

Fr. 6.1
622

ISSN 0136-3549
0320-3395

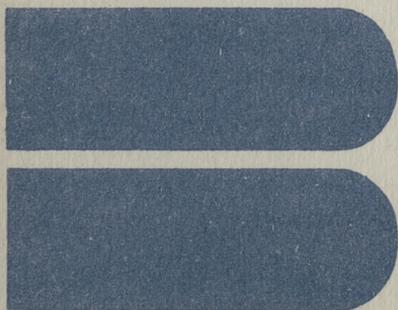
TALLINNA
POLÜTEHNILISE INSTITUUDI
TOIMETISED

622

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО
ИНСТИТУТА

ТРИ
'86

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ



622.

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРИ
'86

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15:66.097.3



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Биотехнология 1

Под общей редакцией А. И. Кёстнера

Таллин 1986



ТАЛЛИНСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

Труды ТПИ № 622

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Биотехнология 1

На русском языке

Отв. ред. М. Миккал, Техн. ред. М. Тамме

Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 6.03.86

Подписано к печати 17.12.86

МВ- 11716

Формат 60x90/16

Печ. л. 6,5 + 0,5 приложение

Уч.-изд. л. 5,6

Тираж 300

Зак. № 572

Цена 85 коп.

Таллинский политехнический институт,

200108 Таллин, Эхитаяте тее, 5

Ротап rint ТПИ, 200006 Таллин, ул. Коскла, 2/9



Таллинский политехнический институт, 1986

ПРОГРАММЫ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

СООБЩЕНИЕ II. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА ЛАКТОЗЫ В МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

В предыдущем нашем сообщении [1] были изложены общие подходы к созданию комплекса программ для оптимизации биокаталитических процессов и графического представления полученных результатов в виде комплекса $n+1$ трехмерных графиков (n — число независимых переменных). В данном сообщении описываются некоторые результаты, полученные при анализе технологического процесса гидролиза лактозы в молочной сыворотке.

Применение иммобилизованной β -галактозидазы для утилизации молочной сыворотки описано во многих публикациях. Убедительно показано, что только применение иммобилизованного фермента позволяет переработать этот отходный продукт молочной промышленности в легкоусвояемый ценный заменитель сахара в глюкозо-галактозный сироп. С целью разработки и внедрения этого процесса в Таллинском политехническом институте проведены обширные лабораторные и опытно-конструкторские работы, результаты которых опубликованы в печати [2, 3].

При нижеследующем теоретическом анализе взяты за основу кинетические и технологические закономерности, которые получены в работе нашей лаборатории К.Э. Паппель с сотрудниками.

Описание рассматриваемой системы

Рассматривается биокаталитический процесс гидролиза лактозы в молочной сыворотке под действием иммобилизованно-

го препарата грибной β -галактозидазы. Биокаталитический процесс входит в технологическую цепь, которая включает еще удаление белков ультрафильтрацией, удаление солей электро-диализом и сгущение гидролизата упариванием в вакууме. Упаривание пермеата может при необходимости быть отчасти осуществлено также перед гидролизом.

В качестве нативного фермента применяется препарат плесневого гриба *Pen. canescens* производства Ладыжинского завода ферментных препаратов, при необходимости приводится предварительная очистка ферментного раствора ультрафильтрацией. Иммобилизацию проводят на макропористых кремнеземных или органо кремнеземных носителях с помощью глутарового альдегида. Активность получаемого катализатора гиперболически зависит от количества нативного фермента. Кинетика инактивации катализатора описывается экспоненциальной функцией. Константа скорости инактивации является суммой двух составляющих - зависимой от температуры константы денатурации и независимой от температуры константы "механической" инактивации. Зависимость скорости денатурации описывается уравнением Аррениуса, температурная зависимость скорости основной ферментативной реакции описывается приведенным в литературе уравнением [4]

$$k_t = \frac{A \exp(-E_a/RT)}{1 + \exp(\Delta S^\circ/R - \Delta H^\circ/RT)} \quad (1)$$

Кинетика основной ферментативной реакции характеризуется ингибированием продуктами и описывается уравнением Сий-мера [5]

$$k_x = \frac{A(1+XF)}{1 + K_M/S + DS + XF(E+S \cdot F) + S \cdot G \cdot XF^2} \quad (2)$$

Из-за отсутствия ингибирования субстратом $D = 0$. Остальные характерные константы этого уравнения линейно зависят от температуры. Соблюдается равенство $G = -F$.

Реакцию гидролиза проводят в барботажном реакторе, созданном на кафедре. Рабочий объем реактора 1 м^3 , разовая загрузка катализатора 100 кг.

Уточнение математической модели

Для решения задач оптимизации в данном случае были внесены некоторые изменения в описанную нами ранее целевую функцию оптимизации. Основные изменения заключаются в следующем:

1. Степень конверсии субстрата перенесена из списка переменных в список параметров. Так как продукт реакции не выделяет в виде отдельного вещества, то эффективность процесса монотонно снижается с увеличением X_F . Следовательно, значение X_F не может быть оптимизировано, а должно быть определено из технических требований на продукт. По литературным данным известно, что степень конверсии ниже 0,5 себя не оправдывает, а достижение степени конверсии свыше 0,85 необязательно.

2. Введена зависимость кинетических коэффициентов от температуры. По экспериментальным данным и расчетам Э.Х. Сиймера и М.А. Курвитс кинетические коэффициенты ур. (2) могут быть предварительно определены следующей системой:

$$\begin{aligned}K_M &= 0,12 - 0,00425 \Delta t \\E &= 0,55 + 0,0415 \Delta t \\F &= 7,7 - 0,24 \Delta t ,\end{aligned}\quad (3)$$

где Δt - разница со стандартной температурой $\Delta t = t - 30$.

3. На основе математической обработки экспериментальных данных, полученных К.Э. Паппель, определили зависимость активности катализатора от количества нативного фермента, которая описывается уравнением

$$A = A_M / (1 + A_C / A_N), \quad (4)$$

где A_N - количество нативного фермента,
 $A_M = 1500$, $A_C = 3300$.

Все упомянутые величины имеют размерность $N \cdot M^{-1} T^{-1}$ и рассчитаны на всю навеску катализатора в реакторе.

Уравнение преобразовано в более удобную для расчетов форму:

$$\frac{A_T}{A_{303}} = \text{EXP}(-A_2 \cdot TD) / (1 + \text{EXP}(A_6 \cdot (1 - A_6/T))), \quad (5)$$

где TD - приведенная разница температуры,

$$TD = (303 - T) / 303 \cdot T, \quad (6)$$

A2 - безразмерная энергия активации E_A/R ,

A6 - безразмерное изменение энтропии обратимой денатурации $\Delta S_0/R$,

A7 - критическая температура обратимой денатурации, вычисляемая как $\Delta H_0/\Delta S_0$.

