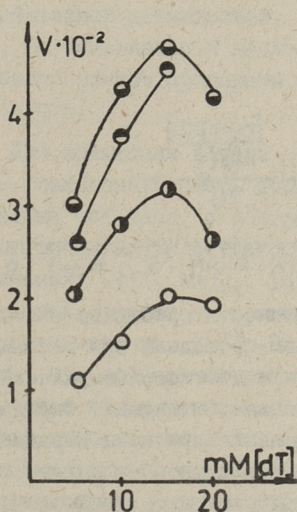
Для определения условий, в которых проявляется максимальная активность препарата иммобилизованной фосфотрансферазы изучали зависимость начальной скорости образования ТМФ от концентраций тимидина и п-НФФ. На фиг. 5 и 6 представлены результаты, полученные при изменении концентрации

одного субстрата, когда концентрация второго субстрата принимала определенные фиксированные значения. Из полученных данных видно, что при повышении концентрации тимидина выше

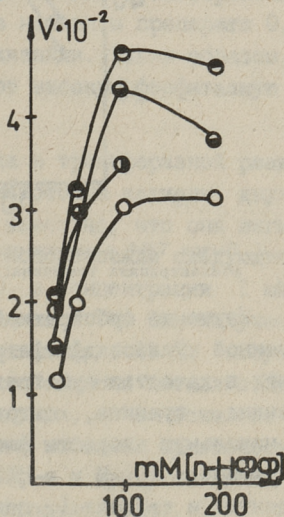


Фиг. 4. Фосфагазная активность в зависимости от pH.

- x — x нативный препарат в отсутствии Т.
 Δ — нативный препарат в присутствии Т.
 o — o иммобил. препарат в отсутствии Т.
 □ — иммобил. препарат в присутствии Т.



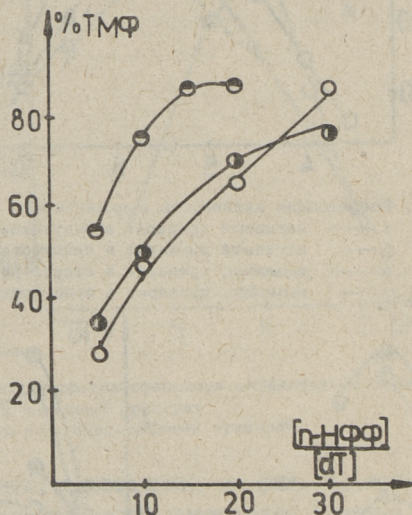
Фиг. 5. Начальная скорость в зависимости от концентрации тимидина при /п-НФФ/: 25 мМ (o), 50 мМ (●); 100 мМ (◐); 200 мМ (◑).



Фиг. 6. Начальная скорость в зависимости от концентрации п-НФФ при / Т/: 5 мМ (o); 10 мМ (●); 15 мМ (◐); 20 мМ (◑).

15 М и п-НФФ выше 100 М наблюдается уменьшение начальной скорости фосфорилирования тимидина.

При изучении зависимости максимального выхода ТМФ в реакции с иммобилизованной фосфотрансферазой от соотношения п-НФФ : тимидин оказалось, что при концентрациях тимидина 12,5–25 М максимальный выход наблюдается при 30-кратном избытке п-НФФ. При увеличении концентрации тимидина до 40 М необходимо брать 15-кратный избыток п-НФФ для достижения выхода ТМФ, равного 84 % (фиг. 7).



Фиг. 7. Выход ТМФ в зависимости от соотношения п-НФФ : тимидин при концентрациях тимидина: 12,5 мМ (○); 25 мМ (●); 40 мМ (◐).

Изучение субстратной специфичности препарата иммобилизованной нуклеозидфосфотрансферазы проводили при использовании в качестве субстратов рибо- и дезоксирибонуклеозидов аденина, гуанина, цитозина, урацила, тимидина. Определяли начальную скорость фосфорилирования при концентрации нуклеозидов 20 М и п-НФФ – 200 М. Полученные данные, приведенные в таблице I, показывают, что с наибольшей скоростью происходит фосфорилирование пиримидиновых рибо- и дезоксирибонуклеозидов, с меньшей скоростью идет синтез пуриновых нуклеотидов, особенно при использовании в качестве субстрата рибо- и дезоксирибоадениозина.

Т а б л и ц а I
Субстратная специфичность иммобилизованной
нуклеозидфосфотрансферазы

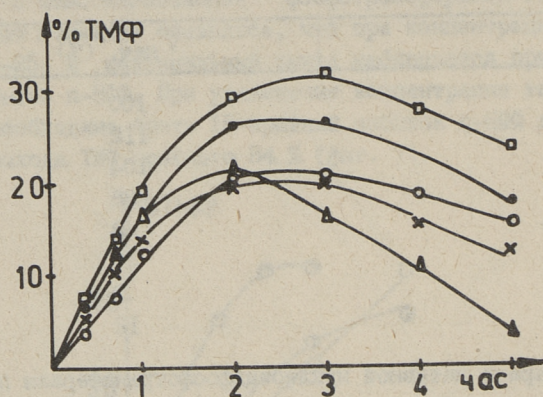
Нуклеозид	V _{нач.} (%)
Тимидин	100
Уридин	112
Цитидин	104
d -цитидин	86
гуанозин	48
d -гуанозин	47
аденозин	9
d -аденозин	12

В препарате нативной нуклеозидфосфотрансферазы присутствует большое количество примесного фермента-фосфатазы, активно гидролизующего как донор фосфата-п-НФФ, так и образующиеся продукты-нуклеотиды. Соотношение трансферазной и фосфатазной активностей, равное в нативном препарате 0,3-0,4, не изменяется и после иммобилизации. Таким образом, и иммобилизованные препараты проявляют высокую фосфатазную активность.

Для повышения выхода нуклеотида в трансферазной реакции в реакционную смесь добавляли некоторые катионы двухвалентных металлов, о которых было известно, что они ингибируют фосфатазную активность [5]. Использовали следующие соединения: CoCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , CuSO_4 в концентрации 1 мМ. Наибольший процент превращения тимидина в ТМФ был получен при использовании Zn^{+2} -32 % по сравнению с 20 %, полученным при проведении реакции без добавления металлов. Катионы меди также повышали выход продукта, но в несколько меньшей степени чем цинк. Присутствие кобальта практически не сказывалось на протекании реакции, а в присутствии магния происходила быстрая деградация продукта (фиг. 8).

В дальнейших опытах изучали влияние концентрации катионов цинка на выход продукта при различных концентрациях тимидина и п-НФФ. По данным, приведенным в табл. 2, можно видеть, что при всех изученных концентрациях тимидина и п-НФФ присутствие 1 мМ Zn^{2+} увеличивает выход ТМФ на

20-40 %. Увеличение концентрации катионов цинка не приводило к дальнейшему увеличению выхода продукта.



Фиг. 8. Кинетика синтеза ТМФ в отсутствии катионов металлов (0); в присутствии 1 мМ Zn^{2+} (□); Cu^{2+} (●); Mg^{2+} (Δ) и Co^{2+} (×).

Т а б л и ц а 2
Зависимость выхода ТМФ от концентрации Zn^{2+}

Концентрация			Выход ТМФ (%)
dT (мм)	п-НФФ (мм)	Zn^{2+} (мм)	
10	50	0	21
		1	31
	100	0	35
		1	50
		5	47
		10	64
20	200	0	52
		1	62
		10	64

Таким образом, получены препараты нуклеозидфосфотрансферазы, иммобилизованной в ПААГ в присутствии модификаторов, с сохранением 30-40 % исходной активности. Изучены некоторые свойства этих препаратов и показано, что они могут быть использованы для фосфорилирования нуклеозидов с высоким выходом целевого продукта.

Л и т е р а т у р а

1. B r a w e r m a n, G., C h a r g a f f, E. On the synthesis of nucleotides by nucleoside phosphotransferases. - Biochim. Biophys. Acta, 1954, vol. 15, pp. 549-559.
2. B r a w e r m a n, G., C h a r g a f f, E. Enzymatic phosphorylation of nucleosides by phosphate transfer. - J. Amer. Chem. Soc., 1953, vol. 75, pp. 2020-2021.
3. B r a w e r m a n, G., C h a r g a f f, E. On the distribution and biological significance of the nucleoside phosphotransferases. - Biochim. Biophys. Acta, 1955, vol. 16, pp. 524-532.
4. T u n i s, M., C h a r g a f f, E. Studies on the nucleoside phosphotransferase of carrot. - Biochim. Biophys. Acta, 1960, vol. 37, pp. 257-273.
5. B r u n n g r a b e r, E.F., C h a r g a f f, E. Purification and properties of a nucleoside phosphotransferase from carrot. - J. Biol. Chem., 1967, vol. 242, N 20, pp. 4834-4840.
6. S t r i d e r, W., H a r v e y, C.L., N u s s b a u m, A.L. Enzymatic and chemical synthesis of 1-β-D-arabinosyl-5'-fluoropyrimidine 5'-phosphates. - J. Med. Chem., 1968, vol. 11, pp. 524-527.
7. H a r v e y, C.L., C l e r i c u z i o, E.M., N u s s b a u m, A.L. Small-scale preparation of 5'-nucleotides and analogs by carrot phosphotransferase. - Anal. Biochem., 1970, vol. 36, N 2, pp. 413-421.
8. А.с. 530885, (СССР). Способ получения нерастворимых ферментов / Таллинск. политехн. ин-т. Авт. изобрет.: А.И. Кёстнер, М.О. Мандель, В.И. Федосеев, Э.Х. Сиймер. - Заявл. 08.02.1974. 1989900/13, опубл. в Б.И. 1976, № 37, МКИ С 07 G 7/00.
9. А.с. 673642, (СССР). Способ иммобилизации ферментов в геле / Таллинск. политехн. ин-т. Авт. изобрет.: В.А. Кросинг, Х.Я. Кальюла, А.И. Кёстнер, А.З. Фролков, В.З. Власева, Р.И. Шулутко. - Заявл. 15.II.1977, 2543103 /23-05, опубл. в Б.И. 1979, № 26, МКИ С 08 F 220/56.

10. Brunngraber, E.F., Chargaff, E.
Nucleoside phosphotransferase from carrot. Kinetic studies
and exploration of active sites. - J. Biol. Chem., 1970,
vol. 245, N 18, pp. 4825-4831.

L. Gayevaya

The Properties of Immobilized Nucleoside

Phosphotransferase

Summary

Nucleoside phosphotransferase from carrot has been immobilized by means of entrapment into modified polyacrylamide gel, obtaining the preparation with enhanced stability. The catalytic activity of the immobilized preparation has been investigated in dependence on pH, substrate concentration and the presence of some metal ions. The obtained preparation may be recommended for preparative nucleoside phosphorylation in the presence of Zn^{++} ions.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ТРИПСИНА НА АМИНОПРОПИЛСИЛОХРОМАХ,
АКТИВИРОВАННЫХ ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

Для иммобилизации белков, в частности ферментов, довольно успешно применяют неорганические носители, силанизированные γ -аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС) и активированные глутаровым альдегидом (ГА). Весьма частое использование ГА в качестве сшивающего реагента белков и активатора полимерных матриц обусловило интерес многих исследователей к природе взаимодействия ГА с белками и аминокосоединениями. Результаты многочисленных исследований, порой весьма противоречивые, объединены в обзорной статье Хопвуда [1]. Весьма различаются мнения разных исследователей о реакционной способности мономерной и полимерных форм ГА в отношении белков и стабильности образованных связей. Некоторые авторы [2] утверждают, что именно полимерные формы ГА создают стабильные поперечные связи в молекулах белков, однако встречаются и противоположные мнения [3].

Принимая во внимание результаты работ [4, 5], можно сказать, что реакции ГА с аминокосоединениями даже на модельном уровне являются весьма сложными процессами исследования, которые не привели к подтверждению классической схемы, гредполагающей образование оснований Шиффа в качестве конечного продукта.

Для ковалентной иммобилизации ферментов более важны работы по изучению взаимодействий ГА с полимерными матрицами, содержащими аминокосоединения. Исследованием модификации силанизированных силохромов ГА в работе [6] было показано, что для получения носителей с содержанием альдегидных групп немного больше 0,070 М/г требуется очень большой избыток ГА.

Определением содержания углерода, после модификации аминопропил-сферосила ГА [7], было установлено, что в среднем с каждой аминогруппой матрицы связывается больше одной молекулы ГА. В связи с этим авторы считают, что взаимодействие матрицы с полимерными формами ГА является более вероятным. В этой же работе развита идея, согласно которой необратимая фиксация белков на носителях активированных ГА осуществляется через взаимодействие ε -аминогрупп лизина с альдегидными группами, сопряженными с двойной связью (полимерные продукты алдольной конденсации ГА).

Однако, надо отметить, что в настоящее время мало изучено взаимодействие ферментов с активированными ГА носителями в зависимости от количественного содержания альдегидных групп. Также мало исследованы возможности хранения носителей активированных ГА в высушенном состоянии и влияние продолжительности хранения на свойства полученных препаратов иммобилизованных ферментов.

Целью настоящей работы является определение влияния количественного содержания альдегидных групп носителей активированных ГА на активность ферментных препаратов, полученных иммобилизацией модельного фермента трипсина, а также исследование влияния продолжительности хранения в высушенном состоянии образцов препарата альдегидэнзимохрома на количество связываемого ферментного белка и активность препаратов иммобилизованного трипсина.

Материалы и методы

Альдегидэнзимохромы — силохромы (с покрытием, если это указано отдельно), силанизированные АПТЭС и активированные ГА (очищенным от полимерных форм), были получены от ВНИИ лимнофоров (г. Ставрополь), хранились в заводской упаковке при комнатной температуре.

Аминопропилсилохром СХ 2,5 был получен обработкой силохрома СХ 2,5 раствором АПТЭС в толуоле согласно [6]. Количественное содержание аминогрупп определяли потенциометрическим титрованием [8].

Глутаровый альдегид — 25 %-ный раствор, фирмы "Реал" в течение 2-3 лет хранился при 4 °С без доступа света.

Содержание ГА, определенное по реакции с H_2NOH , составляло 25-27 %.

Активация аминопропилсилохрома СХ-2,5 производилась глутаровым альдегидом. К 1 г силинизированного силохрома СХ 2,5 с содержанием аминогрупп 0,003-0,16 ммоль/г добавляют 10 мл 25 % раствора ГА, вакуумируют в вакуумном эксикаторе 2 минуты, после чего оставляют при комнатной температуре на 18 часов. Фильтруют, промывают на фильтре 150 мл дистиллированной водой и 50 мл ацетона. Сушат при 100 °С в течение 30 минут.

Количественное определение альдегидных групп на альдегидэнзимохромах и аминосилохромах СХ-2,5, обработанных ГА, осуществляли окислением с 0,002 М H_2NOH при pH 5,0 в режиме pH-статирования по методу [6] и по количеству связанных хромогенных веществ, п-нитроанилидов глицина и лейцина, согласно модифицированному методу [9]. Надо отметить, что первый метод (окисление) ввиду его трудоемкости использовался только в отдельных случаях в качестве контрольного метода.

Для иммобилизации в работе использовали растворы трипсина "Spofa" (ЧССР), приготовленные растворением 0,1 г кристаллического трипсина в 10 мл 0,005-молярном трис - HCl буфере (pH 7,8, 0,02 М CaCl_2 , 0,04 М NaCl) при 4-10 °С в течение 1 часа с последующим центрифугированием осадка. Содержание ферментного белка (определенное спектрофотометрически с использованием оптического фактора 0,65) находилось в пределах 5,5-5,7 г/л. Содержание активного ферментного белка определено титрованием активных центров п-нитрофениловым эфиром п-гуанидинбензойной кислоты по методу [11] и составляло 65-70 %.

Процесс иммобилизации

К 0,200 г носителя, содержащего альдегидные группы, добавляют 5,0 мл раствора трипсина, вакуумируют суспензию в течение 2 минут, после чего оставляют при комнатной температуре в течение 1 часа, перемешивая за это время три раза встряхиванием. Фильтруют, промывают на фильтре 100 мл дистиллированной воды и 100 мл 3-молярным NaCl , до определения активности носитель оставляют под 3-молярным NaCl , с добавкой CaCl_2 .