Оценочные значения этих характеристик, полученных обработкой экспериментальных данных:

$$A2 = 5600$$

$$A6 = 50$$

$$A7 = 344 \text{ К.}$$

Константа денатурации при температуре 303 К учтена в двух вариантах $A3 = 2,5 \cdot 10^5$ или $A3' = 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, константа "механической" инактивации - $3 \cdot 10^{-4} \text{ час}^{-1}$. Безразмерная энергия активации необратимой денатурации $A4 = 16000$.

Рассчитаны и оценены также приблизительные значения экономических характеристик. Стоимость лактозы вычислена из стоимости сыворотки, передаваемой сельскому хозяйству и равняется 0,067 руб/кг. Стоимость условной единицы ферментативной активности (в расчете на всю загрузку 1 м^3 реактора) 7 руб. г/Е. Стоимость носителя на загрузку реактора 3500 руб. Стоимость эксплуатации реактора (зарплата, амортизация и энергия) - 4 руб./ч.

Проведение расчетов

Для расчета оптимальных значений и для графического представления результатов использовался комплекс из двух программ, которые создают и используют массивы данных на дискетах. Программы написаны на языке MBASIC операционной системы CP/M. Отлаженные программы были скомпилированы и счет проводился по программам в машинном коде, что позволило сократить необходимое время примерно в 10 раз.

Скорость достижения экстремума и точности полученных значений переменных зависит от заданной точности. При эксплуатации программ выяснилось, что экстремумы довольно пологие и, следовательно, для получения достоверных значений параметров необходимо задать высокую точность. Коэффициент сходимости двух последовательных решений был определен

равным 1.0002, т.е. допускается разница двух последовательных серий симплексов не более 0,02 %.

При проведении расчетов была определена т.н. нормальная точка в виде вектора значений всех параметров. Из всего списка параметров два были выбраны в качестве варьируемых. Варьируемому параметру P1 присвоили 8 разных значений, параметру P2 26 значений, т.е. в ходе анализа одной системы задачу оптимизации решали во всех 208 узлах сетки 8x26. Трехмерные графики получились в виде 8 непрерывных графиков, каждый из них состоит из 26 отрезков.

Варьируемым параметром P1 в большинстве случаев выбирали степень конверсии субстрата, в качестве P2 выбирали обычно одну из экономических характеристик.

В качестве примера рассмотрели графики, полученные в системе $P1 \equiv XF$, $P2 \equiv C4$, т.е. в случае вариации степени конверсии и стоимости эксплуатации реактора. Следует отметить, что стоимость эксплуатации одного кубометра объема реактора существенно зависит от масштаба установки.

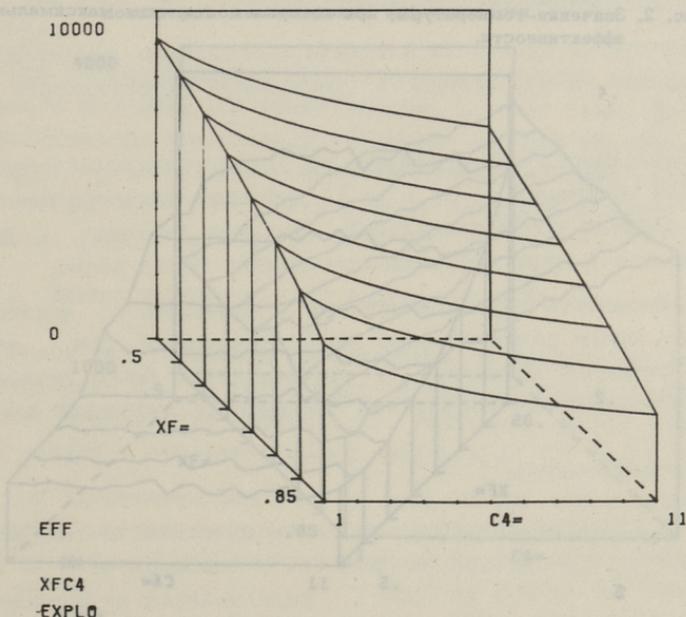
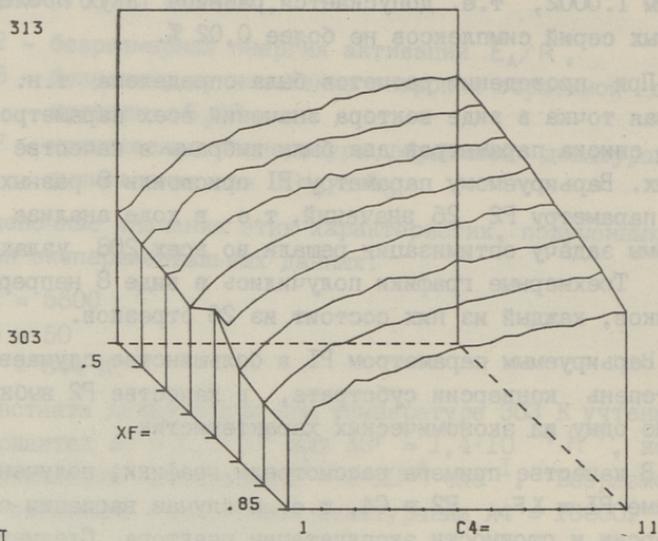


Рис. 1. Эффективность процесса гидролиза лактозы в зависимости от изменения расходов на эксплуатацию C4 при разных степенях конверсии. Значения переменных, при которых достигается максимальная эффективность, приведены на рис. 2-5.

313

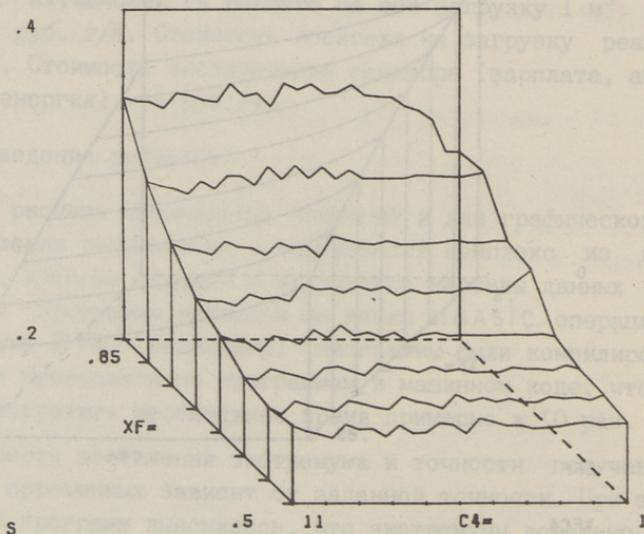


XFC4

.EXPL0

Рис. 2. Значения температуры, при которых достигнуты максимальные эффективности.

.4



XFC4

.EXPL0

Рис. 3. Значения концентрации субстрата, при которых достигнуты максимальные эффективности.

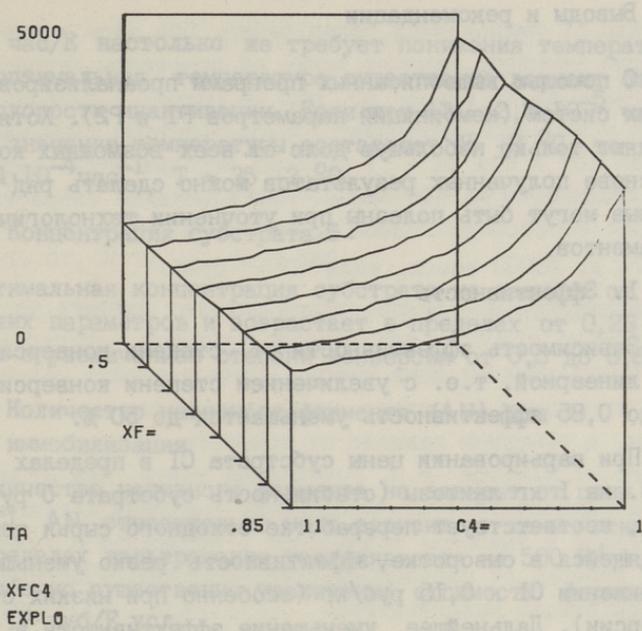


Рис. 4. Значения времени эксплуатации катализатора, при которых достигнуты максимальные эффективности.

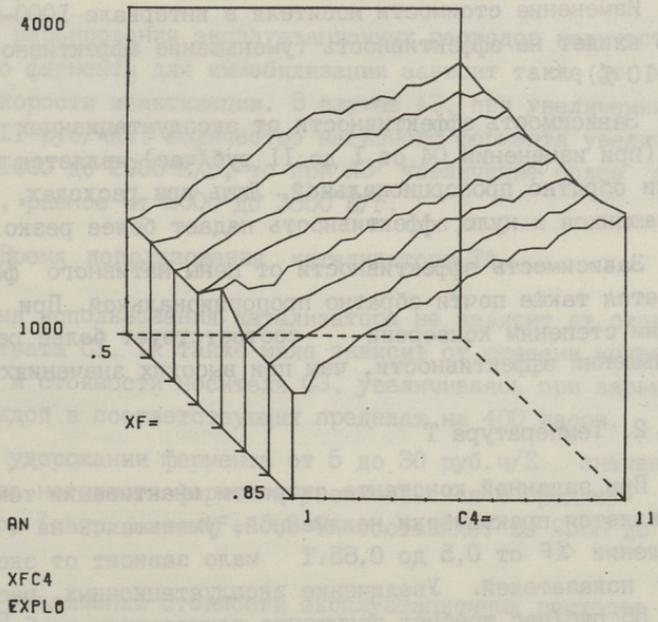


Рис. 5. Значения количества исходного нативного фермента, при которых достигнуты максимальные эффективности.

Выводы и рекомендации

С помощью вышеописанных программ проанализировано 8 разных систем (комбинаций параметров P1 и P2). Хотя они составляют только небольшую долю от всех возможных комбинаций, на основе полученных результатов можно сделать ряд выводов, которые могут быть полезны при уточнении технологических регламентов.

1. Эффективность

Зависимость эффективности от степени конверсии является линейной, т.е. с увеличением степени конверсии от 0,5 до 0,85 эффективность уменьшается до 50 %.

При варьировании цены субстрата C1 в пределах 0 ... 1 руб. на 1 кг лактозы (стабильность субстрата 0 руб/кг условна, соответствует переработке отходного сырья полностью), находящейся в сыворотке, эффективность резко уменьшается при приближении C1 к 0,15 руб/кг (особенно при низких степенях конверсии). Дальнейшее уменьшение эффективности в зависимости от цены субстрата линейно.

Изменение стоимости носителя в интервале 1000–6000 руб. мало влияет на эффективность (уменьшение эффективности менее 10 %).

Зависимость эффективности от эксплуатационных расходов (при изменении 04 от I до II руб/час) является практически обратно пропорциональной. Лишь при расходах, приближающихся к нулю, эффективность падает более резко.

Зависимость эффективности от цены нативного фермента является также почти обратно пропорциональной. При этом низким степеням конверсии соответствует более резкое уменьшение эффективности, чем при высоких значениях XF.

2. Температура T

При заданной константе скорости инактивации температура является практически неизменной, уменьшаясь на 4 °C при повышении XF от 0,5 до 0,85. T мало зависит от экономических показателей. Увеличение эксплуатационных расходов с I до 55 руб/час требует повышения температуры на 6 °C. С другой стороны, повышение условной цены фермента C2 с 5 до

55 руб. час/Е настолько же требует понижения температуры. Однако оптимальная температура существенно зависит от константы скорости инактивации. Если при $A_3 = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ час}^{-1}$ среднее значение температуры составляет $45 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, то при $A_3' = 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ час}^{-1}$ $T = 35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3. Концентрация субстрата S.

Оптимальная концентрация субстрата не зависит от экономических параметров и возрастает в пределах от 0,23 до 0,35 М/л с увеличением степени конверсии от 0,5 до 0,85.

4. Количество нативного фермента (AN) для иммобилизации

Количество нативного фермента не зависит от цены субстрата С1. AN относительно мало зависит от цены носителя С3 (в пределах варьирования увеличивается на 500 Е/г). При этом особенно существенно увеличение стоимости фермента от 5 до 17 руб/Е усл.

При этом AN суммарно изменялось в пределах 1400... 3000 Е/г.

При варьировании эксплуатационных расходов количество нативного фермента для иммобилизации зависит также от константы скорости инактивации. В случае A_3 , при увеличении C_4 от I до II руб/час, количество нативного фермента увеличивается от 1000 до 2900 Е/г, то при A_3' увеличение более существенное, равное от 2000 до 3600 Е/г.

5. Время использования катализатора ТА

Время использования катализатора не зависит от стоимости субстрата С1. ТА также мало зависит от степени конверсии X_F и стоимости носителя С3, увеличиваясь при варьировании каждой в соответствующих пределах на 400 часов.