Эстеразную активность препаратов иммобилизованного трипсина и растворов трипсина определяли титриметрически при $25 \pm 0,5$ °C по начальной скорости гидролиза 0,01-мольного бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) по модифицированному методу [10].

Для определения активности иммобилизованного трипсина в реактор объемом 30 мл добавляли 25-70 мг носителя с ферментом, предварительно высушенного отжатию между листами фильтровальной бумаги.

Количество связанного ферментного белка определяли по разности в ферментном растворе и промывных водах. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм с использованием оптического фактора 0,65 для трипсина.

Результаты и обсуждение

Для исследований влияния содержания альдегидных групп используемых носителей на активность получаемых препаратов и на удельную активность связанного трипсина иммобилизацию модельного фермента трипсина проводили на силикохромах с разным содержанием альдегидных групп и разным сроком хранения. Носители с разным содержанием альдегидных групп были получены обработкой силанизированных силикохромов СХ-2,5 с различным содержанием аминокрупп значительными избытками ГА (от 100- до 700-кратного по отношению к первичным аминокруппам матрицы).

Ввиду мешающего влияния следов ГА, которое, возможно, связано со сложностью взаимодействия полимерных форм ГА с силанизированными матрицами [2] при активации и при обработке раствором белка, нам в некоторых случаях не удалось (см. I и 3 опыты в табл. I) определить количество трипсина, связанного с аминосилкохромом СХ-2,5, активированным ГА. Однако можно отметить (см. табл. I), что ферментные препараты с наиболее высокой активностью получены именно на носителях с более низким содержанием альдегидных групп. В той же таблице показано, что при хранении активированных носителей в высушенном состоянии в течение 50 дней значительно уменьшилось количественное содержание альдегидных групп,

Зависимость активностей и количества связанного белка препаратов иммобилизованного трипсина, полученных на аминопропилисилохромах, активированных ГА, от содержания альдегидных групп и времени выдержки после активации

Время выдержи после активации, дни	Содержание аминотрупои исходного силюхрома М/Г	Содержание альдегидных групп, М/Г	Количество связанного белка, мг/Г	Активность препаратов иммобилизованного трипсина, МК кат/Г	Удельная активность иммобилизованного трипсина, МК кат/мг
I	0,030	0,025	-	27	-
I	0,090	0,069	-	-	-
I	0,160	0,070	-	12	-
I	0,230	0,069	-	-	-
50	0,030	0,019	34	57	0,17
50	0,090	0,039	43	43	0,10

причем на носителях с наиболее высоким содержанием групп убывь наиболее высока в процентном отношении. Иммунизацией модельного фермента трипсина на активированных носителях после их 50-дневной выдержки было найдено (см. табл. 1), что активности полученных ферментных препаратов заметно возросли по сравнению с 1 и 3 опытами. И для этой серии опытов явно заметна тенденция повышения ферментативной активности препаратов с уменьшением общего содержания альдегидных групп используемых носителей. Такое же явление найдено и для удельных активностей иммобилизованного трипсина для 5, 6 и 7 опытов (табл. 2). Если обратить внимание на количество связанного ферментного белка, то можно заметить весьма значительное повышение его (на 10 мг/г) при переходе от носителя с содержанием 19 мкм/г к носителю с 39 мкм/г альдегидных групп. Некоторое уменьшение (на 5 мг/г) общего количества связанного белка и активности ферментного препарата при дальнейшем повышении содержания альдегидных групп (42 мкм/г) вероятно можно объяснить пространственными препятствиями, создаваемыми "пересыщенностью" поверхности носителя альдегидными функциями.

Для исследования влияния продолжительного хранения в высушенном состоянии на эффективность связывания разных образцов коммерчески доступного альдегидэнзимохрома (силанизированный силохром, обработанный ГА) на этих носителях был иммобилизован трипсин. Проведенные эксперименты подтвердили возможность получения весьма активных препаратов иммобилизованного трипсина на всех исследованных носителях (см. табл. 2). Если обратить внимание на зависимость активностей полученных препаратов от диаметра пор используемых носителей, то в общих чертах можно сказать, что препараты с самыми высокими активностями получены на носителях с диаметром пор в интервале от 40 до 36 нм. Иммобилизация фермента на носителях с еще большим диаметром пор 122 и 155 нм способствовала получению препаратов с пониженным количеством связанного ферментного белка и следовательно, убыванию активности. Некоторое понижение удельной активности иммобилизованного трипсина для носителей с наибольшим диаметром пор (см. табл. 2, опыты 4 и 5) и с самым низким содержанием белка вероятно следует отнести на счет диффузионных затруднений, поскольку в опытах ис-

Характеристики препаратов иммобилизованного трипсина, полученных на образцах альдегидэнзимохрома с разным сроком хранения

Название носителя и продолжительность хранения, дни	Поверхность носителя, м ² /г	Размер фракций, мм	Диаметр пор носителя, нм	Содержание аминокислотных групп, исходного (по хрому, производ.), м/г	Содержание альдегидных групп (по данн.), м/г	Содержание альдегидных групп (опред. нами), м/г	Количество связанного белка, мг/г	Активность препаратов иммоб. трипсина, мк кат/г	Удельная активность иммоб. трипсина, мк кат/мг
Альдегидэнзимохром (790)	115	0,16-0,25	40	-	0,130	0,020	26	73	0,28
Альдегидэнзимохром широконейный (700)	90	0,1-0,2	50	-	0,250	-	23	88	0,38
Альдегидэнзимохром (330)	53	0,3-0,5	86	0,190	0,130	-	24	60	0,25
Альдегидэнзимохром (330)	44	0,3-0,5	122	0,190	0,100	-	19	40	0,22
Альдегидэнзимохром (300)	36	0,3-0,5	155	0,190	0,100	-	19	33	0,17
Альдегидэнзимохром (100)	76	0,3-0,5	40	0,110	0,130	0,010	20	52	0,27

пользовали носитель с повышенным размером частиц. Для подтверждения этого предположения следует указать на подобное же понижение удельной активности для носителя с большим размером частиц по сравнению с другим носителем при одинаковом же размере их пор (см. табл. 2, опыты I и 6).

Представляло также интерес выяснить влияние продолжительности хранения на содержание альдегидных групп альдегид-энзимохромов. Для определений выбрали образцы с весьма сходными характеристиками, но с различным сроком хранения (см. табл. 2, опыты I и 6). Было найдено, что для обоих носителей количественное содержание альдегидных групп уменьшилось приблизительно на один порядок, однако остаточное количество 20 мкмоль/г и 10 мкмоль/г достаточно для получения активных препаратов иммобилизованного трипсина.

Иммобилизацией модельного фермента трипсина на неорганических носителях – аминопропилсилохромах, активированных ГА, найдено, что содержание альдегидных групп сильно влияет на активность препаратов иммобилизованного трипсина, а также на удельную активность связанного ферментного белка.

Доказано, что активность препаратов и удельная активность иммобилизованного трипсина увеличивается при умеренном понижении содержания альдегидных групп.

Найдено, что даже после двухлетнего хранения в высушенном состоянии неорганические носители, активированные ГА, пригодны для получения препаратов иммобилизованного трипсина с высокой эстеразной активностью.

Л и т е р а т у р а

1. H o p w o o d, D. Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. – Histochemical Journal, 1972, vol. 4, 267–303.

2. M o n s a n, P. et al. Etude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldehyde – protéines. – Biochimie, 1975, vol. 57, N 11–12, pp. 1281–1292.

3. B l a s s, J., V e r r i e s t, C., L e a u, A., W e i s s, M. Monomeric glutaraldehyde as an effective crosslinking reagent for proteins. – J. Amer. Leather Chem. Assoc., 1976, vol. 71, N 3, pp. 121–132.

4. Blauer, G., Harmatz, D., Meir, E., Swenson, M.K., Zvilichovsky, B. The interaction of glutaraldehyde with poly(α , L-lysine), n-butylamine, and collagen, I. The primary proton release in aqueous medium. - Biopolymers, 1975, vol. 14, pp. 2585-2598.

5. Swenson, M.K., Meir, E., Yanai, P., Zvilichovsky, B. The interaction of glutaraldehyde with poly(α , L-lysine), n-butylamine, and collagen, II. Hydrodynamic, electron microscopic, and optical investigations on the reaction products. - Biopolymers, 1975, vol. 14, pp. 2599-2612.

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

7. Monsan, P. Influence of the conditions of trypsin immobilization onto spherosil on coupling efficiency. - Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1978, vol. 5, pp. 1-11.

8. Грузин И.В., Арен А.К., Мелнаталев Р.А. Модифицированные неорганические материалы для связывания биологически активных соединений. - Изв. АН Латв. ССР, Сер. хим., 1978, № 4, с. 416-421.

9. Klockow, M., Heinrich, N. Determination of reactive groups of polymer carriers with amino acid 4-nitroamilides. - FEBS Lett., 1972, vol. 26, N 1, pp. 53-55.

10. Goldstein, L., Levin, I., Katchalski, E. A waterinsoluble polyanionic derivative of trypsin, II. Effect of the polyelectrolytic carrier on the kinetic behavior of the bound trypsin. - Biochemistry, 1964, vol. 3, p. 1913.

11. Chase, T., Show, E. P-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: new active sites titrant for trypsin. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, vol. 29, N 4, pp. 598-514.

Immobilization of Trypsin onto Glutaraldehyde-
activated Aminopropylsilochromes

Summary

The influence of the amount of available aldehyde groups on the amount of bound protein and the activity of prepartate has been investigated. With the help of the immobilization of the model enzyme trypsin onto inorganic carriers - glutaraldehyde-activated aminopropylsilochromes has been found that aldehyde group content has a pronounced influence on the total and specific esterase activity of the immobilized enzyme preparations.

It has been demonstrated that the activity of preparations and the specific activity of immobilized trypsin increases as the content of the aldehyde groups decreases.

It has been found that even after 2 years of storage in dry state the glutaraldehyde-activated inorganic carriers are appropriate for obtaining the preparations of immobilized trypsin with high esterase activity.

М.К. Фриеденталь, А.И. Кёстнер

ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Сообщение III

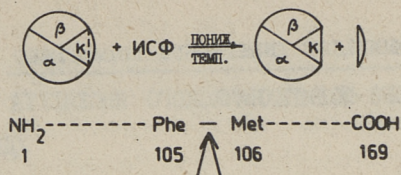
Особенности применения иммобилизованного
сычужного фермента при свертывании молока

Применение иммобилизованных молокосвертывающих ферментов для коагуляции молока при производстве сыра является одним из перспективных направлений устранения дефицита сычужного фермента [1].

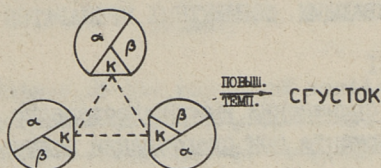
В настоящее время, в связи с интенсивным развитием инженерной энзимологии, стала возможной разработка эффективных способов иммобилизации молокосвертывающих ферментов [2]. Полученные препараты, однако, не нашли применения в практике. С лучшей стороны показали себя пепсин, иммобилизованный на аминостекле [3], и щелочная протеаза, иммобилизованная на дауэкс MWA-I [4]. Иммобилизацией химозина (сычужного фермента) получены довольно нестабильные препараты с низким выходом активности [5, 6]. По нашему мнению, внедрение иммобилизованных молокосвертывающих ферментов в практику связано с необходимостью иметь, с одной стороны, стабильные препараты и с другой стороны – хорошее представление о закономерностях действия их на молоко. Исходя из этого, в задачу наших исследований входило изучение закономерностей действия иммобилизованного сычужного фермента (ИСФ) на молоко.

Известно, что свертывание молока протекает в две стадии: ферментативную, т.е. специфический ограниченный протеолиз казеина в молоке, и неферментативную, т.е. коагуляция образующегося пара-казеина с образованием сгустка (фиг. I). (Третья стадия, т.е. формирование сыра в данном случае не представляет интереса).

ПЕРВИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ



ВТОРИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ



Фиг. 1. Схематическое изображение сычужного свертывания молока с помощью ИсФ /9/.

Эти два процесса могут быть разделены, если ферментативную стадию проводить при температуре ниже 10–15 °С, а стадию коагуляции – при повышенной температуре. Эта закономерность, открытая в 1942 году Берриджем, и предполагает возможность применения иммобилизованных молокосвертывающих ферментов для коагуляции молока, так как препарат может быть отделен от молока до проведения коагуляции последнего.

Материалы и методы

В работе использовали как растворимый, так и иммобилизованный эталонный образец сычужного порошка. Иммобилизацию проводили согласно методике [7]. Субстратом использовали 12 %-ный раствор порошка сухого обезжиренного молока в 10 мМ CaCl_2 , pH 6,4.

Активность препаратов определяли по модифицированному нами методу Бингхама [8]. 25 мл обезжиренного молока с pH 6,4 пипетировали в 40-миллилитровый термостатированный реакционный сосуд и при заданной температуре добавляли определенное количество сычужного фермента. Для анализа реакционной среды 0,5 мл реакционной смеси пипетировали в 3,0 мл 1,0-молярного ацетатного буфера с pH 5,2, охлаждали

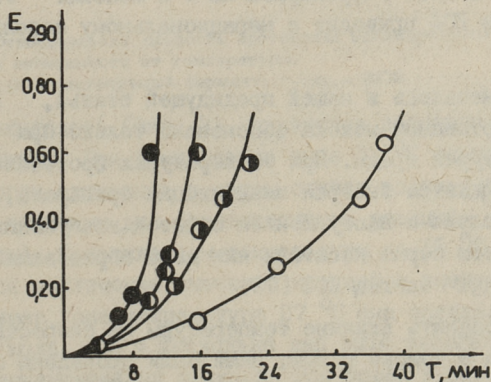
до 0 – 2 °С в стаканах центрифуги на ледяной бане. После центрифугирования при температуре 2 °С в течение 10 минут осажденные продукты гидролиза растворяли в 10 мл 1,0 н

NaOH. Содержание количества белка в осадке определяли спектрофотометрически при длине волны 290 нм (можно предполагать, что осаждаемый белок содержит преимущественно пара-казеин).

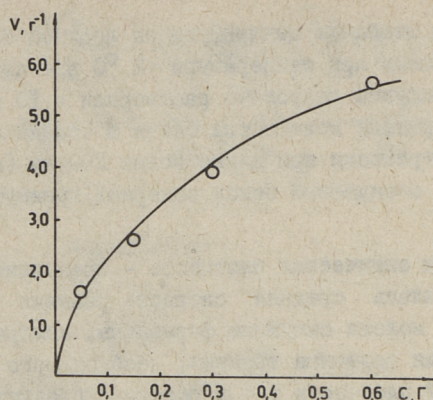
По кривым оптическая плотность – продолжительность реакции определялась средняя скорость реакции гидролиза обезжиренного молока сычужным ферментом, которая выражается как обратная величина времени, необходимого для достижения оптической плотности 0,6 в растворе продуктов. Полученные результаты хорошо коррелируются со свертывающей способностью препаратов [8].

Результаты и обсуждение

Первой задачей мы считали изучение скорости ферментативной реакции коагуляции молока при различных количествах ИСФ. Типичные кривые увеличения концентрации продуктов гидролиза обезжиренного молока представлены на фиг. 2. Из полученных данных вычисляли средние скорости реакций. Соответствующие данные приведены на фиг. 3.



Фиг. 2. Оптическая плотность в зависимости от продолжительности реакции при температуре 35 °С, рН 6,4. Количество ИСФ г на 25 мл молока: ● – 0,6; ◐ – 0,3; ◑ – 0,15; ○ – 0,05.

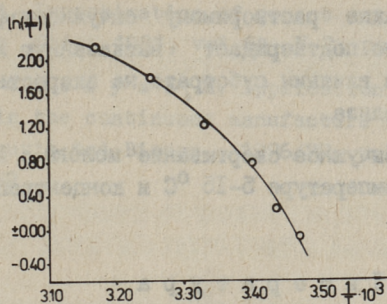


Фиг. 3. Скорость протеолиза обезжиренного молока в зависимости от количества ИСФ в пробе (25мл).