При удорожании фермента от 5 до 30 руб.ч/Е значение количества нативного фермента увеличивается в среднем на 1400 часов (напр., при $X_F = 0,5$ ТА составляет от 2500 до 3900 час).

При увеличении стоимости эксплуатационных расходов от I до II руб/час время использования катализатора уменьшается в среднем на 2700 часов, причем при увеличении C_4 до

5 руб/час TA уменьшается более резко. При этом количество нативного фермента зависит также от константы скорости инактивации. Так, в случае $A3$, при $C4$ равном I руб/час, катализатор можно эксплуатировать приблизительно 1000 часов, а в случае $A3'$ и при $C4 = II$ руб/час использование катализатора увеличивается на 400 часов. При константе скорости ($A3$) TA равно от 5500 до 23000 часов, если $XP = 0,5$ и TA равно от 5900 до 20000 часов, если $XF = 0,85$.

Вышеизложенные рекомендации следует считать не абсолютными, а только примером тех выводов, которые могут быть сделаны по предложенному нами методу. Обоснованность рекомендаций, сформулированных на основе оптимизационного анализа целевой функции, в основном зависит от точности определения многопараметрового вектора т.н. нормальной точки. При этом следует еще раз подчеркнуть, что абсолютные значения достигаемой эффективности и значения переменных в оптимальной точке решительно зависят от параметров, характеризующих основную реакцию инактивации катализатора.

Поэтому кроме вышеописанных процедур оптимизации при разработке реальной технологии следует обратить максимальное значение на целенаправленное изменение этих характеристик путем подбора условий получения катализатора.

Авторы выражают благодарность К.Э. Паппель за предоставление использованных в расчетах данных о свойствах иммобилизованной β -галактозидазы и Э.А. Эббер за помощь при оформлении рукописи.

Л и т е р а т у р а

1. Кёстнер А.И., Роос И. Р. Программы для оптимизации биокаталитических процессов. I. Оптимизация симплексным методом. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1985, № 598, с. 3-9.

2. Кёстнер А.И. Расчет эффективности процессов инженерной энзимологии. I. Принципы и структура программ для расчета на ЭВМ. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 3-13.

3. Кёстнер А.И., Паппель К.Э. Расчет эффективности процессов инженерной энзимологии. II. Расчет эффективности процесса гидролиза лактозы. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1981, № 510, с. 25-35.

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

5. Корниш - Боден Э. Основы ферментативной кинетики. М., Мир, 1979. 280 с.

A. Köstner, I. Roos

Program for the Optimization of
Biocatalytic Processor II

The Optimization of Lactose Hydrolysis in Whey

Abstract

The generalized objective function for the optimization of biocatalytic technologies has been adapted for the hydrolysis of lactose in whey. As a major change, the degree of substrate conversion has been transferred from the list of variables to parameters. On the basis of compiled data and estimation of economic characteristics the multi-dimensional vector of normal workpoint has been determined. From the whole set of parameters some pairs have been selected for variation. With the help of compiled programs for personal computer 8 different systems have been analysed and some recommendations for optimum planning of technology have been formulated.

М.А. Курвйтс, Э.Х. Сиймер

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ
СООБЩЕНИЕ X. КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА ЛАКТОЗЫ С ПОМОЩЬЮ
 β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ *Penicillium canescens*

В настоящее время во всем мире актуальной проблемой является рациональное использование побочных продуктов молочной сыворотки. Использование фермента β -галактозидазы из разных источников в нативной или иммобилизованной формах, или же в составе клеток, позволяет превратить лактозу в более сладкие, хорошо усваиваемые моносахариды. Поэтому изучение кинетики гидролиза лактозы в модельных растворах и молочных продуктах имеет важное практическое значение, так как без четкого представления и описания кинетики данной реакции невозможно управление промышленными процессами, их оптимизация [1].

Исследование ферментативного гидролиза лактозы представляет значительный интерес также с теоретической точки зрения. Для этой реакции обычно характерно сильное ингибирование продуктами реакций, которое для ферментативного гидролиза других природных дисахаридов проявляется в значительно меньшей степени.

Обычно принято, что продукты суммарно или, в частности, галактоза являются конкурентными ингибиторами. Так, например, для β -галактозидазы из гриба *Asp.niger* обнаружено очень сильное конкурентное ингибирование, соотношение констант K_s и K_p равно 17 [1]. Для фермента из этого источника такое ингибирование является типичным [2]. Японскими учеными найдено, что для фермента из *Kluvermyces lactis* характерно смешанное ингибирование галактозой [3], но, что весьма удивительно, β -галактозидаза из *Lactobacillus bulgaricus* и *Esch.coli* гидролизуют лактозу без

ингибирующего действия продуктами. Глюкоза, очевидно, более слабый ингибитор и ее действие чаще всего считается неконкурентным [4]. В некоторых случаях для описания работы реакторов могут быть успешно применены эмпирические уравнения, учитывающие торможение реакции в процессе гидролиза лактозы [5].

Нами ранее изучена кинетика гидролиза лактозы, катализируемого β -галактозидазой из *Curvularia inaequalis* [6]. Результаты исследования хорошо описывались схемой, согласно которой галактоза является конкурентным (при этом сильным) и глюкоза — неконкурентным ингибитором. Для фермента Lactozym I500 L (Дания) также показана применимость разработанного нами обобщенного кинетического уравнения, причем ингибирование продуктами можно было считать смешанным [7].

Использование термохимического метода позволяет успешно проводить кинетические исследования [8]. Хотя, как выяснилось, тепловой эффект гидролиза лактозы очень мал (порядка 1 кДж/моль), с помощью современных микрокалориметров применение термохимического метода для изучения этой реакции можно считать обоснованным.

Целью настоящей работы являлось исследование стационарной кинетики гидролиза лактозы с помощью фермента из *Penicillium canescens* термохимическим методом. Эта β -галактозидаза в настоящее время считается перспективной для применения в отечественной молочной промышленности.

Материалы и методы исследований

В качестве субстрата использовалась D-лактоза $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ "ч" Шосткинского завода химреактивов. Ферментный препарат — β -галактозидаза из *Penicillium canescens* Ладьжинского завода ферментных препаратов имела стандартную активность 800 Е/г. Все растворы приготовили в 0,05 М ацетатном буфере (рН 4,0).

Термохимические исследования проведены на микрокалориметре ЛКБ 2277 ("Монитор биоактивности"), используя ампульную систему для снятия полных кинетических кривых и проточную систему комбинированного, измерительного цилиндра для

измерения начальных скоростей. Методика проведения опытов и выбора оптимальных условий описана нами ранее [8]. Полные кинетические кривые корригировались методами [9], основывающимися на использовании уравнения Тиана. Для ампульной системы константа времени, определенная нами в специальных опытах, равна $3,8 \pm 0,2$ мин. Все результаты опытов подвергались математической обработке на ЭВМ методами линейной регрессии.

Результаты и обсуждение

Проведено исследование кинетики гидролиза лактозы в водных (буферных) растворах при двух температурах 30 и 50 °С.

Определение начальных скоростей осуществлено в диапазоне исходных концентраций субстрата $[S]_0$ 0,04–0,4 М. Проведено 30 опытов определения начальных скоростей, для каждого опыта измерялись также величины теплового потока, соответствующие эффектам разведения растворов субстрата и фермента в измерительной ячейке.

Результаты термохимических измерений в виде зависимости теплового потока (пропорционального скорости реакции) от исходной концентрации субстрата обрабатывались на ЭВМ по методу Корниш–Боуден [10]. Найдены следующие значения K_m на уровне вероятности 0,95: при 30 °С $0,12 \pm 0,02$ М, при 50 °С $0,035 \pm 0,006$ М. Выяснено, что явления ингибирования или активации субстратом отсутствуют и, следовательно, значение обратной величины константы ингибирования равно нулю ($d = 0$).

Полные кинетические кривые сняты при двух температурах, 30 и 50 °С. Всего снято 78 кинетических кривых в диапазоне исходной концентрации субстрата $[S]_0$ 0,2–0,7 М. Предполагалось, что схема реакции гидролиза лактозы подчиняется обобщенной схеме односубстратных ферментативных реакций [11]. Из каждой кривой взяли 10–16 комплектов данных: скорость реакции и время для математической обработки. Задавались определенные по начальным скоростям значения K_m и $d = 0$. С помощью программы "Комплект", принцип работы которой описан нами ранее [11], найдены значения кинетических коэффициентов e , f [M^{-1}] и q [M^{-1}], а также значение предельной

скорости V , выражаемой на один миллиграмм ферментного препарата (т.е. в виде предельной активности).

В таблице I сосредоточены найденные значения кинетических коэффициентов.

Т а б л и ц а I

Значения кинетических коэффициентов обобщенного уравнения при гидролизе лактозы при pH 4,0

Коэффициент	Размерность	Значение	
		при 30 °C	при 50 °C
I	2	3	4
K_m	M	0,12 \pm 0,02	0,035 \pm 0,006
d	M ⁻¹	0	0
e	—	0,55 \pm 0,02	1,38 \pm 0,05
f	M ⁻¹	7,7 \pm 2,1	2,9 \pm 0,8
g	M ⁻¹	-7,7 \pm 2,4	-2,9 \pm 1,0
V	E/мг	0,99 \pm 0,01	3,13 \pm 0,03
$\frac{1}{\alpha K_{P_1}} + \frac{1}{\beta K_{P_2}}$	M ⁻¹	12,9 \pm 3,5	68 \pm 22
$\frac{1}{K_{P_1}} + \frac{1}{K_{P_2}}$	M ⁻¹	7,7 \pm 2,1	2,9 \pm 0,8

Коэффициенты e, f и g являются функциями от значений констант ингибирования [11, 13]. Константы "бесконкурентной" части смешанного ингибирования обозначены через K_{P_1} и K_{P_2} , а конкурентной части ингибирования через αK_{P_1} и βK_{P_2} для галактозы и глюкозы соответственно. На основе величин K_m, e, f и g вычисляются значения сумм $\frac{1}{K_{P_1}} + \frac{1}{K_{P_2}}$ и $\frac{1}{\alpha K_{P_1}} + \frac{1}{\beta K_{P_2}}$, см. [12], т.е. количественно характеризуют ингибирующее действие продуктов. По сумме величин $f+g$ можно судить, образуется ли тройной комплекс E, P_1, P_2 и каково значение константы и диссоциации.

Значения $\frac{1}{K_{P_1}} + \frac{1}{K_{P_2}}$ и $\frac{1}{\alpha K_{P_1}} + \frac{1}{\beta K_{P_2}}$ также даны в таблице I. На основе величин этих значений и K_m и d вычислена зависимость содержания ферментных комплексов от степени конверсии субстрата. Для иллюстрации такая зависимость для 0,4 M раствора лактозы при 50 °C дана на рис. I.

Как видно из рис. I, скорость гидролиза лактозы (которая пропорциональна концентрации комплекса ES) сильно сни-

жается при повышении степени конверсии субстрата, при накоплении продуктов в реакционной смеси. Скорость реакции всегда пропорциональна количеству комплекса ES, единого продуктивного комплекса при полном ингибировании продуктами. Интересно отметить, что при 50 °C основное торможение реакции происходит за счет связывания фермента в комплексы EP₁, и EP₂, а при 30 °C "бесконкурентная часть" ингибирования (образование комплексов EP₁S и EP₂S) имеет большее значение. Комплекс EP₁P₂ не образуется, что вытекает из условия $f+g=0$ при отсутствии ингибирования субстратом [12].

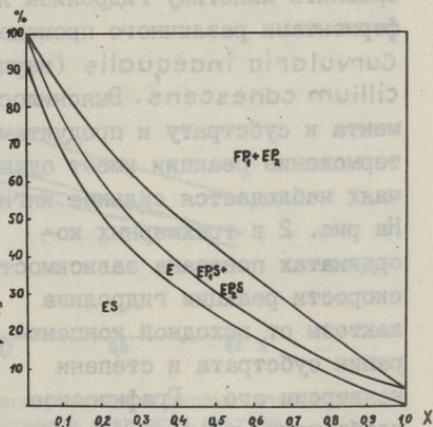
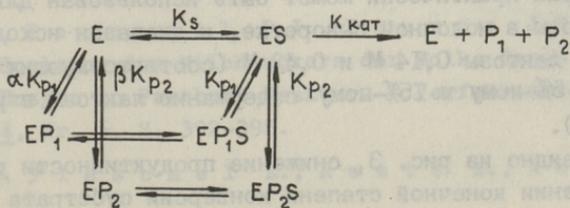


Рис. 1. Содержание ферментных комплексов в реакционной смеси в зависимости от степени конверсии лактозы.

Информация, получаемая из комплекта полных кинетических кривых, недостаточна для отдельного определения значений констант ингибирования продуктов. Для этого нужны были бы специальные исследования. Однако по данным настоящей работы можно считать ингибирование обеими продуктами - галактозой и глюкозой - смешанным. При этом, по всей вероятности, галактоза в основном связывается в комплекс EP₁, т.е. конкурирует с субстратом за связывание в активный центр β-галактозидазы.