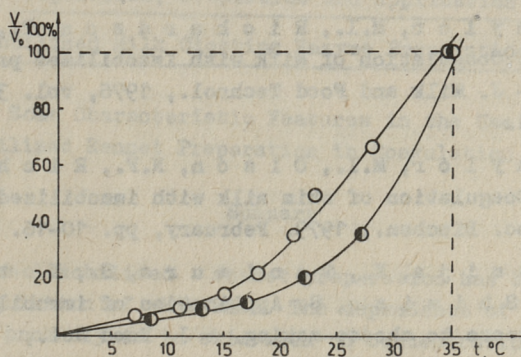
На фиг. 3 хорошо видно, что при концентрациях влажного ИСФ 0,05 – 0,4 г на 25 мл молока скорость протеолиза обезжиренного молока почти пропорциональна количеству препарата в пробе. При концентрациях ниже 0,05 г и выше 0,4 г на 25 мл молока наблюдается отклонение от линейной зависимости. В случае применения растворимого сычужного фермента в данных пределах скорости наблюдается линейная зависимость между количеством фермента и скоростью реакции. Следовательно, мы рекомендуем холодное ферментирование молока проводить при концентрациях 2–15 г препарата на 1 л молока. Увеличение концентрации ИСФ приводит к нерациональному использованию препарата.

Как отмечалось в нашей предыдущей статье, применение ИСФ для свертывания молока обосновано только при пониженных температурах среды. При температурах протеолиза 30 °C и выше наблюдается быстрая инаktivация препарата, что может быть обусловлено с наступлением скрытой коагуляции молока на поверхности зерна носителя или даже образованием видимых хлопьев вокруг частиц ИСФ [7].

Чтобы оценить влияние температуры на скорость протеолиза казеина в молоке с ИСФ, нами были проведены опыты по протеолизу молока при температурах 5–35 °C. Результаты представлены на фиг. 4 и 5.



Фиг. 4. Скорость протеолиза обезжиренного молока с ИСФ в зависимости от температуры в координатах Аррениуса.



Фиг. 5. Относительная скорость протеолиза обезжиренного молока в зависимости от температуры.
 ○ — растворимый фермент; ● — ИСФ.

Как ожидалось (фиг. 3), первичное действие ИСФ зависит от температуры. При температуре выше 35°C значения кажущейся энергии активации в общем случае соответствуют значениям ΔH , типичным для ферментативных реакций ($30 - 40$ кДж/моль). С понижением температуры до 15°C , однако, наблюдается увеличение значений кажущейся энергии активации. Так, например, при температуре 27°C она составляет $104,8$ кДж/моль, что в несколько раз выше энергии активации обычных ферментативных реакций. При более низких температурах скорость реакции существенно не зависит от температуры среды. Это может быть связано с особенностями конформационных или агрегатных состояний субстрата. Данное явление

ние свойственно также растворимому сычужному ферменту (фиг. 5), что косвенно подтверждает высказанную выше гипотезу о значительном влиянии субстрата на скорость его ферментативного гидролиза.

Таким образом, сычужное свертывание молока с ИСФ следует проводить при температуре 5-15 °С и концентрации 2 - 15 г на 1 л молока.

Л и т е р а т у р а

1. H a r t m e i e r, W. Immobilisierte Enzyme für die Lebensmitteltechnologie. - Gordian, 1977, Bd. 77, N 9, S. 232-237.

2. T a y l o r, M.I., R i c h a r d s o n, T., O l s o n, N.F. Coagulation of milk with immobilized proteases: a review. - J. Milk and Food Technol., 1976, vol. 39, N 12, pp. 864-871.

3. T a y l o r, M.I., O l s o n, N.F., R i c h a r d s o n, T. Coagulation of skim milk with immobilized proteases. - Proc. Biochem., 1979, February, pp. 10-16.

4. O h m i j a, K., T a n i m u r a, S., K o b a y a s h i, T., S h i m i z u, S. Application of immobilized alkaline protease to cheese-making. - J. Food Sci., 1979, vol. 44, N 6, pp. 1584-1588.

5. G r e e n, M.L., C r u t c h f i e l d, G. Studies on the preparation of water-insoluble derivatives of rennin and chymotrypsin and their use in the hydrolysis of casein and the clotting of milk. - Biochem. J., 1969, vol. 115, pp. 183-190.

6. P a q u o t, M., T h o n a r t, Ph., D e r o a n n e, C. Améliorations des caractéristiques de la présure fixée sur verre poreux. - Lait, 1976, N 553-554, pp. 154-163.

7. Ф р и е д е н т а л ь М.К. Получение, свойства и применение иммобилизованных молокосвертывающих ферментных препаратов. Сообщение II. Получение и характеристика иммобилизованного сычужного фермента. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 55.

8. Friedenthal, M., Siimer, E., Köstner, A. Investigation of rennet action on skim milk. - J. Dairy Sci., 1981, vol.64, N 2, pp. 342-345.

9. Cheryan, M. Application of immobilized proteases in the continuous manufacture of cheese. - Food, Pharmaceutic and Bioeng., 1976/77, vol. 74, N 172, pp. 47-52.

M. Friedenthal, A. Köstner

Preparation, Properties and Application of

Immobilized Milk Clotting Enzyme Preparations III

Some Characteristic Features in the Use of Immobilized Rennet Preparation in Coagulation of Milk

Summary

The immobilized rennet preparation has been used in coagulation of skim-milk. The dependence of the rate of casein proteolysis in skim-milk on concentration of rennet preparation and reaction temperature has been determined. It has been found that, the first, the rate of reaction was limited by pore diffusional effects of the carrier at the high concentrations of preparation. The second, the rate of reaction depends on temperature, especially below 35 °C. The activation energy, determined from the slope of the Arrhenius plot, was 35,7 kJ/mole at 40 °C and 104,8 kJ/mole at 27 °C.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТОВ КАЗЕИНА

Ферментативные гидролизаты казеина используются для производства питательных сред в бытовой химии и в медицине. Для получения белковых гидролизатов применяются разные протеазы как животного, так и бактериального происхождения [1-5]. Гидролизаты, полученные протеазами различного происхождения, отличаются по степени конверсии и по составу пептидов. Для достижения наиболее глубокой степени конверсии часто комбинируют действие нескольких протеаз [2] или используют комплексные препараты протеаз [1, 3, 4]. В нашей лаборатории разработаны технологические параметры получения гидролизатов казеина под влиянием комплексного препарата иммобилизованного панкреатина [5].

Целью настоящей работы было изучение состава гидролизатов казеина, полученных препаратами панкреатина и некоторых более доступных бактериальных комплексных протеаз.

Материалы и методы

Использовали следующие протеазы: мезентерин и протосубтилин производства Вильнюсского ферментного завода, щелочная протеаза производства Ладжинского ферментного завода, протеаза из термофильного микроорганизма *Actinomyces vulgaris*, полученная из Института микробиологии АН СССР, неочищенный препарат панкреатина производства Рижского мясокомбината. В качестве носителя использовали силхромы производства Горьковского опытного завода ВНИИП марки СХ-1,5, модифицированные в нашей лаборатории поликонденсационными смолами [6].

В качестве субстрата использовали 2 %-ный раствор казеина по Гаммерштену с рН, оптимальным для каждого фермента. Гидролиз казеина проводили в реакторе периодического действия с перемешиванием при температуре +30 °С в течение 6 часов при дозе фермента 1.66 н кат/г на 1 г сухого казеина. Активность ферментных препаратов определяли по модифицированному методу Ансона. Степень гидролиза определяли по накоплению аминного азота в гидролизате, определяемого по реакции первичных аминогрупп с тринитробензенсульфокислотой (ТНБС) [7]. Состав полученных гидролизатов определяли методом гельхроматографии на сефадексе G-10 в колонке с размерами 10x540 мм, уравновешенной 0,2-мольным боратым буфером с рН, соответствующим рН гидролизата. Фракции собирали по 2 мл. Содержание белка во фракциях определяли по поглощению УФ света при λ 280 нм.

Для выражения степени гидролиза учитывали следующее. Суммарное содержание азота, не входящего в состав пептидных связей в казеине, рассчитано по литературным данным о его аминокислотном составе. Оно составляет 1,6 % от сухого вещества [8]. Учитывая, что общее содержание азота в казеине 14 %, содержание азота, входящего в состав пептидных связей, составляет 12,4 % или 8,8 мкмоль на 1 мг казеина, что и принято за 100 % при расчете относительной глубины гидролиза (степени конверсии субстрата).

Результаты и их обсуждение

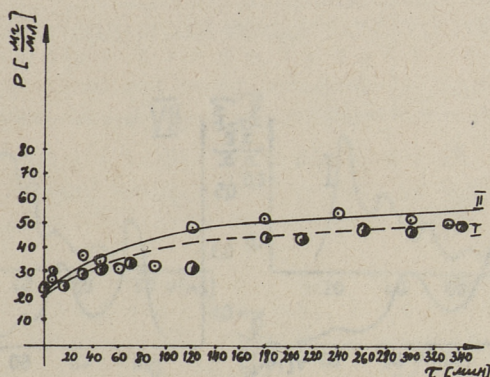
Для выяснения кинетики гидролиза и максимальной степени конверсии всеми указанными протеазами как в свободном, так и в иммобилизованном виде провели несколько 6-часовых опытов по гидролизу казеина.

Всеми препаратами были получены довольно похожие кинетические кривые.

На фиг. 1 изображены кинетические кривые гидролиза казеина свободным и иммобилизованным препаратом мезентерина как типичный пример кинетики протеолиза казеина.

При проведении гидролиза казеина всеми испытанными ферментами наблюдалось интенсивное накопление аминного азота в гидролизате в течение первых трех часов гидролиза и

значительное уменьшение скорости накопления аминного азота после пяти часов гидролиза. Продолжение гидролиза более шести часов считали нецелесообразным. Данные о достигнутой степени конверсии гидролизатов приведены в таблице I.

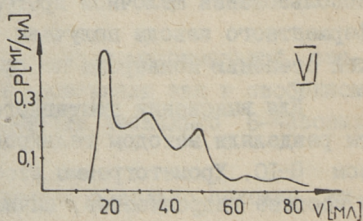
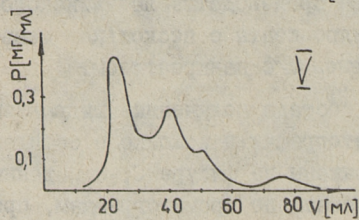
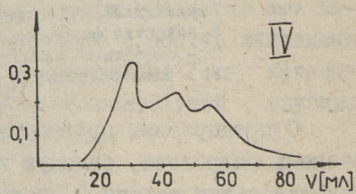
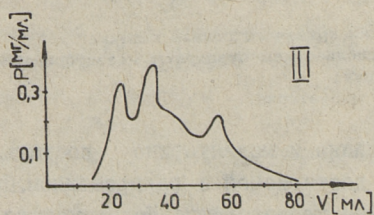
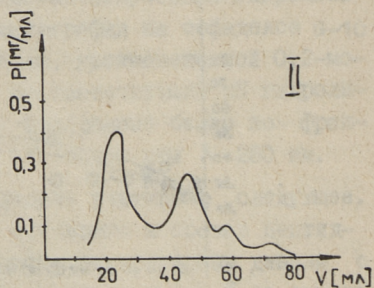
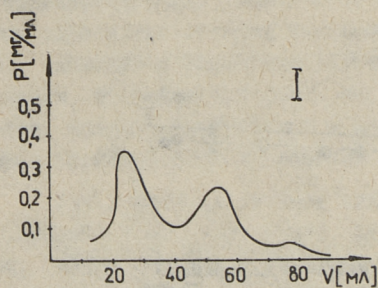


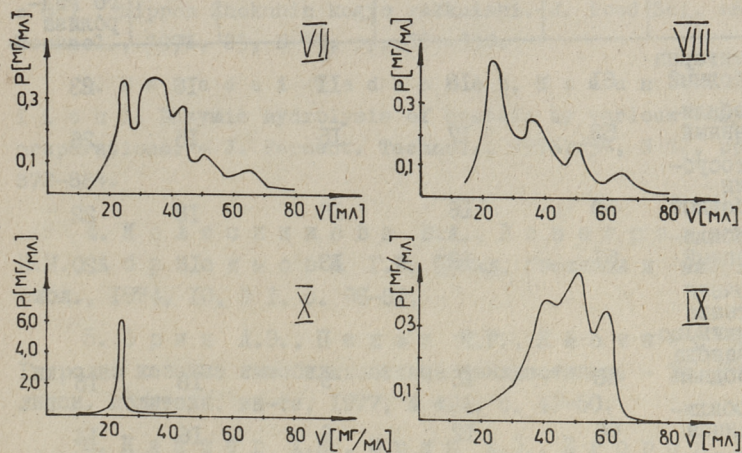
Фиг. 1. Характерная кинетическая кривая гидролиза казеина.
В качестве фермента использованы препараты мезентерина
I - свободный мезентерин;
II - иммобилизованный мезентерин.

С препаратами протосубтилина и мезентерина достигали степень гидролиза, близкую к достигаемой с панкреатином. При использовании щелочной протеазы производства Ладыжинского ферментного завода получали гидролизаты с несколько меньшей степенью конверсии по сравнению с панкреатином.

Для выяснения пептидного состава полученные гидролизаты разделяли методом гельхроматографии в колонке с сефадексом G-10. Хроматограммы изображены на фигуре 2, а данные о составе гидролизатов, вычисленные по хроматограммам, приведены в таблице I.

Хроматограммы полученных гидролизатов казеина оказались характерными для каждого фермента и несколько отличались для свободного и иммобилизованного препарата. Наблюдалось сохранение фракции высокомолекулярных белков в случае всех изучаемых препаратов кроме протеазы из микроорганизма *Actinomyces vulgaris*. Гидролизаты, полученные из *Actinomyces vulgaris*, отличались высоким содержанием





Фиг. 2. Хроматограммы разделения гидролизатов казеина на сефадексе G-10. Гидролизаты получены под влиянием следующих ферментных препаратов:

- I - свободный панкреатин;
- II - иммобилизованный панкреатин;
- III - свободный протосубтилин;
- IV - иммобилизованный протосубтилин;
- V - свободный мезентерин;
- VI - иммобилизованный мезентерин;
- VII - свободная щелочная протеаза из Ляджинского ферментного завода;
- VIII - иммобилизованная щелочная протеаза;
- IX - иммобилизованная протеаза из *Actinomyces vulgaris*;
- X - исходный казеин.

двух фракций пептидов с молекулярным весом около 4000 и с молекулярным весом меньше 1000.

Т а б л и ц а I
Состав гидролизатов, полученных разными протеазами

Используй- ванный препарат	Состав гидролизата в процентах				Степень конверсии после 6-часово- го гид- ролиза
	M>10000	10000>M>5000	5000>M>1000	M<1000	
Мезентерин свободный	61	18	11	10	23
иммобили- зованный	53	17	15	15	26
Протосуб- тилин свободный	50	16	16	18	22
иммобили- зованный	51	18	13	18	20
Щелочная протеаза Ладыжинско- го завода свободная	58	15	9	18	15
иммобили- зованная	66	12	6	16	14
Термофиль- ная проте- аза из <i>Actinomy- ces vulga- ris</i>					
иммобили- зованная	10	23	43	24	20
Панкреатин свободный	50	18	18	14	27
иммобили- зованный	53	23	11	13	25

Гидролизаты казеина с близкой степенью конверсии явно различаются по пептидному составу, что следует учитывать при оценке их пригодности для использования в разных отраслях хозяйства.

Работа выполнена под руководством проф. А.И. Кёстнера.