Таким образом, за счет отсутствия образования тройных комплексов ES₂ (ингибирование субстратом) и EP₁P₂, обобщенная схема ферментативных реакций [III] в данном конкретном случае упрощается и может быть изображена следующим образом:



где S – лактоза, P_1 – галактоза, P_2 – глюкоза. Интересно сравнить кинетику гидролиза лактозы, катализируемого двумя ферментами различного происхождения – β -галактозидазой из *Curvularia inaequalis* (изученной нами ранее) [6] и *Penicillium canescens*. Выяснилось, что средство последнего фермента к субстрату и продуктам почти в 10 раз ниже. Однако торможение реакции имеет одинаковый характер – в обоих случаях наблюдается сильное ингибирующее действие продуктами.

На рис. 2 в трехмерных координатах показана зависимость скорости реакции гидролиза лактозы от исходной концентрации субстрата и степени конверсии его. Графическое изображение процесса получено с помощью микроЭВМ по программе, составленной проф. А.И. Кёстнером.

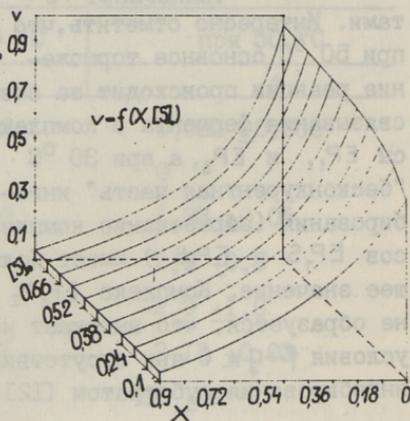


Рис. 2. Скорость реакции гидролиза лактозы при 50°C v как функция от степени конверсии субстрата X и исходной концентрации лактозы $[S]_0$, М.

Для прикладных целей целесообразно проводить сравнение эффективности реакторов т.н. первого кинетического типа – периодических реакторов с перемешиванием. Методика расчетов описана нами ранее [10]. На рис. 3 показана зависимость продуктивности реакторов, выраженной на одну ферментную единицу при данной температуре, от конечной степени конверсии субстрата. Продуктивность в настоящем случае выражена как средняя производительность одной ферментной единицы при изменении степени конверсии лактозы от нуля до конечной степени конверсии в периодическом процессе.

Выбран диапазон конечной степени конверсии $X = 0,5-0,9$, который практически может быть использован для гидролиза лактозы в молочной сыворотке, и диапазон исходных концентраций лактозы 0,14 М и 0,42 М (соответствующих приблизительно 5%-ному и 15%-ному содержанию лактозы в реакционной смеси).

Как видно из рис. 3, снижение продуктивности реакторов при повышении конечной степени конверсии субстрата значи-

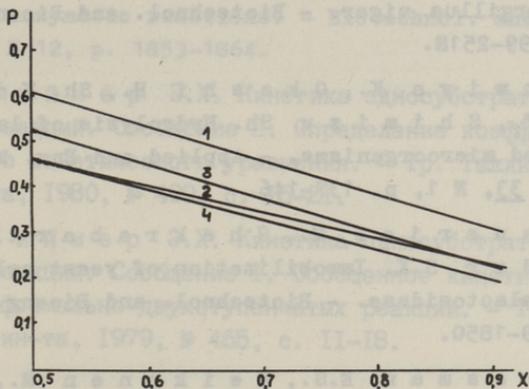


Рис. 3. Продуктивность периодического реактора с перемешиванием в зависимости от конечной степени конверсии лактозы.
 1, 2 - β -галактозидаза из *Penicillium canescens*,
 3, 4 - β -галактозидаза из *Curvularia inaequalis*.
 Исходная концентрация субстрата 0,14 М (1,3) и 0,42 М (2,4).

тельно. Продуктивность β -галактозидазы из *Penicillium canescens* выше по сравнению с ферментом из *Curvularia inaequalis*. Продуктивность реакторов заметно снижается при повышенном содержании лактозы в обрабатываемой жидкости.

Имея в виду, что при гидролизе лактозы с помощью β -галактозидазы из *Penicillium canescens* при переходе от 30 к 50 °С активность фермента увеличивается примерно в 3 раза (см. табл. I), а ингибирование продуктами в некоторой степени уменьшается, продуктивность реакторов при 50 °С около 4 раз выше по сравнению с продуктивностью при 30 °С.

Выбор оптимальной температуры для промышленных процессов, в частности, при использовании иммобилизованных препаратов фермента существенно связан также с учетом стабильности фермента.

Л и т е р а т у р а

1. P e r n o s i l P.J., B o u r n e J.R. Hydrolytische Spaltung des Milchzuckers der Molke durch immobilisierte Enzyme in Festbett-Reaktor. - Verfahrenstechnik, 1980, 14, Nr. 6, S. 392-398.

2. F l a s c h e l E., R a e t z E., R e n k e n A.

The kinetics of lactose hydrolysis for the β -galactosidase from *Aspergillus niger*. - *Biotechnol. and Bioeng.*, 1982, 24, p. 2499-2518.

3. Ohm i y a K., Ok a s h i H., Sh. K o b a y a s h i T., S h i m i z u Sh. Hydrolysis of lactose by immobilized microorganisms. - *Applied and Env. Microbiology*, 1977, 33, N 1, p. 137-146.

4. B a n e r j e e M., C h a k r a b a r t y A., M a j u m d a r S.K. Immobilization of yeast cells containing β -galactosidase. - *Biotechnol. and Bioeng.*, 1982, 24, p. 1839-1850.

5. F r o s m a n E.S., H e i k o n e n M., K i v i n i e m i L., K r e u l a M., L i n k o P. Kinetic investigations of the hydrolysis of milk lactose with soluble *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. - *Milchwissenschaft*, 1979, 34, N 10, p. 618-621.

6. П а п п е л ь К.Э., С и й м е р Э.Х., К ё с т - н е р А.И., Л е т у н о в а Е.В., Т и х о м и р о в а А.С. Гидролиз лактозы иммобилизованной β -галактозидазой. - *Прикл. биохимия и микробиология*, 1976, 12, вып. 2, 217-220.

7. М е н е р т А.А., С и й м е р Э.Х. Кинетика одно-субстратных ферментативных реакций. Сообщение УП. Характеристика кинетики гидролиза лактозы с помощью автоматического анализатора "Контифло". - *Тр. Таллинск. политехн. ин-та*, 1985, № 598.

8: С и й м е р Э.Х., К у р в и т с М.А. Кинетика од-носубстратных ферментативных реакций. Сообщение УШ. Применение калориметров типа Кальве для исследования стационарной кинетики. Там же, с. 9.