Л и т е р а т у р а

1. D a h l e, H.K., J e b s e n, Haave Inga-Johanne. The enzymatic degradation of caseinate studied by an agar gel method. - Lebensmitt.-Wiss. +Technol., 1977, 10, N 4, S. 225-226.
2. I s h i d a K e n g o, Y a m a m o t o A t s u - s h i. Nippon Shokuhin kogyo gakkaiishi.-J. Food Sci. and Technol., 1976, 23, N 11, pp. 524-530.
3. N a k a d a i T a d a n o b u, N a s u n o S e - i i c h i. Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. - J. Ferment. Technol., 1976, 54, N 12, pp. 872-884.
4. К о л е с н и к о в а В.А., В и н о г р а д о в а И.Н., А б р о с и м о в а Г.Е. Прикл. биохимия и микро-биол., 1974, 10, № 1, с. 86-91.
5. Э р и н А.Э., П е д а к М.Р., К ё с т н е р А.И. Гидролиз казеина иммобилизованным панкреатином. - Тр. Тал-линск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 43-50.
6. К и п п е р Х.Я., Э р и н А.Э., Е г о р о в Х.Я., К и в и с и л л а К.А., К ё с т н е р А.И. Получение ак-тивированных изоцианатами кремнеземных носителей для иммо-билизации ферментов. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1976, № 402, с. 21-27.
7. K a z u o S a t a k e, T s u n o O k u y a m a, M o c h i h i k o O h a s h i, T o m o t a k a S h i - n o d a. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfo- nic acid. - The Journal of Biochemistry, 1960, 47, N 5, pp. 654-660.
8. Д у д е н к о в А. Я., Д у д е н к о в Ю.А. Биохимия молока и молочных продуктов. М., Пищевая промыш- ленность, 1972, с. 13.

The Use of Bacterial Proteases for

Casein Hydrolysis

Summary

The enzymatic hydrolysis of the 2 pC solutions of casein with the help of several bacterial proteases and pancreatic complex in native and immobilized form has been investigated. The enzymes have been bound to siliceous porous carrier Silochrome CK-1,5 after modification with polymer. The hydrolysis was followed by the increase of amine nitrogen determined with trinitrobenzensulfuric acid. The composition of hydrolysates has been determined by the method of gel chromatography on Sephadex G-10 and G-25. The equal final conversion has been achieved with mesenterine, protosubtiline or pancreatine.

КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ

Математическое описание гидролиза бензилпенициллина (БП) с помощью иммобилизованной пенициллинамидазы (ИПА) необходимо для расчета условий проведения гидролиза БП в лабораторных и промышленных реакторах, для проектирования технологического оборудования и т.п. Изучению кинетических свойств нативной ПА посвящено много работ, однако исследованию кинетики действия ИПА уделено мало внимания.

Наши предыдущие работы посвящены в основном изучению некоторых кинетических параметров ИПА [1], на основе которых создана предварительная модель и соответствующее формальное кинетическое уравнение [2] гидролиза БП с применением ИПА. Однако полученное нами сложное кинетическое уравнение неудобно для практических расчетов.

Предметом изучения настоящего сообщения является проверка разработанных ранее обобщенных кинетических уравнений [3, 4] для описания кинетики действия ИПА.

Материалы и методы

Исходные материалы и методика иммобилизации ПА включением фермента в модифицированный полиакриламидный гель (ПААГ) описаны в работе [5].

Гидролиз БП проводили в стандартных условиях в объеме 400 мл при 40 °C и pH 7,5–7,8 в режиме pH-статирования, нейтрализуя образовавшееся одно из продуктов гидролиза

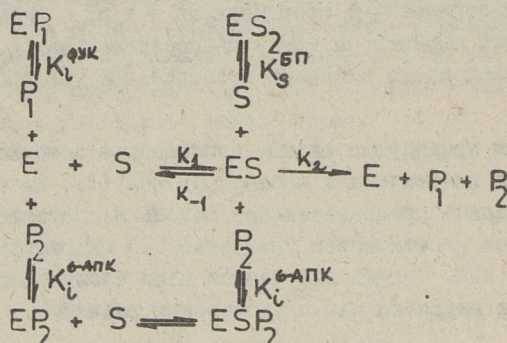
Работа выполнена под руководством Э.Х. Сиймера.

БП – фенилуксусной кислоты 12,5 %-ным раствором аммиака. Соотношения ИПА: раствор составляли до 20 % по весу. В ходе процесса регистрировали расход щелочи и определяли концентрацию накопившегося второго продукта – 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) колориметрическим методом [6].

Результаты и обсуждение

Специальными опытами, проведенными классическим способом исследования ингибиторов, введением их различных количеств в исходные растворы БП, обнаружено, что субстрат БП является слабым ингибитором, ФУК – сильным конкурентным и 6-АПК – слабым неконкурентным ингибитором фермента.

На основе опытных данных можно представить гидролиз БП, катализируемой ИПА, следующей моделью (фиг. 1):

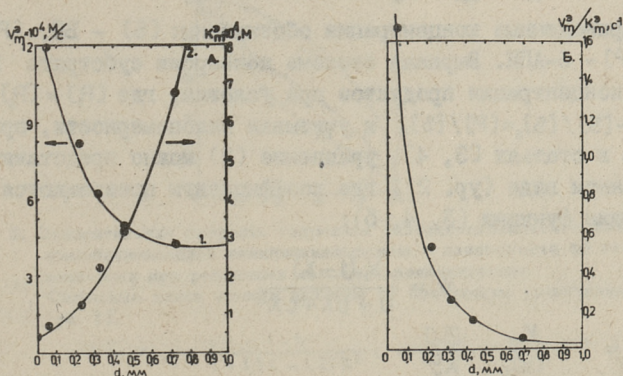


Фиг.1. Модель гидролиза бензилпенициллина.

Через K_s , $K_i^{\text{ФУК}}$, $K_i^{6\text{-АПК}}$ и $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ (фиг. 1) обозначены константы ингибирования субстратом БП, продуктами ФУК и 6-АПК и константа Михаэлиса-Ментен.

Анализ зависимости начальной скорости гидролиза БП, катализируемого ИПА, показал, что кинетика реакции так же, как и в случае ПА, подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен, если не использовать высокие концентрации субстрата, при которых ингибирование субстратом будет заметным. Вычисляемая величина константы Михаэлиса-Ментен, найденная для ИПА в интер-

вале концентрации БП 0,3–500 мМ, равна 0,39 мМ (размеры частиц 0,2–0,4 мМ) [1]. Однако для препаратов ИПА, полученных включением ПА в гель в присутствии бифункционального модификатора, характерна зависимость активности от размера гранул. Более подробное изучение этого явления указывает на существование диффузионных затруднений движения субстрата и продуктов гидролиза БП в пространстве ПААГ. Уменьшение диаметра зерен ИПА (фиг. 2) приводит к изменению наблюдаемых эффективных кинетических параметров. Найденная по начальным скоростям гидролиза БП при различных его концентрациях (0,01–100 мМ) эффективная константа Михаэлиса–Ментен с уменьшением диаметра гранул ИПА постепенно приближается к той же величине для нативной ПА (10 мкМ). Эта величина согласуется со значением константы (4,6 мкМ), найденным в работе [7] и позволяет заключить, что процесс иммобилизации ПА не изменяет истинных кинетических свойств самого фермента. С практической точки зрения представляет интерес тот факт, что уменьшение размеров гранул сказывается в увеличении максимальной эффективной скорости ($V_m^{эфф}$, фиг. 2 А) и изменяет общую эффективность гидролиза БП ($V_m^{эфф}/K_m^{эфф}$, фиг. 2 Б). Процесс уменьшения размеров зерен катализатора практи-



Фиг. 2. Влияние диаметра зерен иммобилизованной пенициллинамидазы на эффективные кинетические параметры.

А. Максимальная эффективная скорость гидролиза (1) и эффективная константа Михаэлиса–Ментен (2) в зависимости от диаметра катализатора.

Б. Соотношения максимальной скорости гидролиза на величину Михаэлиса–Ментен.

Условия определения: рН 7,5, 40 °С, 0,1 М КСl, концентрация субстрата 0,1–100 мМ.

чески имеет место в реакторах с перемешиванием и это явление надо учитывать при интерпретации кинетических данных.

Из вышеприведенного следует, что в условиях наличия диффузионного сопротивления к полученным кинетическим данным надо относиться с большой осторожностью: их применение при объяснении истинной кинетики действия ПА может привести к неправильным выводам. Однако полученные нами в конкретных условиях (размеры частиц) эффективные параметры могут быть основой для уравнений прикладного характера.

Согласно модели на фиг. 1 можно скорость образования продуктов v из БП описать уравнением (1):

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]}{K_M \left(1 + \frac{[P_1]}{K_i^{\text{ФУК}}} + \frac{[P_2]}{K_i^{6-\text{АПК}}} \right) + [S] \left(1 + \frac{[P_2]}{K_i^{6-\text{АПК}}} + \frac{[S]}{K_s^{\text{БП}}} \right)}, \quad (1)$$

где $k_{\text{кат}}$ - эффективная величина константы скорости;

$[E]_0$ - концентрация фермента

или выразив через максимальную скорость (активность ИПА) -

$$V_M = k_{\text{кат}} [E]_0.$$

Приведенные концентрации обозначены: $[S]$ - БП, $[P_1]$ - ФУК, $[P]$ - 6-АПК. Выразая степень конверсии субстрата χ через концентрации продуктов при условии, где $[P_1] = [P_2]$, $\chi = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0} = \frac{[P]}{[S]_0}$ и учитывая закономерности, приведенные в статьях [3, 4], уравнение (2) можно представить в обобщенном виде (ур. 2), где коэффициенты превращаются в следующие функции (3, 4, 5):

$$v = \frac{V_M (1 - \chi)}{a + b\chi + c\chi^2}, \quad (2)$$

$$a = 1 + \frac{K_M}{[S]_0} + \frac{[S]_0}{K_s^{\text{БП}}}, \quad (3)$$

$$b = K_M \left(\frac{1}{K_i^{\text{ФУК}}} + \frac{1}{K_i^{6-\text{АПК}}} \right) + [S]_0 \left(\frac{1}{K_i^{6-\text{АПК}}} + \frac{2}{K_s^{\text{БП}}} \right) - 1, \quad (4)$$

$$c = [S]_0 \left(\frac{1}{K_s^{\text{БП}}} - \frac{1}{K_i^{6-\text{АПК}}} \right). \quad (5)$$

В конкретных условиях проведения гидролиза БП значения констант диссоциации могут быть определены либо анализом

полных кинетических кривых процесса, либо общепринятым методом начальных скоростей. В этом случае величины коэффициентов a, b и c могут быть вычислены по уравнениям (3-5). Например, при гидролизе ИПА, полученной включением фермента в ПААГ в присутствии бифункционального реагента с размерами частиц 0,2-0,4 мм, эффективные константы диссоциации имеют следующие значения:

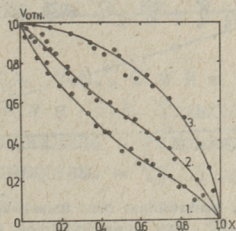
$$K_m = 3,9 \cdot 10^{-4} \text{ М}, K_i^{\text{Фук}} = 1,6 \cdot 10^{-3} \text{ М}, K_i^{6-\text{АПК}} = 0,15 \text{ М}, K_s^{\text{БП}} = 0,98 \text{ М}.$$

Делением уравнения (2) на коэффициент a получаем уравнение, выражающее зависимость относительной скорости $v_{\text{отн}} = \frac{v}{v_0}$ от степени конверсии субстрата

$$v_{\text{отн}} = \frac{1-x}{1+m_1x+m_2x^2}, \quad (6)$$

где $m_1 = b/a$, $m_2 = c/a$.

Численные решения уравнения (2) при различных концентрациях БП показывают, что расчетные данные хорошо совпадают с экспериментально найденными данными в изучаемых нами пределах концентрации БП до 0,3 М (фиг. 3).



Фиг. 3. Относительная скорость гидролиза бензилпенициллина с помощью иммобилизованной пенициллинамидазы в зависимости от степени конверсии при различных исходных концентрациях. Сплошные линии кривых найдены по следующим уравнениям (ур. 1).

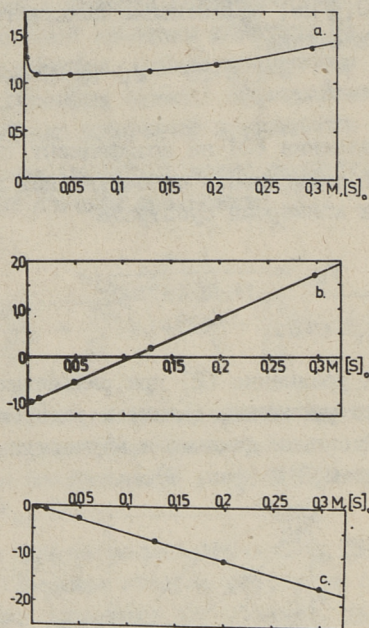
$$1 - v_{\text{отн}} = \frac{1-x}{1+1,2x-1,27x^2}, \quad \text{при } [S]_0 = 0,3 \text{ М};$$

$$2 - v_{\text{отн}} = \frac{1-x}{1+0,118x-0,64x^2}, \quad \text{при } [S]_0 = 0,13 \text{ М};$$

$$3 - v_{\text{отн}} = \frac{1-x}{1-0,78x-0,006x^2}, \quad \text{при } [S]_0 = 0,0015 \text{ М}.$$

Анализ из уравнений (4) и (5) зависимостей b и c показывает, что в используемом интервале концентраций БП эти коэффициенты линейно зависят от концентрации субстрата

(фиг. 4). Зависимость коэффициента a проходит через минимальное значение и резко возрастает в условиях, когда $[S]_0 \approx K_M$.



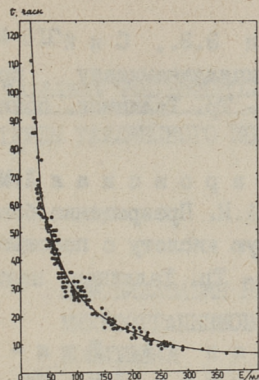
Фиг. 4. Расчетные кривые, найденные для иммобилизованной пенициллин-амидазы по ур. (3-5) для зависимостей коэффициентов a , b и c от концентрации бензилпенициллина.

С прикладной точки зрения важным параметром при гидролизе БП является общее время проведения процесса. После интегрирования уравнения (2) в начальных условиях $\tau_0 = 0$ и $X = 0$, получаем (6):

$$\frac{V_m \tau}{[S]_0} = -(a+b+c) \ln(1-X) - (b+c)X - \frac{c}{2}X^2, \quad (6)$$

где τ - общая продолжительность гидролиза.

При гидролизе 5 %-ного раствора БП (130 мМ) целью может быть, например, достижение 90 %-ной конверсии ($X = 0,90$).



Фиг. 5.

Влияние концентрации иммобилизованной пенициллинамидазы на время продолжительности гидролиза 5% бензилпенициллина в реакторе с перемешиванием. Непрерывная линия – теоретическая кривая, найденная по уравнению (7).

В этом случае необходимая продолжительность реакции τ^* может быть вычислена по уравнению (7), легко получаемому из уравнения (6) после введения численных значений a, b и c .

$$\begin{aligned}\tau^* &= \text{const} \cdot [S]_0 / V_m = \\ &= 2,08 \cdot 130 / V_m = 271 / V_m.\end{aligned}\quad (7)$$

Как показали наши многочисленные опыты гидролиза 5 % БП с применением ИПА, уравнение (7) удовлетворительно описывает продолжительность гидролиза при различных активностях реактора (при различных количествах введенной ИПА).

Л и т е р а т у р а

1. М а н д е л ь М.О., С и й м е р Э.Х., К ё с т н е р А.И., К я р е м а К.А. Торможение ферментативного гидролиза бензилпенициллина в условиях применения иммобилизованной пенициллинамидазы. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1974, № 367, с. 9-13.

2. С и й м е р Э.Х., К р о с и н г В.А., М а н д е л ь М.О., К ё с т н е р А.И. О механизме ферментативных реакций, ингибируемых субстратом и продуктами. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1974, № 367, с. 3-7.

3. S i i m e r, E. Generalized rate equation for one-substrate enzymatic reactions. – Biotechn. Bioeng., 1978, vol. 20, pp. 1853-1864.

4. С и й м е р Э.Х. Кинетика односубстратных реакций. Сообщение I. Обобщенное кинетическое уравнение для формально двухступенчатых реакций. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. II-18.

5. Мандель М.О., Лепп Э.Э., Сиймер Э.Х. Влияние мономеров на пенициллинамидазу при включении из полиакриламидный гель. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. 55-63.

6. Клейнер Г.И., Елизаровская Л.М., Мандель М.О., Кёстнер А.И. Превращение бензилпенициллина в 6-аминопенициллановую кислоту с помощью иммобилизованной пенициллинамидазы. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1975, № 383, с. 31-41.

7. Березин И.В., Клесов А.А., Швядас В.-Ю.К., Ныс П.С., Савицкая Е.М.. Кинетика гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой. - Антибиотики, 1974, т. 19, № 10, с. 880-887.

M. Mandel

Kinetics of the Benzylpenicillin Hydrolysis

Using the Immobilized Penicillin Amidase

Summary

It has been shown that the hydrolysis of benzylpenicillin catalyzed by the immobilized penicillin amidase can be described by means of the generalized kinetic equation. On the basis of this equation the relative rate and the time of the reaction can be calculated.

The experimental data have been compared with the calculations.

К.А. Кивисилла, Х.Я. Киппер

ИММОБИЛИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
МИКРООРГАНИЗМОВ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ
НОСИТЕЛЯХ

Ферментные препараты, в том числе протеолитические ферменты микроорганизмов, находят все более широкое применение в медицине, в легкой, пищевой и фармацевтической промышленности, а также в сельском хозяйстве. Одним актуальным вопросом современной науки и техники является получение стандартных гидролизатов белковых веществ. В литературе описаны возможности получения гидролизатов казеина при помощи щелочных микробных ферментов [1-3]. Во многих случаях (например, в случае непрерывных процессов в специальных реакторах) более целесообразно было бы использование иммобилизованных форм этих ферментов.

Для гидролиза высокомолекулярных субстратов — белковых веществ — целесообразно использовать препараты протеаз, иммобилизованные на кремнеземные носители, удельная поверхность и размеры пор которых определены [4]. При этом первым существенным этапом является активация неорганического носителя. Для предотвращения инактивирующего влияния кремнеземного материала на протеазы, а также для увеличения механической устойчивости каркаса носителя и повышения реакционной способности поверхность пор можно покрывать пленкой активного водонерастворимого полимера [5-7].

Целью настоящей работы являлась разработка методов иммобилизации некоторых щелочных микробных протеаз на разных модифицированных полимерах кремнеземных носителей, а также изучение стабильности полученных препаратов.

Материалы и методы

В качестве носителей использовали макропористые кремнеземные материалы – силихром марки СХ-1,5 и силикагели марки МСА-1500 и МСА-2500 – производства Горьковского опытного завода ВНИИП.

Альдегидоэнзимохром марки С-400 – получен от ВНИИ люминофоров г. Ставрополя.

Пористое стекло (МПС 1600 ГХ) – получено от ВНИИ особо чистых биопрепаратов г. Ленинграда.

Модифицирование кремнеземных носителей разными полимерными смолами разработано в Таллинском политехническом институте в сотрудничестве с ВНИИ прикладной биохимии НПО "Биохимреактив". В качестве полимеров использовали эпоксидные и резольные смолы.

В качестве исходных ферментов использовали протомезентерин с удельной активностью 7330 нкат/г и протосубтилин Г 10х Вильнюсского ферментного завода с удельной активностью 183300 нкат/г и щелочная протеиназа Ладыжинского завода с удельной активностью 13830 нкат/г.

Протосубтилин Г 10х очищали хроматографией на сефадексе Г-50.

Определение протеолитической активности изучаемых ферментов проводили по модифицированному методу Ансона на 2 %-ном растворе казеина при pH 8,5 или 9,5 и температуре 30 °С. Иммунизацию ферментов проводили по способу, описанному в нашей ранней работе [8]. В данной работе фермент контактировали с носителем в течение 20 часов.

Стабильность препаратов оценивали по остаточной активности после промывки препаратов в колонке 2 %-ным субстратом в течение 24 часов при 22 °С.

Результаты и обсуждение

Основные результаты иммобилизации некоторых щелочных протеиназ микробального происхождения на модифицированных полимерами неорганических носителях приведены в таблице I.

Как видно из таблицы I, довольно высокие показатели иммобилизации достигнуты в случае иммобилизации щелочной

Результаты иммобилизации некоторых протеолитических ферментов
микроорганизмов на модифицированных силихромах

Характеристика носителя	Активирующий реагент	Фермент	Активность иммобилизован- ного препара- та, нкат/г	Выход ак- тивности, %	Активность по- сле промывки субстратом нкат/г	Активность по- сле промывки субстратом %
СХ-I,5, эпоксидная смола	ГА ^x	щелочная протей- наза	315	15,0	175	55,6
СХ-I,5, эпоксидная смола	ДЦА ^{xx}	щелочная протейназа	321,7	25,7	121,7	37,8
СХ-I,5, резольная смола	ГА	щелочная протейназа	493,3	40,4	156,7	31,8
СХ-I,5, резольная смола	п-бензохинон	щелочная протейназа	300	24,5	101,7	33,9
СХ-I,5, резольная смола	п-бензохинон	протомезентерин	236,7	72,1	161,7	68,3
СХ-I,5, резольная смола	п-бензохинон	протосубтилин Г IОх	125	17,7	106,7	85,4

^x ГА - глутаровый диальдегид

^{xx} ДЦА - диизоцианат адипиновой кислоты

протеиназы и протомезентерина. Высокие выходы активности и удовлетворительная стабильность иммобилизованных препаратов объясняются тем, что поверхность пористого неорганического материала покрыта высокоактивной полимерной пленкой, способной к реакции с белковыми макромолекулами, в частности, с первичными аминогруппами лизина. Можно предполагать, что полимерная пленка на носителе, с одной стороны, препятствует инактивирующему влиянию кремнеземного материала на фермент и с другой стороны, укрепляет каркас пористого материала (фиг. 1).

Для получения более активных препаратов протосубтилина Г 10х его очищали гель-хроматографически на сефадексе Г-50. Выход по активности фермента 90-95 %.

После отделения пигмента смесь активных фракций концентрировали при помощи прибора "Millipore", используя мембранный фильтр "PSAC". В ходе ультрафильтрации ферментный раствор в незначительной мере освободился от белковых фракций, молекулярный вес которых ниже, чем у ферментного комплекса. Протеолитическая активность раствора, прошедшего через ультрафильтр, практически равнялась нулю. В результате концентрации достигли повышения активности в 2,2-2,7 раза. После ультрафильтрации ферментный раствор лиофилизировали. При лиофилизации концентрированных растворов получены очищенные ферментные препараты с удельной активностью на 20-25 % больше, чем при лиофилизации неконцентрированных растворов.

В результате очистки удельная активность ферментного комплекса повышалась в 2,5-3,2 раза.



А



Б

Фиг. 1. Принципиальная схема связывания ферментов с поверхностью макропористых носителей; А - непосредственная активация поверхности; Б - связывание на открытых полимерах носителях.

Результаты иммобилизации протосубтилина Г 10х на различных кремнеземных носителях

Характеристика носителя	Активная группа или активизирующий реагент	Активность иммобилизованного препарата, нкат/г	Выход активности, %	Активность после промывки субстратом	
				нкат/г	%
МСА-1500, эпокси- дная смола	ГА	155	16,1	126,7	81,7
МСА-2500, эпокси- дная смола	ГА	170	17,6	138,3	81,4
МПС 1600 IX, эпок- сидная смола	ГА	225	14,0	91,7	40,8
ХМПС 1600 IX, эпоксидная смола	ГА	101,7	20,5	73,3	72,1
Альдетидоэнзимо- хром С-400	-CHO	151,7	16,4	68,3	45,0
СХ-1,5, эпоксидная смола	ГА	330	36,3	266,7	80,8
ХСХ-1,5, эпоксидная смола	ГА	210	49,2	160	76,2
СХ-1,5, эпоксидная смола	ГА	190	25,2	165	86,8
СХ-1,5, эпоксидная смола	п-бензохинон	180	23,9	131,7	73,2

Х иммобилизован неочищенный фермент

Как видно из данных таблицы 2, для получения высокоактивных препаратов целесообразной является иммобилизация очищенного протосубтилина Г 10х. При сравнении результатов иммобилизации на разных кремнеземистых материалах выявляется, что активность препаратов протосубтилина, иммобилизованного на модифицированном силохроме, превышает активность препаратов, полученных на модифицированном силикагеле или на пористом стекле. Это, по-видимому, связано с меньшей удельной поверхностью последних.

Из вышесказанного следует, что на основе кремнеземных материалов, модифицированных полимерами, можно получить довольно активные и стабильные иммобилизованные препараты протеолитических ферментов микроорганизмов, которые могут быть рекомендованы для гидролиза высокомолекулярных субстратов.

Л и т е р а т у р а

1. Поспелова В.В., Рахимова Н.Г., Ворошила Н.А. Ферментативный (протосубтилиновый) гидролизат казеина как основа питательных сред для изготовления бактериальных биопрепаратов. Тезисы докладов Второго всесоюзного совещания по ферментам микроорганизмов. Минск, 1978, часть II, с. II5.

2. Калашникова Н.А., Гребешова Р.Н. Виноградова И.Н. Микробные протеазы при получении сухих гидролизатов казеина. Тезисы докладов Второго всесоюзного совещания по ферментам микроорганизмов. Минск, 1978, часть II, с. I65.

3. Rutloff, H., Zickler, F., Behnke, U. Zur Gewinnung und Charakterisierung von Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris* für den Nahrungsgütersektor. — Abh. Akad. Wiss. DDR. Abt. Math. Naturwiss. Techn., 1978, N 1, S. 199.

4. Киппер Х.Я., Егоров Х.Р., Кивисилла К.А. Характеристика модифицированных полимерами неорганических носителей. — Тр. Таллинск. политех. ин-та, 1979, № 465, с. 33-39.

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

ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРОТЕАЗ НА КРЕМНЕЗЕМНЫХ МАТЕРИАЛАХ. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 29-34.

6. Pat. N 1480668 (Brit.). Inorganic materials coated with epoxy resins / Rhone-Poulence Industries; Meiller F. - 30.08.1974, 28.08.1975; Cl. C 01 B 33/12, C 01 F 7/02, C 08G59/10.

7. Pat. N 1342186 (Brit.). Enzyme complexes / Nestle S.A., 5.06.1972, 28.12.1973; Cl. C3H3, O8H 1/02.

8. 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. Получение активированных изоцианатами кремнеземных носителей для иммобилизации ферментов. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1976, № 402, с. 21-28.

K. Kivisilla, H. Kipper

Immobilization of Some Microbial Proteases

on Modified Siliceous Carriers

Summary

The immobilization of some microbial proteases (protosubtilin, protomesenterin and alcalic protease) to modified siliceous carriers have been investigated. Silochrome, sili-cogel and porous glass, modified with epoxy or phenolformaldehyde resins, have been used as carriers.

The best results have been obtained immobilizing the purified protosubtilin to the silochrome, modified with epoxy resin.

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ГИДРОЛИЗА АЦЕТИЛПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АМИНОАЦИЛАЗЫ

Аминоацилаза (КФ.3.5.1.14) является ферментом, который применяется для разделения различных рацемических смесей аминокислот [1, 2]. Аминоацилаза иммобилизована на разных носителях, применяя разные способы [3, 4]. Для целесообразного выбора условий работы с препаратами в технологических процессах необходимо иметь количественную характеристику глубокого гидролиза раствора субстрата. Для большинства ферментативных реакций характерно ингибирование продуктами реакции и субстратом.

Целью настоящей работы мы ставили выяснение количественной характеристики кинетики глубокого гидролиза некоторых типичных субстратов нативной и иммобилизованной аминоацилазой.

Материалы и методы

Применяли препарат аминоацилазы из свиных почек производства Олайнского завода химреактивов с активностью 1000 Е/г. Иммобилизацию фермента в полиакриламидный гель проводили по разработанной нами методике [5]. Исследован гидролиз растворов ацетил-D,L-метионина, ацетил-D, L-валина и ацетил-D,L-аланина. Данные субстраты были синтезированы нами ацетилированием аминокислоты с помощью уксусного ангидрида. Растворы субстратов приготовлены в 0,1-мольном фосфатном буфере с pH 7,3.

Опыты проводили в реакторе перемешивания (объемом 100 мл) с активным ротором периодического действия при температуре 37 °C. В реактор вводили 2,5-3,0 г иммобилизованной ацилазы. За скоростью процесса наблюдали по осво-

бождению L-аминокислоты. Концентрация образующейся аминокислоты определялась нингидринным реактивом и спектрофотометрированием при 570 нм.

Скорость гидролиза v определялась графическим дифференцированием зависимости концентрации L-аминокислоты от продолжительности реакции. Начальную скорость V_0 вычисляли экстраполяцией по методу [6].

Результаты и обсуждение

Исследовали кинетику глубокого гидролиза ацетил-D, L-метионина, ацетил-D, L-валина, и ацетил-D, L-аланина в реакторе перемешивания как с иммобилизованной, так и нативной аминоксилазой.

Членом нашего коллектива Э.Х. Сиймером ранее доказано, что для односубстратных ферментативных реакций при возможном ингибировании продуктами и субстратом действительно обобщенное кинетическое уравнение [7]:

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

где v - скорость реакции;

V_m - максимальная скорость реакции;

X - степень конверсии субстрата;

a, b, c - коэффициенты, зависящие от констант ингибирования и исходной концентрации субстрата.

Так как начальная скорость (при $X = 0$) равна $\frac{V_m}{a}$, то уравнение (I) можно преобразовать для расчета относительной скорости $V_{отн}$:

$$V_{отн} = \frac{v}{V_0} = \frac{1-X}{1 + m_1X + m_2X^2}. \quad (2)$$

Для установления значений m_1 и m_2 из уравнения (2) существует несколько способов. Известно, что при отсутствии ингибирования субстратом и при условии $[S_0] \gg K_m$ коэффициенты m_1 и m_2 линейно зависят от $[S_0]$:

$$m_1 = e + f[S_0], \quad (3)$$

$$m_2 = g[S_0]. \quad (4)$$

В этом случае уравнение (2) превращается в вид

$$V_{отн} = \frac{1-x}{1+(e+f[S_0])x+g[S_0]x^2} \quad (5)$$

Из экспериментальных данных зависимости концентрации продукта от времени путем графического дифференцирования и путем несложного расчета найдены значения относительной скорости для реакции гидролиза ацетилметионина и ацетилвалина, катализируемых нативной аминоксилазой.

Из полученных при трех-четырех разных концентрациях субстрата кинетических кривых с помощью предложенного ранее статистического анализа [8] найдены основные коэффициенты e , f , g по уравнению (5), которые приведены в таблице I. По этим коэффициентам можно рассчитать зависимость от концентрации субстрата коэффициенты m_1 и m_2 из уравнения (3, 4) для любых концентраций субстрата.

Т а б л и ц а I

Значения коэффициентов e, f и g, m_1, m_2 для
нативной аминоксилазы

Показатели	Концентрация субстрата	Субстраты	
		ацетилметионин	ацетилвалин

Основные коэффициенты:

e	-	-0,99	+1,45
f	-	+0,44	+7,17
g	-	+1,53	-9,59

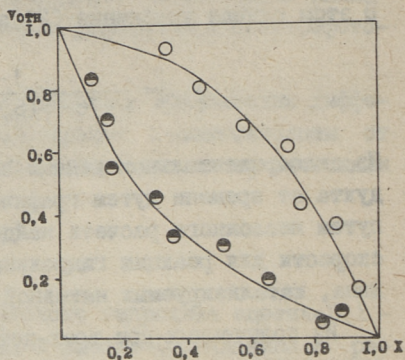
Зависимые от концентрации субстрата коэффициенты:

m_1	0,2	-0,90	-2,88
m_2		0,30	1,92
m_1	0,4	-0,81	-
m_2		0,61	
m_1	0,5	-	-5,03
m_2			4,80

По этим коэффициентам (табл. I) рассчитаны сплошными линиями изображенные на фиг. I кривые.

Как видно из фигуры I, расчетные кривые, найденные по уравнению (2) с использованием величин m_1 и m_2 , удовлетворительно описывают функцию относительной скорости.

Анализ общего хода кинетических кривых и сравнение значений основных кинетических констант показывают, что в случае обоих субстратов наблюдается значительное ингибирование продуктами. В случае гидролиза ацетилвалина ингибирование является существенным (демонстрируется отрицательной кривизной на графике I).



Фиг. 1. Относительная скорость реакции при гидролизе 0,2-молярного ацетил- D,L -метионина (○) и 0,2-молярного ацетил- D,L -валина (●) в зависимости от степени конверсии с помощью нативной аминокислотазы.