9. R a n d z i o S.L., S u u r k u u s k J. Interpretation of calorimetric thermograms and their dynamic corrections. - *Biological microcalorimetry*. Academic Press Inc., London 1980, p. 311-341.

10. К о р н и ш - Б о у д е н Э. Основы ферментатив-ной кинетики. М., Мир, 1979. 280 с.

II. S i i м е р Е. Generalized rate equation for one-substrate enzymatic reactions. - Biotechnol. and Bioeng., 1978, 20, N 12, p. 1853-1864.

I2. 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.

I3. 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. 11-18.

M. Kurvits, E. Siimer

Kinetics of One-substrate Enzymatic Reactions X
Kinetics of Lactose Hydrolysis by β -galactosidase
from *Penicillium canescens*

Abstract

The kinetic parameters of lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Penicillium canescens* have been determined at 30 °C and 50 °C using Calvet heat conduction-type calorimeter LKB 2277. For this enzyme scheme of fermentative reaction has been given. The kinetics of lactose hydrolysis for two β -galactosidase preparatives - from *Curvularia inaequalis* and from *Penicillium canescens* has been compared. Comparison of efficiency of batch reactors has been presented for two different initial substrate concentrations.

ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ
ПОДСЫРНОЙ СЫВОРОТКИ

В данной статье приводится краткий анализ литературных данных по изучению сывoroточных белков с целью применения их в пищевой промышленности и медицине.

I. Введение

По данным института питания АМН СССР, достигнутый сейчас уровень потребления пищевых продуктов в СССР не только полностью обеспечивает, но и превышает энергетические потребности человека [1]. Рост потребления высококалорийных продуктов (сахар, пшеничный хлеб из высших сортов муки и др.), практически лишенных незаменимых пищевых веществ, приводит к тому, что рацион современного человека, вполне достаточный по энергетической ценности, не в состоянии обеспечить физиологические потребности организма в незаменимых ингредиентах питания. Среди последних первостепенное значение имеет животный белок, который является основным источником наиболее дефицитных эссенциальных аминокислот. Интересно отметить, что в общих ресурсах животных белков (молоко, мясо, яйца, рыба) доля молочного белка самая высокая — около 50 %, а степень использования его в производстве пищевых продуктов по сравнению с другими видами животного сырья — незначительна.

По материалам [2] для 80-х годов характерны интенсивные исследования в области создания и совершенствования технологии концентрирования и выделения белков из самых различных перспективных источников, из подсырной сыворотки, крови, одноклеточных, рыбы, криля, листьев растений, картофеля, костей, пшеничной клейковины и т.д. В то же

время зарубежные авторы прямо заявляют [3-5], что из новых источников пищевых белков, разработанных за последние 10 лет, только белки подсырной сыворотки как вторичное сырье имеют реальные перспективы для их широкого применения. Подчеркиваются следующие преимущества применения белков подсырной сыворотки [6-10]:

- сыворотку не надо специально производить, она является побочным продуктом молочной промышленности;
- белки ее имеют высокую питательную ценность и не содержат токсичных компонентов;
- белки обладают определенными функциональными свойствами (хорошая растворимость, жиро- и водосвязывающая способность, эмульгирующие и пенообразующие свойства, гелеобразование);
- их можно превращать в порошкообразный продукт, легко вводимый в состав широкого набора пищевых продуктов без неблагоприятного влияния на потребительские свойства последних.

Следовательно, препараты белков подсырной сыворотки, благодаря их высокой питательной ценности и ярко выраженным свойствам, должны найти целенаправленное научно обоснованное применение, т.е. белки подсырной сыворотки нельзя применять только лишь как препараты для обогащения пищевых продуктов белком. Специалистами предполагается, что в дальнейшем вместо поиска новых сырьевых источников пищевого белка будет развиваться выпуск дорогостоящих белков с узкоспецифическими функциями [11-12], в том числе и белков из подсырной сыворотки.

ПУТИ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ПОДСЫРНОЙ СЫВОРОТКИ

При переработке молока на белковые продукты (сыр, творог, казеин, брынза) образуется молочная сыворотка, содержащая до 50 % сухих веществ молока. В ней содержатся белок, лактоза, жир, минеральные вещества и др. (табл. 3). В настоящее время в СССР ежегодно получают более 10 млн. т молочной сыворотки. В перспективе этот показатель будет расти в связи с ростом производства молочных белковых продуктов [13]. Традиционными продуктами переработки молочной сыво-

ротки являются обогащенная сыворотка, сгущенная сыворотка, сухая сыворотка и молочный сахар (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Производство основных продуктов из молочной сыворотки в СССР [14]

Вид продукции	Объемы производства, тыс. т	
	в 1985 г.	в 1990 г.
Обогащенная сыворотка	1900	2000
Сгущенная сыворотка	500	550
Сухая сыворотка	60	70
Молочный сахар	25	35

Анализируя данные, приведенные в табл. 1, можно прийти к выводу, что несмотря на развивающиеся темпы переработки молочной сыворотки, содержащиеся в ней белки не привлекли к себе пока еще должного внимания. Если учесть, что в обезжиренном молоке содержится 3,4, а в сыворотке - 0,8 % белка, то можно подсчитать, что предприятия Мясомолпрома страны возвратили сельскому хозяйству не менее 700 тыс. т молочных белков. Для получения такого количества пищевого белка, например, в виде мяса, необходимо переработать 17,5 млн. голов крупного рогатого скота с живым весом 400-450 кг [15].

В то же время зарубежный и отечественный опыт четко показали, что максимальный эффект переработки сыворотки обеспечивается рациональным использованием каждого ее компонента, т.е. выделением из молочной сыворотки отдельных нативных белков веществ и лактозы.

В мире накоплен большой опыт по переработке сыворотки. Построены и функционируют крупные заводы производства сывороточных концентратов в Голландии, Дании, Бельгии, Франции, Австралии и др. В США, например, около 50 фирм и компаний вырабатывают концентрат сывороточного белка (КСБ) с содержанием белка 35 % и 5-6 предприятий КСБ с содержанием белка до 70-80 % [16].

В промышленном масштабе испытаны следующие методы выделения белков из подсырной сыворотки (таблица 2):

Т а б л и ц а 2

Состав КСБ в зависимости от технологии
концентрирования белков [17]

Процесс выделения	Состав, %			
	белок	лактоза	зола	жир
Электродиализ	20-35	45-60	3-18	2-4
Комплексное осаждение	55-60	18-22	10-18	6-9
Гельфильтрация	54	25	14	2
Ультрафильтрация	30-70	20-55	3-5	4-5
Ионный обмен	15	78	1	1
Ультрафильтрация + + гельфильтрация	81	12	2	3
Ионный обмен + ультра- фильтрация	76	16	1	3

Из вышеперечисленных методов дальнейшее промышленное развитие получил метод ультрафильтрации в сочетании с методами электродиализа для удаления минеральных солей и обратного сноса, для первоначального концентрирования исходной сыворотки в 2-4 раза [18-22].