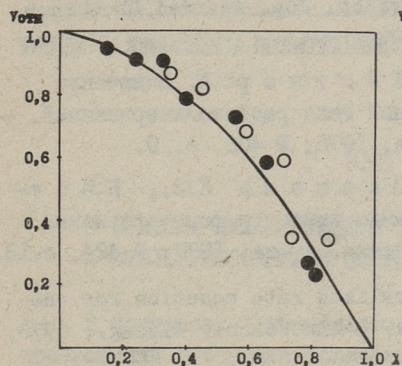
Для получения сравнительных данных провели исследование кинетики глубокого гидролиза ацетилметионина и ацетилвалина с помощью иммобилизованной аминокислотазы.

Основные результаты приведены на фигурах 2 и 3, из которых видно, что изображенные кривые сходны с соответствующими кривыми, которые были получены указанными субстратами при использовании нативного фермента. Следовательно, при иммобилизации аминокислотазы в полиакриламидный гель незначительно меняется сходство фермента с его продуктами.

Таким образом, можно описать кинетику глубокого гидролиза ацетиламинокислот, гидролизующих нативной или иммобилизованной аминокислотазой уравнением Э.Х. Сиймера, а при разных субстратах кинетика гидролиза является довольно различной. Аминокислотаза проявляет довольно различное сходство с разными аминокислотами — продуктами.

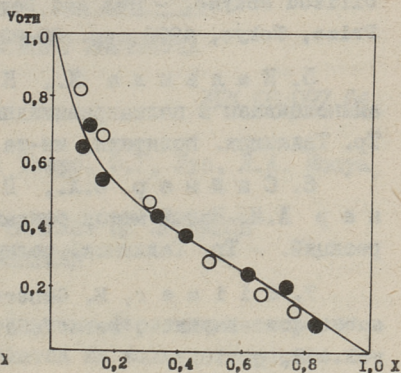
Полученные данные следует учитывать при практическом применении аминокислотазы для гидролиза аминокислот. Таким образом, например, при гидролизе ацетилвалина необходимо

строже следить за отделением продукта от реакционной среды, чем при ацетилаланине или ацетилметионине.



Фиг. 2. Относительная скорость реакции при гидролизе 0,2-молярного ацетил-DL-метионина в зависимости от степени конверсии.

● - с помощью нативной аминокислоты,
 ○ - с помощью иммобилизованной аминокислоты.



Фиг. 3. Относительная скорость реакции при гидролизе 0,2-молярного ацетил-D,L-валина в зависимости от степени конверсии.

● - с помощью нативной аминокислоты,
 ○ - с помощью иммобилизованной аминокислоты.

Автор выражает благодарность Э.Х. Сиймеру за оказанную помощь при теоретической обработке экспериментальных данных.

Л и т е р а т у р а

1. Chibata, I. Continuous optical resolution of acetyl-D,L-amino acids by immobilized aminoacylases. - Proc. Int. Symp. Conversion and Manuf. Foodstuffs Microorg. Kyoto, Tokyo, 1972, pp. 75-77.

2. Chibata, I., Tosa, T. Continuous production of L-aminoacids by immobilized microbial cells. - Shokulin Kogyo, 1973, vol. 16, N 18, pp. 66-72.

3. Hermann, P., Willhardt, I. A method for the immobilization of aminoacylase. - 12-th FEBS Meet., Dresden, 1978. Abstr. N 3842.

4. Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T. Production of optically active amino acids by immobilized enzyme. - Res. and Develop. Jap. Awarded Okochinum. Prize, Tokyo, 1973, pp. 80-82.

5. Кальюла Х., Кёстнер А. Включение аминоклазы в полиакриламидный гель радиополимеризацией. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1976, № 402, с. 9.

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

7. Siimer, E. Generalized rate equation for one-substrate enzymatic reactions. - Biotechnol. Bioeng., 1978, vol. 12, p. 1853.

8. Сиймер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение У. Стационарная кинетика в проточных реакторах с перемешиванием. См. наст. сб., с. 15.

H. Aruniit

Investigation of Reaction Characteristics of
Acylated D,L-amino Acids Hydrolysis with
Native and Immobilized Aminoacylases

Summary

The kinetics of hydrolysis of acetyl-D,L-methionine and acetyl-D,L-valine by native and immobilized aminoacylases at 37 °C in laboratory scale batch has been investigated. The experimental results obtained may well be described by the equation of E. Siimer. This equation has been suggested to describe the integral kinetics of enzymatic reactions. The experiments have shown that the products formed in the hydrolysis of acylated D,L-amino acids may serve as inhibitors whereas L-valine has proved to be a stronger inhibitor than L-methionine.

Э.Н. Теаро, Э.Г. Уус, Л.А. Иосуа

О ВЛИЯНИИ ПУЛЬСИРУЮЩЕГО ВАКУУМА НА ПРОЦЕССЫ
С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

В процессах с иммобилизованными ферментами скорость превращения субстрата определяется не только скоростью химической реакции, но и скоростью диффузии субстрата из общей реакционной массы к поверхности твердого катализатора (внешняя диффузия) и диффузией внутри зерен катализатора (внутренняя диффузия). В случае тонкопористых катализаторов и больших молекулярных масс субстрата скорость протекания процесса, как правило, определяется диффузионными сопротивлениями, а не кинетикой реакции.

Диффузионное сопротивление реакции зависит от гидродинамического режима в реакционном аппарате и свойств катализатора.

В проточных барботажных реакторах при скорости воздуха свыше 6 см в минуту ($\text{см}^3/\text{см}^2 \cdot \text{мин}$) внешнедиффузионное сопротивление практически отсутствует [1].

Внутريدиффузионное сопротивление зависит в основном от структуры катализатора (носителя), т.е. от размеров зерен и пор и свойств субстрата.

При рассмотрении вопросов внутريدиффузионного сопротивления твердых катализаторов целесообразно выделить сопротивление капилляров.

Такая постановка оказывается целесообразной потому, что большинство катализаторов с ферментами, иммобилизованными на неорганических носителях или включенных в матрицы гелеобразных продуктов, можно рассматривать как гранулы, пронизанные порами или микрокапиллярами.

Гидродинамические условия движения субстратов около поверхности таких гранул и внутри их пор или капилляров при этом всегда будут существенно различными, особенно, если радиус капилляров меньше толщины пограничного слоя. Различными должны быть и способы, позволяющие интенсифицировать процессы массопередачи у поверхности гранул и внутри пор катализатора.

Воздействие на движение жидкости внутри капилляров пористых тел до сих пор мало изучено. Это движение обусловлено, очевидно, в обычных условиях только молекулярным механизмом, так как любые турбулентные пульсации внешней среды затухают уже в гидродинамическом пограничном слое и не достигают поверхности твердого тела.

Тем более является еще менее вероятной возможность воздействовать на движение жидкости внутри капилляров зерен путем обычного механического перемешивания жидкости.

Воздействие на движение жидкости, заключенной в капилляры, должно лежать на молекулярном уровне или вызываться силами, возникающими внутри самих капилляров.

Обзор возможных видов движения внутри капиллярно-пористых тел приводится в монографии П.Г. Романкова [2], причем подчеркивается, что различные физические эффекты, обуславливающие это движение, действуют одновременно.

На первое место по своей значимости ставится молекулярная диффузия, описываемая законом Фика.

При наличии размерности температур и давлений в капиллярно-пористых телах возникают дополнительные виды переноса.

В пористых телах всегда имеется некоторое количество заземленного в капилляре неконденсирующегося газа (воздуха), объем которого при изменении температуры будет меняться, в результате чего жидкость в капилляре проталкивается расширяющимся газом в направлении уменьшения температуры.

Анализ этих видов движения жидкости в капиллярно-пористых телах показывает, что имеется реальная возможность использовать некоторые из них для интенсификации продвижения субстрата внутри зерен катализатора.

Наиболее реальным является использование расширения заземленного в капиллярах газа. Однако его расширение более удобно осуществлять не за счет изменения температуры, которая при ферментативных реакциях обычно строго регламентируется, а за счет изменения внешнего давления.

Оказываемое на газ воздействие должно быть знакопеременным во времени и вслед за расширением газа, выталкивающим субстрат из капилляра, должно следовать его сжатие и всасывание жидкости в капилляр.

Таким образом, необходима пульсация внешнего давления системы субстрат-катализатор.

О положительном эффекте применения переменного давления для интенсификации процессов в системах с твердой фазой свидетельствует его успешное использование в процессах кристаллизации [3] и выращивания микроорганизмов [4, 5].

Методы и материалы

Для проверки возможности использования пульсации давления для интенсификации реакции с иммобилизованными ферментами были проведены лабораторные исследования.

В лабораторных условиях изменение внешнего давления более удобно производить за счет создания разрежения в системе, хотя в промышленности может быть применено и избыточное давление.

Применение вакуума имеет еще одну положительную сторону. При понижении давления возможно закипание жидкости при температуре реакции. Кипение, как известно, способствует интенсификации многих гетерогенных процессов, так как приводит к интенсивному перемешиванию. Известно также, что при кипении пузырьки пара возникают всегда на центрах парообразования, роль которых выполняют шероховатые поверхности. Поэтому есть основание полагать, что пузырьки пара будут зарождаться на зернах катализатора и, отрываясь от них, будут разрушаться и турбулизировать пограничный гидродинамический и диффузионный слой, способствуя интенсификации процесса. Возможно при этом образование пузырьков пара и внутри капилляров, что будет создавать вышеупомянутое пульсационное действие.

Для проведения исследований была создана установка, которая состояла из двух реакционных сосудов (трехгорлых круглодонных колб), закрепленных в держателях взбалтывающего устройства и помещенных в два различных термостата, температура в которых независимо поддерживалась самостоятельными системами регулирования. Один сосуд сообщался через обратный холодильник с атмосферой. Второй сосуд через обратный холодильник подключался к системе пульсирующего вакуума, которая состояла из вакуумнасоса, ресивера и электромагнитных клапанов для соединения вакуумной системы с атмосферой или реакционным сосудом. Управление электромагнитными клапанами осуществлялось от командно-электрического прибора КЭП-12У, позволяющего изменять в широких пределах частоту и амплитуду колебания вакуума в реакционном сосуде.

Установка позволяла проводить реакцию с иммобилизованными ферментами в колбах при неподвижном катализаторе или при строго одинаковых условиях его механического перемешивания, создавать одинаковые средние температурные условия в сосудах, отбирать пробы субстрата для исследования скорости превращения в зависимости от условий проведения реакции.

Исследование интенсификации процессов с иммобилизованными ферментами при действии пульсирующего вакуума проводилось на примере гидролиза казеина и конверсии лактозы.

Гидролиз казеина проводился при помощи панкреатина, иммобилизованного на силихроме. Активность катализатора составляла 9-10 ед. на г.

Для экспериментов бралось 1,5 г катализатора на 100 мл 2 %-ного раствора казеина. Глубина гидролиза определялась через прирост содержания аминного азота, определяемого по методу формального титрования [6].

Для конверсии лактозы использовалась в качестве катализатора лактаза из *Curvularia inaequalis*, иммобилизованная на силанизированном силихроме или включенная в полиакриламидный гель.

Активность первого препарата составляла 46 ед. на г, второго 10 ед. на г (мкмоль/г мин.).

В качестве субстрата использовался 5 %-ный раствор лактозы в 0,2-молярном ацетатном буфере с рН 4,2. Температура гидролиза была 50 °С.

Степень конверсии определялась по количеству глюкозы, образовавшейся в процессе расщепления лактозы [7].

Вышеуказанные параметры проведения процессов гидролиза казеина и конверсии лактозы были выбраны на основе ранее выполненных на кафедре технологии пищевых продуктов ТПИ исследований [8, 9].

Для проведения опытов в реакционные сосуды экспериментальной установки помещалось одинаковое количество катализатора (от 1,5 до 7 г в различных опытах), добавлялось равное количество субстрата (100 мл) и включалось взбалтывающее устройство и вакуумная система. Температура в сосуде под вакуумом выбиралась такой, чтобы средняя температура во времени была бы равной температуре в сосуде сравнения, так как при закипании раствора под вакуумом происходило быстрое понижение температуры на 5-10 °С ввиду парообразования. Из сосудов в ходе реакции отбирались пробы субстрата и в них определялись соответственно содержание аминного азота при гидролизе казеина или глюкозы при конверсии лактозы.

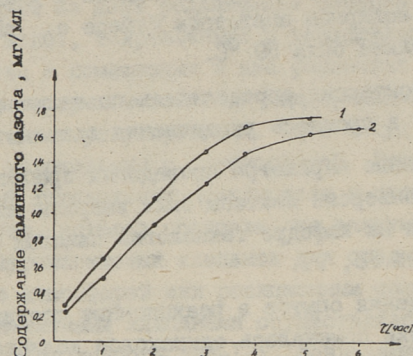
Результаты и обсуждение

Результаты некоторых выполненных экспериментов и их условия приводятся на фигурах 1 и 2.

Из приведенных данных видно, что при перемешивании катализатора с субстратом под пульсирующим вакуумом, полученные результаты всегда превосходят аналогичные показатели под атмосферным давлением.

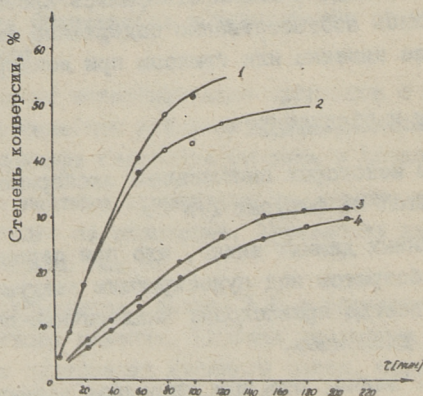
Из фигуры 1 видно, что при гидролизе казеина в пульсирующем вакууме содержание аминного азота доходит до 1,7 мг на мл субстрата в течение 3,5 часа. Для получения такого же количества аминного азота в субстрате под атмосферным давлением требуется около 6 часов.

При превращении раствора лактозы (фиг. 2) иммобилизованной β -галактозидазой в пульсирующем вакууме в течение 85 мин., степень конверсии доходит до 50 % (кривая 1), при



Фиг. 1. Изменение содержания аминокислотного азота при гидролизе казеина панкреатиним иммобилизованным на силикохроме с активностью 9,0 Е/Г (1,5 г катализатора на 100 мл 2-процентного раствора казеина).

- 1 - под пульсирующим вакуумом (вакуум 70 с, кипение 55 с, атмосферное давление 120 с) при 32-38 °С;
 2 - под атмосферным давлением при 35 °С.



Фиг. 2. Конверсия лактозы. 1,2 - количество катализатора 3,85 г с активностью 46 Е/г на 100 мл 5-процентного раствора лактозы;

3,4 - количество гелевого катализатора 3,3 г с активностью 10 Е/г на 100 мл 5-процентного раствора лактозы.

- 1 - под пульсирующим вакуумом (вакуум 28 с, кипение 15 с, атмосферное давление 44 с) при 42-51 °С;
 2 - под атмосферным давлением при 50 °С;
 3 - под пульсирующим вакуумом (вакуум 22 с, кипение 12 с, атмосферное давление 58 с) при 39-51 °С;
 4 - под атмосферным давлением при 50 °С.

атмосферном давлении для этого требуется 180 минут (кривая 2). При использовании гель-катализатора продолжительность реакций для достижения степени конверсии 30 % составляет соответственно 150 и 220 минут (кривые 3 и 4).

Применение пульсирующего вакуума, таким образом, позволяет интенсифицировать процесс и, следовательно, уменьшить в 1,5-2 раза время реакции, необходимое для достижения заданной степени превращения.

Описанное выше явление открывает принципиально новые возможности создания эффективной аппаратуры, в которой перемешивание осуществлялось бы пульсирующим вакуумом.

Л и т е р а т у р а

1. T o d a, K., S h o d a, M. Sucrose inversion by immobilized yeast cells in a complete mixing reactor. - Biotechnol. and Bioeng., 1955, vol. 17, pp. 481-497.

2. Романков П.Г., Рашковская Н.В., Фролов В.Ф. Массообменные процессы химической технологии. Л., Химия, 1976.

3. Штангиев В.О., Гулый И.С., Бажал И.Г., Семеновский О.Н. Устройство для создания колебания давления вторичного пара в вакуум-аппарате кристаллизатора. А.с. СССР № 523934. CI3 I/02. Заявл. 01.07.74. БИ, 1976, № 26, 05.08.76.

4. Смолин Б.И., Горячев В.И. Установка для выращивания микроорганизмов. А.с. СССР № 734256. CI2B I/10, заявл. 13.02.78. БИ, 1980, № 18, 15.05.80.

5. B a u e r, P. Method of converting liquid microbiological substrate and apparatus for carrying out the method. U.S. Patent N 4126517. I95-I09, заявл. 19.09.74, Off.Gaz., 1978, v. 976, N 3.

6. Бауер К. Анализ органических соединений. М., Иностран. лит. 1953, с. 270.

7. Шербухин В.Д., Миронова Л.Н., Кондырева А.В., Грюнер В.С. Определение глюкозы в паточке глюкооксидазным методом и использованием ферроцианида калия. Прикладная биохимия и микробиология, 1970, т.6, с. 467.

8. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И., Летунова Е.В., Тихомирова А.С. Гидролиз лактозы иммобилизованной β -галактозидазой. Прикладная биохимия и микробиология. 1976, т. 12, с. 217.

9. Кёстнер А.И., Паппель К.Э., Фениксова Р.В. Получение и свойства иммобилизованной β -галактозидазы. Прикладная биохимия и микробиология. 1974, т. 10, вып. 6, с. 851-855.

E. Tearo, E. Uus, L. Josua

The Influence of Pulsating Vacuum on the
Processes with Immobilized Enzymes

Summary

In the present paper some ways to promote the movement of liquids inside the pores and capillaries of fine particulate catalysts are discussed.

The influence of pulsating vacuum on the hydrolysis of casein and lactose with immobilized pancreatine and β -galactosidase accordingly has been tested.

It has been observed that in pulsating vacuum the reaction rate with enzymes, immobilized to porous siliceous carrier or entrapped into polyacrylamide gel, may be increased twofold as compared with the same reactions at the normal pressure.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА ОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ

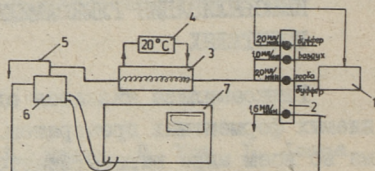
Глюкоамилаза является одним из наиболее широко применяемых ферментных препаратов. С ее помощью в настоящее время во всем мире вырабатывается свыше 6 млн. тонн глюкозы в год [1]. До настоящего времени этот фермент применяется главным образом в растворимом виде. Переход от нативной к иммобилизованной форме позволил бы сэкономить значительное количество этого фермента. Поэтому иммобилизации этого фермента посвящено очень много работ. Удовлетворяющий всем технологическим требованиям способ иммобилизации глюкоамилазы до сих пор не разработан. Можно предполагать, что иммобилизация на дешевых органических носителях могла бы быть целесообразной при создании технологического катализатора на основе глюкоамилазы. Это предположение подтверждается тем, что известный для переработки фермент глюкоизомераза чаще всего иммобилизуется именно этим способом [2].

Целью настоящей работы мы ставили исследование возможностей иммобилизации глюкоамилазы на целлюлозе и с помощью поперечной сшивки с желатином.

Материалы и методы

В работе применялся промышленный препарат глюкоамилазы из *Aspergillus Niger* производства фирмы "Ново" (Дания) под фирменным названием "Amyloglucosidase Novo 150". В работе был применен исходный препарат, а также очищенный нами осаждением этиловым спиртом препарат. В ходе спиртового осаждения мы получили растворы этого фермента с содержанием белка около 80 г/л и удельной активностью 880 Е/мл. В качестве носителей использовалась диэтиламиноцеллюлоза и желатин производства фирмы "Реанал" (Венгрия). Для связыва-

ния ферментов использовался 25 % раствор глутарового альдегида производства фирмы "Реанал" (Венгрия). В качестве субстратов фермента применялись растворы малтодекстрина фирмы "Майзена" и растворы растворимого крахмала фирмы "Мерк" (ФРГ). Активность препарата определялась на растворах субстратов с концентрацией 5 %, при pH 4,2, при температуре 20 и 50 °C. Активности препаратов определялись колориметрическим способом [3] или с помощью ферментного электрода [4]. Применяемый ферментный электрод представлен кафедрой аналитической химии Будапештского технического университета. Для ускорения анализов ферментный электрод был сконструирован автоматической системой анализа "Контифло". Схема установки определения активности приведена на фиг. 1.



Фиг. 1. Схема исследовательской аппаратуры
1 - распределитель проб,
2 - перист. насос,
3 - термост. спираль,
4 - термостат,
5 - трубка для отвода воздуха,
6 - ферментный электрод,
7 - полярограф,

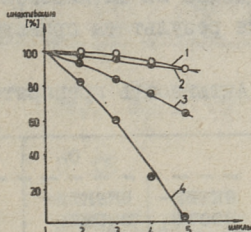
Гликоамилазу иммобилизовали ионообменной адсорбцией на ДЭАЭ-целлюлозе. Адсорбцию проводили в фосфатном буфере, pH 7,0 в течение 30 мин., при температуре 20 °C. Получаемый продукт промывали фосфатным буфером для удаления несвязанного фермента. Для повышения активностей получаемых препаратов полученные материалы обрабатывали раствором глутарового альдегида в течение 1 часа при тех же буферах. С целью улучшения механических показателей получаемых препаратов были проведены опыты высушивания препаратов адсорбционно связанного фермента. Сушку препаратов проводили при комнатной температуре и полученные сухие препараты обрабатывали глутаровым альдегидом по вышеизложенному методу. Испытывали также модификацию адсорбционно связанного фермента путем обработки раствором желатина. Для этого горячий раствор желатина охлаждали до комнатной температуры и перемешивали с адсорбционно связанным ферментом, выдерживая его при 2 °C до остуживания желатина. Полученная таким образом масса была формирована экструзией и высушена при комнатной температуре.

Вся экспериментальная работа проведена на кафедре сельскохозяйственной химии Будапештского технического университета в рамках программы научного сотрудничества между Таллинским политехническим институтом и Будапештским техническим университетом.

Результаты и их обсуждение

В первой стадии работы исследовали получение и применение иммобилизованной глюкоамилазы, связанной с носителем только силами ионной адсорбции. Для этого в вышеописанных условиях глюкоамилазу связывали с ДЕАЭ-целлюлозой. Полученный препарат имел активность около 100 Е/г влажного носителя при содержании сухих веществ в препарате 22 %. В результате адсорбции связывался 51 % от исходного фермента. Результаты иммобилизации можно считать удовлетворительными. Однако адсорбированный фермент при обработке в производственных условиях концентрации субстрата довольно быстро снижается.

Поэтому в дальнейшем нами были предприняты попытки стабилизировать полученный препарат высушиванием, а также обработкой глутаровым альдегидом и растворами желатина. С целью изучения возможностей стабилизации иммобилизованного фермента путем сушки полученный адсорбционно связанный препарат высушивали при комнатной температуре. Для сравнения была проведена также сушка растворимого фермента после перемешивания нейтрального целлюлозного порошка. Для этого навеску 1 г адсорбционно связанного фермента суспендировали в 0,01 М ацетатном буфере с pH 4,2, добавляли разные концентрации аминокетилевого эфира ДЕАЭ-целлюлозы и высушивали



Фиг. 2. Стабильность адсорбционного связанного и обработанного с глутаровым альдегидом препарата

глут. альдегидом
обработанный препарат

1. ○ (конц. субстр. 100 г л⁻¹),
2. ○ (конц. субстр. 300 г л⁻¹),
3. ● ионически связ. глюкоамилаза (конц. субстр. 100 г л⁻¹),
4. ● (конц. субстр. 300 г л⁻¹).

при комнатной температуре. Всушенные препараты обрабатывали глутаровым альдегидом по вышеописанному методу.

Применялась также стабилизация препарата с помощью желатина. Для этого свежеприготовленный раствор желатина охлаждали до комнатной температуры, добавляли при перемешивании адсорбционно связанный препарат и аминокпроизводные и выдерживали при 2 °С до полного студнеобразования. Студнеобразный продукт был экструдирован через отверстие с диаметром 2 мм и высушен при комнатной температуре.

Для характеристики воздействия сушки на препараты была определена их активность на субстрате при 20–50 °С. Полученные результаты приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

Активность препаратов при 20 °С и 50 °С

Преп.	20 °С		50 °С		50 °С / (-) 20 °С
	актив- ность, ($\mu\text{mol} \cdot \text{I}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$)	инактив- ация, (%)	актив- ность ($\mu\text{mol} \cdot \text{I}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$)	инактив- ация, (%)	
882,8	0		3089,8	0	3,5
865,1	2		3058,9	1	3,5
541,2	38,7		1856,9	39,9	3,4
474,7	0		674,1	0	1,4
115,7	75,6		164,5	75,7	1,4

Приведенные результаты показывают, что смешивание раствора фермента с нейтральной целлюлозой не меняет ее активности. Сушка такого препарата приводит к снижению активности на 38–40 % без изменения соотношения активности при разных температурах. При сушке адсорбционно связанного фермента наблюдается гораздо большая инактивация. Кроме того, нужно отметить, что адсорбционное связывание фермента снижает относительную активность фермента при повышенных температурах (50 °С). На основе полученных результатов нельзя рекомендовать сушку адсорбционно связанного фермента для стабилизации этого препарата.

В следующих опытах была исследована стабилизация адсорбционно связанного фермента под действием глутарового

альдегида. Для этого адсорбционно связанный фермент был обработан глутаровым альдегидом по вышеописанной методике с последующей сушкой при комнатной температуре. Для определения стабильности этих препаратов были проведены опыты повторного гидролиза субстрата с двумя разными концентрациями. Результаты этих опытов приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2
Стабильность иммобилизованной глюкоамилазы

Препарат	Конц. субстр. гр. л ⁻¹	Глюкоза мг. мл ⁻¹				
		Ц и к л ы				
		I	2	3	4	5
Ионически связанный фермент	100	42,6	39,8	36,1	31,0	27,8
Глутаровым альдегидом обработанный препарат	100	12,8	12,6	12,6	11,9	11,5
Ионически связанный фермент	300	110,8	103,7	67,0	29,6	5,4
Глутаровым альдегидом обработанный препарат	300	35,4	34,7	33,5	32,6	31,3

Эти проведенные опыты показывают, что необработанный глутаровым альдегидом адсорбционно связанный фермент довольно быстро смывается с носителя. В частности, это проявляется при концентрации субстрата 300 г/л. Обработка глутаровым альдегидом значительно повышает стабильность препаратов. После пяти циклов работы инактивация препаратов не составляет более 10 %. На основе этих обнадеживающих результатов можно принципиально рекомендовать шивку глутаровым альдегидом адсорбционно связанного фермента. Однако значительная потеря активности при шивке и сушке полученного препарата (70 %) заставляет нас испытать дополнительные средства для стабилизации исследуемого фермента. В этих целях были использованы аминные дериваты ДЕАЭ-целлюлозы и желатина. Результаты опытов приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Исследование влияния добавленных веществ

ДЕАЭ целл. (гр)	ДЕАЭ целл.- амин (гр)	Жела- тин (гр)	Сушк а		I мл.гр ⁻¹ акт.	глут.ал ост.акт.
			акт.	ост.акт.		
I,0	-	-	115,7	24,1	38,9	8
I,0	0,05	-	129,2	26,9	13,8	28
I,0	0,10	-	127,2	26,9	15,4	3,1
I,0	0,15	-	125,5	25,9	18,6	3,4
I,0	0,20	-	125,3	26,1	22,0	4,0
I,0	0,05	0,05	33,6	7,1	11,2	2,4
I,0	0,10	0,10	35,8	7,5	16,1	3,1
I,0	0,15	0,15	43,7	9,3	18,7	3,4
I,0	0,20	0,20	45,4	9,7	20,3	3,7

В результате добавления разных количеств аминокпроизводных целлюлозы практически все препараты имели одинаковую активность ($\sim 25\%$), а инактивацию вызывала главным образом сушка препаратов.

При одновременном добавлении желатина и этиленимин-производного ДЕАЭ-целлюлозы экструзия и сушка препарата вызвали снижение выявляемой активности фермента почти на 60-70 %. Причина этого состоит вероятно в том, что при перемешивании компонентов и их экструзии желатина покрывает носитель в виде тонкой пленки и таким образом, препятствует диффузии молекул субстрата к связанному ферменту. Последующая обработка препаратов глутаровым альдегидом дополнительно уменьшает их активность. Сравнивая результаты, можно сказать, что ожидаемый эффект не достигнут. Активность максимальна у препаратов, не содержащих добавочных веществ. Несомненно, что с увеличением концентрации желатина и аминокпроизводных целлюлозы в препаратах увеличивается остаточная активность, но введение инертных аминных групп не увеличивало в заметной степени активности иммобилизованных ферментных препаратов. Также можно сказать, что механические свойства, экструдированность и форма препаратов с желатином существенно лучше чем без неё.

Используя полученные результаты в следующих сериях опытов исследовалась оптимизация условий иммобилизации, в ходе которых изменялась концентрация бифункционального реагента (глутарового альдегида), количество участвующих в реакции аминных групп и концентрация желатина.

Использовался связанный на ДЕАЭ-целлюлозе препарат с активностью 150 Е/г. Количество добавляемых этиленимин веществ производного ДЕАЭ-целлюлозы и желатина менялось от 0 до 45 % по отношению к носителю, количество глутарового альдегида менялось в интервале от 0,25 до 3,0 мг на г носителя.

Обработку глутаровым альдегидом проводили в фосфатном буфере (рН 7,0) в течение часа при 2 °С. Иммобилизованные препараты промывали сперва в фосфатном буфере, затем в Na-ацетатном буфера (рН 4,2), препараты хранились в буфере при 4 °С.

Активности экстрадированных и обработанных глутаровым альдегидом препаратов приведены в таблице 4.

Исследования вымываемости белка из препаратов проводились при 50 °С и концентрации субстрата 100 г мальтодекстрина на литр, время цикла 2 часа.

Перемешивание компонентов, экструзия и сушка инактивировали препараты без желатина почти одинаково (~ 30 %), у препаратов с желатином инаktivация существенно больше (80-85 %). Относительно влияния глутарового альдегида на 1 г сухого носителя достаточно для стабильного связывания фермента. Увеличение концентрации реагента (2,0-3,0 мл/г) нежелательно ввиду образования излишне большого количества поперечных связей в матрице носителя, что уменьшает каталитическую активность препарата.

Введение в препарат свободных аминных групп для уменьшения числа поперечных связей оказалось эффективным только для препаратов без желатина. В случае препаратов, не обработанных глутаровым альдегидом, уже при концентрации субстрата 100 г/л наблюдалось существенное уменьшение активности вследствие вымывания фермента. Добавка желатина до концентрации 15-20 % существенно улучшала механические свойства препарата. Полученные результаты показывают, что в дальней-

Активность экстрадированных препаратов и обработанных глютаровым альдегидом

ДЕАЭ целл. фер- мент	Желатин, г	ДЕАЭ целл. амин	Сушка	Активность μmol глюк. мин ⁻¹ г ⁻¹				
				0,25	0,5	1,0	2,0	3,0
ДЕАЭ-целл. -Е+желатин								
10 г								
0,2 г			108,7	43,9	50,6	68,9	59,0	50,0
0,4 г								
10	0,2	-	53,9	11,1	15,6	20,0	20,6	17,2
10	0,4	-	47,3	9,4	10,0	8,9	7,8	7,2
10	0,7	-	41,6	10,0	10,0	10,6	10,6	9,4
10	1,0	-	40,2	8,3	7,8	8,9	8,3	7,2
10	0,2	0,2	39,4	11,7	13,3	13,9	13,3	12,2
10	0,4	0,4	38,3	11,7	12,8	11,1	10,6	11,1
10	0,7	0,7	34,9	11,1	10,6	10,6	8,9	9,4
10	1,0	1,0	33,7	15,6	13,3	12,2	11,1	11,1

ших опытах по иммобилизации гликоамилазы нужно исключить сушку препаратов.

Автор выражает благодарность М.О. Манделю за советы при проведении экспериментов и А.И. Кёстнеру за помощь при оформлении рукописи.

Л и т е р а т у р а

1. L á s z l ó , E. Bevezetes. Doctori Dissertáció. 1980.
2. T r a m p e r , J. The immobilization of glucose isomerase in a glutaraldehyde cross-linked gelatin matrix. - U.S. NTIS, PB Rep N 246908. 1974. 88 pp.
3. C o l o w i c k , S.P., K a p l a n N.D. - Methods Enzymol., 1955, vol. 1, N 4, p. 143.
4. N a g y , G., v o n S t r o p , L.H., G u i l b a u l t , G.G. - Anal. Chim. Acta, 1973, vol. 66, p. 443.

R. Laidsaar,
E. László,
A. Hoschke

Immobilized Glucamylase

Summary

Glucamylase has been immobilized by means of anion exchange on DEAE cellulose with activity yield about 50 pC and the initial activity up to 880 E/g. However the stability of the obtained preparation in the process of starch hydrolysis cannot be considered sufficient.

Enhancing the stability crosslinking with glutar aldehyde and adding anionic cellulose derivatives or gelatin have been investigated. The obtained preparations have also been extruded and dissicated.

В.Н. Федосеев, Э.Э. Треуфельдт

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРЕПАРАТОВ СОВМЕСТНО
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ

В связи с хорошими диетическими и технологическими свойствами фруктозы спрос и потребление ее во всем мире растут [1, 2]. Кроме ферментативной изомеризации глюкозы [1] одним из возможных источников получения фруктозы является инвертный сироп [3, 4], получаемый кислотным или ферментативным [5] гидролизом сахарозы. Для облегчения процедуры выделения и очистки фруктозы из инвертного сиропа, представляется целесообразным ферментативное окисление сопутствующей части глюкозы в глюконовую кислоту с помощью глюкозооксидазы (ГОД), иммобилизуемой, как принято в большинстве подобных работ, совместно с каталазой [6, 9]. Каталаза (КАТ), разрушая образуемую глюкозооксидазой перекись водорода, защищает ГОД от инактивирующего влияния последней и одновременно продуцирует кислород, являющийся одним из субстратов ГОД. В настоящей работе изучались способы одновременной иммобилизации ГОД и КАТ, а также свойства полученных препаратов. Целью нашей работы являлось использование совместно иммобилизованных ГОД и КАТ для получения химически чистой фруктозы из обогащенных фруктозой фракций инвертного сиропа путем окисления примеси глюкозы в глюконовую кислоту с последующим отделением её от фруктозы с помощью ионообменной хроматографии.

Материалы и методы

Реактивы. Глюкозооксидаза (К.Ф. I.I.3.4) и каталаза (К.Ф. I.II.I.6) — лиофилизированные препараты производства Каменского спиртзавода с удельной активностью 2000 и 400000 нанокат соответственно. Препарат ГОД содержал

примесь КАТ с удельной активностью 180–200 мкмоль/мин. Бензохинон – отечественный реактив марки "ч" использовался без дальнейшей очистки. Акриламид (АА), бисакриламид (Бис АА) и тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД) – реактивы фирмы "Реанал" (Венгрия). Глутаровый альдегид (ГА) 25 %-ный – производства фирмы "Лерк" (ФРГ). Макропористые кремнеземные носители отечественного производства марки МСА-2500 и СХ-2. Размеры зерен и диаметры пор равнялись соответственно $10-80 \times 10^{-4}$ м и 40–70 нм для МСА и $35-5,0 \times 10^{-4}$ м и 30–50 нм для СХ-2.

Определение активности ферментов. Активность ГОД определяли рН-статическим методом в 20 мл 1,5 % раствора глюкозы при рН 5,8 и 30 °С. При этом проводилось барботирование реакционной среды воздухом (50 мл/мин). Активность фермента оценивалась по наклонам прямых скоростей гидролиза образуемого в ходе реакции δ -лактона после выхода реакции в стационарный режим.

Активность свободной и связанной каталазы определяли иодометрическим методом. Измерения проводились в 15 мл 0,05 М фосфатного буфера, содержащего $2 \cdot 10^{-2}$ М H_2O_2 , при 20 °С и рН 6,8 в течение 30 или 60 секунд.

Иммобилизация ферментов. Полимеризационную смесь для иммобилизации ГОД и КАТ в полиакриламидный гель (ПААГ) pripravляли последовательным прибавлением и разведением в 7 мл 0,15 М фосфатного буфера (рН = 7,0) различных аликвот концентрированных растворов компонентов, необходимых для проведения реакции полимеризации ПААГ. Последовательность внесения компонентов была следующей: раствор ферментов (от 5 до 20 мг/мл), 50 %-ный раствор АА и Бис АА (9:1), 2,5 %-ный ГА, ТЕМЭД и 50-ный раствор персульфата аммония. К полученной смеси быстро добавляли отмеренное количество носителя до получения однородной влажной массы, в которой почти сразу же начиналось и через 1,5 часа заканчивалось гелеобразование. Полимеризация проводилась в ледяной ванне. Для нахождения оптимальных условий связывания варьировали концентрации всех компонентов, а также очередность добавления некоторых из них.

Ковалентная иммобилизация, как это ранее было описано в работе [5], проводилась на силанизированном носителе СХ-2,

активированном в течение получаса в 3 %-ном спиртовом растворе бензохинона и отмытом от избытка последнего 0,2 М фосфатным буфером с pH 7,0. Связывание ферментов проводят в том же буфере в течение 2 часов в соотношении 3 мл буфера на 1 г влажного носителя, при концентрациях ферментов: 10 мг/мл для ГОД и 1-2 мг/мл для КАТ. Для повышения стабильности препараты после окончания связывания и промывания обрабатывали в течение 2 часов 0,1 %-ным раствором ГА в фосфатном буфере.

Проведение опытов по окислению глюкозы. Опыты по окислению глюкозы с помощью иммобилизованных ГОД и КАТ проводились в 500 мл pH-статируемом и барботируемом воздухом (7 л/мин) реакторе. Ход реакции наблюдался с помощью самодельного автоматического регистрирующего pH-стата, построенного нами на основе отечественного комплекта титровального оборудования "Т-105", производства Киевского завода аналитических приборов. Поддержание постоянного значения pH проводилось с помощью 2 М раствора гидроокиси аммония.

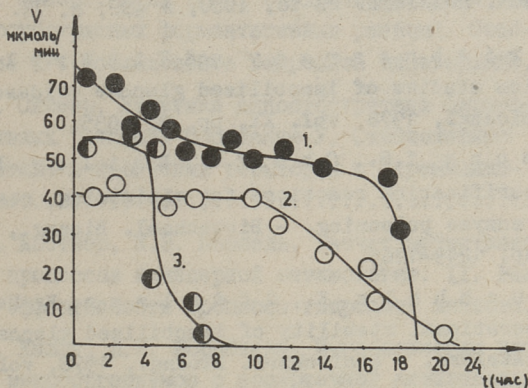
Результаты и обсуждение

Для нахождения оптимальных условий иммобилизации ферментов в ПААГ использовалось математическое планирование эксперимента, т.н. дробно-факториальный план эксперимента [10]. По этому плану провели 8 опытов иммобилизации, в ходе которых варьировали шесть входных данных, а именно, концентрации ГОД, КАТ, мономеров, ГА, ТЕМЭД и персульфата аммония. В результате проведения оптимизирования определяли и рекомендовали для связывания следующие концентрации реагентов в вышеперечисленном их порядке: 20,4 мг/мл, 2,9 мг/мл, 7,1 %, 1,5 %, 0,3 %, 0,6 %. Однако несмотря на варьирование концентраций, а также очередности добавления компонентов иммобилизационной системы, были получены образцы катализаторов с довольно низкой активностью: 250 - 400 нкат/г по ГОД и 10000-12000 нкат/г по КАТ. Низкие выходы активностей при иммобилизации ГОД и КАТ в ПААГ побуждали нас опробовать как альтернативный метод иммобилизации ковалентную иммобилизацию этих ферментов на активированном бензохиноном силанизированном пористом носителе СХ-2. Этим

способом нами получены препараты с активностью 1000 – 1200 нкат/г по ГОД и 25000–30000 нкат/г по КАТ. Выход активности в препарате составлял таким образом 6–7 % по ГОД и 6 % по КАТ. Проведенные опыты показали, что оптимальная продолжительность периода связывания равняется 90 мин. так как дальнейшее её увеличение не приводит к увеличению активности препаратов. Температурный и pH-оптимум ковалентно связанной ГОД равнялись 40 °C и 7,0. Стабильность препаратов ковалентно связанных ГОД и КАТ в ходе хранения при 10 °C и pH 4,6 и 6,8 практически одинакова. В течение первых 4 суток препараты теряют приблизительно 20–30 % своей активности, после чего она остается на постоянном уровне в течение месяца.

Опыты по окислению 10 %-ных растворов глюкозы, проведенные с препаратами ковалентно иммобилизованных ГОД и КАТ в pH-статируемом и барботируемом воздухом реакторе, показали, что в реальных рабочих условиях при 30 °C pH 6,0 константа скорости инактивации иммобилизованной ГОД равняется $4,2 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. При pH 5,0 и 18 °C в реакционном объеме 150 мл катализатор стабилен в течение 8 циклов. Средняя продолжительность цикла равнялась 6 часам в случае 15 г влажного катализатора и 9,5 часам в случае 5 г катализатора. Ход реакции окисления глюкозы с помощью ковалентно иммобилизованных ГОД и КАТ представлен графиками на фиг. 1. Проведенные опыты показали также, что увеличение количества катализатора выше 15 % (по весу) от реакционной среды при постоянном режиме расхода воздуха в 7 л/мин не приводит более к возрастанию скорости реакции, а значит и к сокращению продолжительности цикла более чем 99 % степени конверсии субстрата. Кроме того было обнаружено, что успешное проведение окисления глюкозы возможно даже в очень вязком концентрированном растворе моносахаридов, как например, в 40 %-ном растворе фруктозы, содержавшем 6 % глюкозы. При переходе от 150 мл 40 %-ного раствора к 300 мл 20 %-ного раствора продолжительность цикла при 30 °C, pH 6,5 и 30 г катализатора уменьшается с четырех часов до двух. С помощью иммобилизованных ГОД и КАТ удалось определить титриметрическим методом чистоту полученных препаратов фруктозы относительно глюкозы, причем чувствительность

этого метода оказалась не ниже чем для 0,0013 %-ных растворов.



Фиг. 1. Окисление глюкозы в глюконовую кислоту в инвертном сиропе с помощью ковалентно иммобилизованных глюкозооксидазы и каталазы.

1. 300 мл 20 % инвертного сиропа, 30 °С, рН 6,6, 15 г катализатора.
2. 150 мл 20 % инвертного сиропа, 18 °С, рН 4,9, 5 г катализатора.
3. 150 мл 10 % инвертного сиропа, 18 °С рН 4,9, 5 г катализатора.

Л и т е р а т у р а

1. Galas, E., Marciniak, G. Enzymatyczna izomeryzacja glukozy do fruktozy. - Post. mikrobiol., 1979, vol. 18, N 1, pp. 7-23.
2. Грачева И.М., Гернет М.В. Перспективы производства амилаз и гликозиломераз. - Материалы II Всес. совещ. по ферм. микроорг., 1978, с. 70-94 (Минск).
3. Tegge, G.D. Anreicherung und Gewinnung von Fruktose aus Isosirup oder Invertzucker. - Stärke, 1979, B. 32, N 12, S. 409-413.
4. Hartmeier, W.I., Tegge, G.D. Versuche zur Glukose-oxidation in Glukose-Fruktose-Gemischen mittels fixierter Glukoseoxidase-Katalase. - Stärke, 1979, B. 31, N 10, S. 348-353.

5. М а н д е л ь М.О., К р о с и н г В.А. Иммобилизация β -фруктозидазы и получение инвертного сиропа.- Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 75.

6. K r i s h n a s w a n y and K i t t r e l l, J.R. Deactivation studies of immobilized glucose oxidase. - Biotechnol. Bioeng., 1978, vol. XX, pp. 821-835.

7. Y e u n g, Y.S., C h o, Y.K., B a i l e y, E. Applications of purification reactions for minimizing reaction-generated enzyme poisoning. - Biotechnol. Bioeng., 1978, vol. XX, pp. 1249-1265.

8. B u c h h o l z, K., G ö d e l m a n, B. Macrokinetic and operational stability of immobilized glucose oxidase and catalase. - Biotechnol. Bioeng., 1978, vol. XX, pp. 1201-1220.

9. К о б а y а s h i, Т., B а n, Т., S h i m i z u, S., O h m i y a, К. Elimination of glucose in egg white by co-immobilized glucose oxidase and catalase. - J. Ferment. Technol., 1978, vol. 1, N 5, pp. 506-510.

V. Fedoseyev, E. Treufeldt

Preparation and Properties of Coimmobilized

Glucose Oxidase and Catalase Preparations

Summary

The immobilized glucose oxidase and catalase preparations have been prepared by their entrapment in polyacrylamide gel, by covalent coupling and the combined method. The dependence of several immobilization conditions on properties of the preparations has been investigated. The best results have been obtained by covalent coupling of enzymes to activated controlled pore silicious carrier. Immobilized preparations have been utilized for oxidasing glucose to gluconic acid in the glucose-fructose syrup with the aim of increasing the efficiency of separating and purifying the fructose.

The stability of coimmobilized glucose oxidase and catalase preparations under operating conditions has been investigated.

Содержание

I.	А.А. Менерт, М.А. Рузе, Э.Х. Сиймер. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение IV. Исследование гидролиза дисахаридов.	3
2.	Э.Х. Сиймер. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение V. Стационарная кинетика в проточных реакторах с перемешиванием.....	15
3.	А.И. Кёстнер, К.Э. Паппель. Расчет эффективности процессов инженерной энзимологии. II. Расчет эффективности процесса гидролиза лактозы..	25
4.	А.Х. Калда, Л.И. Воробьева. Иммуобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. II. Иммуобилизация клеток <i>Escherichia coli</i>	37
5.	Л.В. Гаевая. Свойства иммуобилизованной нуклеозидфосфотрансферазы.....	49
6.	А.Я. Озолинш. Иммуобилизация трипсина на аминопропилсилохромах, активированных глутаровым альдегидом.....	59
7.	М.К. Фриеденталь, А.И. Кёстнер. Получение, свойства и применение иммуобилизованных молоко-свертывающих ферментных препаратов. Сообщение III. Особенности применения иммуобилизованного сычужного фермента при свертывании молока.	69
8.	А.Э. Эрин. Использование некоторых бактериальных протеаз для получения гидролизатов казеина	77
9.	М.О. Мандель. Кинетика гидролиза бензилпенициллина с применением иммуобилизованной пенициллинамидазы.....	85
10.	К.А. Кивисилла, Х.Я. Киппер. Иммуобилизация некоторых протеолитических ферментов микроорганизмов на модифицированных неорганических носителях.....	93
II.	Х.Я. Арунийт. Исследование кинетики гидролиза ацетилпроизводных аминокислот под действием аминонацилазы.....	101

12. Э.Н. Теаро, Э.Г. Уус, Л.А. Иосуа. О влиянии пульсирующего вакуума на процессы с иммобилизованными ферментами..... 107
13. Р.Б. Лайдсаар, Э. Ласло, А. Хошке. Иммобилизация глюкоамилазы на органических носителях. 115
14. В.Н. Федосеев, Э.Э. Треуфельдт. Получение и свойства препаратов совместно иммобилизованных глюкозооксидазы и каталазы..... 125

ТАЛЛИНСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
Труды ТПИ № 510
ПРИКЛАДНЫЕ ВОПРОСЫ БИООРГАНИЧЕСКОГО
КАТАЛИЗА

Инженерная энзимология 11

Редактор А. Канн, Техн. редактор В. Ранник

Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 20 февр. 1981 г.

Подписано к печати 25 декабря 1981 г.

Бумага 60х90/16. Печ. л. 8,25 + 0,5 приложение

Уч. -изд. л. 7,0. Тираж 300

МВ-107981

Ротапринт ТПИ, Таллин, ул. Коокла, 2/9. Зак. № 767

Цена 1 руб. 5 коп.



ТПИ, Таллин, 1981

руб. 1.05