Средние среднестатистические данные по составу молока, сыворотки и продуктов переработки их методом ультрафильтрации приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

Состав продуктов переработки сыворотки в зависимости от концентрирования ее методом ультрафильтрации [23]

Компонент	%				
	молоко	сыворотка	степень концентр. 5 раз	степень концентр. 20 раз	КСБ
Сухие вещества	12,9	6,6	9,5	18,0	100
Белок	3,3	0,6-0,8	2,8	9,5	30-80
Лактоза	5,0	4,8	5,5	5,8	10-55
Молочный жир	3,9	0,4	-	-	4-5
Минеральные вещества	0,7	0,7	0,7	0,7	3-5

На современных предприятиях переработки молочной сыворотки по упрощенной схеме сыворотку сгущают методом обратного сноса до содержания сухих веществ 20 %, белковую и

лактозную фракцию разделяют методом ультрафильтрации. Лактозную фракцию направляют на дальнейшее производство молочного сахара – рафинада или гидролизуют иммобилизованной лактозой на глюкозу и галактозу. Полученный гидролизат либо служит питательной средой для производства пекарских дрожжей, не содержащих посторонних микроорганизмов, либо используется для производства заменителя сахара – глюкозо-галактозного сиропа. Белковую фракцию высушивают. Сухой продукт, содержащий в среднем 35–65 % белка, используют для многочисленных пищевых, медицинских и кормовых целей.

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ПОДСЫРНОЙ СЫВОРОТКИ

Т а б л и ц а 4

Белковый состав подсырной сыворотки [6, 23]

Наименование	Содержание в сыворотке, г/л	Содержание в КСБ, %	Изоэлектрическая точка, рН	Молекулярная масса
Общий белок	6,0	100	-	
β -лактоглобулин	3,0	50	5,35–5,49	18300
α -лактальбумин	0,7	12	4,20–4,50	14000
ИММУННЫЕ ГЛОБУЛИНЫ	0,6	10	5,50–8,30	1500–1 млн
сывороточный альбумин	0,3	5	5,13	69000
протеозо-пептонная фракция	1,4	23	-	-

Из таблицы 4 видно, что 50 % от общего содержания сывороточных белков составляет β -лактоглобулин (соответствует β компоненту на седиментационной диаграмме белков сыворотки молока – отсюда и его название), представляющий собой белок с молекулярной массой 18300 (мономер). При значениях рН от 3,5–7,5 β -лактоглобулин существует в виде димера.

α -лактальбумин – второй из основных белков молочной сыворотки. Он содержит 15,9 % азота, 1,9 % серы и в значительном количестве (7,2 %) триптофана. Иммуноглобулины содержат смесь гликопротеинов с различными размерами и отвечают за иммунную защиту вообще.

Сывороточный альбумин является типичным представителем глобулярных белков и переходит в молоко из сыворотки крови.

Протеозо-пептонная фракция (смесь гликопротеинов и фосфопротеинов) является представителем сывороточных белков, не коагулирующих под воздействием предварительной тепловой обработки при pH 4.6. Протеозо-пептонную фракцию осаждают специфическими реактивами.

Характерными свойствами сывороточных белков является: значительное содержание серосодержащих аминокислот (I,6 I,9 и I,9 % сыры с молекуле β -лактоглобулина, α -лактальбумина и сывороточного альбумина, соответственно),

- высокая растворимость при широком диапазоне pH, т.е. они не осаждаются в изоэлектрической точке белков,

- проявление специфических технологических свойств, в частности, у препаратов КСБ (растворимость, взбиваемость и пенообразование, эмульгирующие и гелеобразующие свойства).

Важно также отметить, что технологические (функциональные) свойства КСБ или отдельных его фракций можно изменять в широких пределах с помощью модификации белков [24-26]. Необходимо обратить внимание на химические способы (ацилирование, амидирование, этерификация, фосфорилирование, тиолирование, восстановительное алкилирование), ферментативные и физические способы модификации сывороточных белков.

ПРИМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Перед описанием конкретных примеров применения КСБ, выделяемых путем ультрафильтрации, в литературе очень часто упоминается, что функциональные свойства белков колеблются в широких пределах и во многом определяются технологическими параметрами обработки сыворотки и составом КСБ. Технологические параметры (скорость и давление при ультрафильтрации, pH, температура и т.д.), в первую очередь, влияют на конформационные состояния белков в растворе. Следовательно, очень важным критерием качества КСБ является его относительная нативность. Уже 5-10%-ная денатурация может привести к существенным изменениям технологически значимых свойств белка. С другой стороны, состав КСБ может также существенно влиять на технологические свойства КСБ. Следова-

тельно, нативность белков и состав КСБ должны быть строго регламентированы при переработке молочной сыворотки и выделении высококачественных сывороточных белков с узкоспецифическими функциями.

Основные области применения КСБ [27]:

1. Новые молочные диетические продукты и продукты для грудных детей. Здесь важное значение имеет концентрация нативных сывороточных белков в КСБ и отсутствие в нем лактозы и галактозы, а также оптимизированный Nа-баланс продуктов.

2. Безалкогольные напитки. Здесь подразумевают, в первую очередь, напитки с повышенным содержанием белка. В сухие сывороточные концентраты вводят вкусовые вещества (ваниль, цитрусовые, шоколад) и соответствующие витамины. Порошки легко растворяются в теплой воде. Для получения одного стакана напитка (227 г) растворяют 25-31 г порошка. Все новые высококачественные напитки пользуются хорошим спросом, в частности, в качестве пищевых напитков в детских учреждениях.

3. Кондитерская промышленность. Здесь наиболее перспективным направлением следует считать применение КСБ в качестве заменителя яичного белка. Большой интерес представляет работа [28], где авторами разработан новый вид начинки для тортов и пирожных на основе сбитой белковой массы, не содержащей сливочного масла. Благодаря этому, начинка обладает меньшей калорийностью и хорошо сохраняются ее свойства.

4. Хлебобулочные изделия. Установлено, что реологические свойства теста зависят от количества внесенного КСБ и степени денатурации белков. Содержание КСБ в тесте значительно влияет на его водопоглотительную способность и стойкость. Предполагают, что умелое применение КСБ позволяет уменьшить расход пшеничной муки в хлебопечении и увеличить ассортимент продуктов.

5. Новые молочные продукты (забеливатель для кофе, сухие взбитые сливки, мороженое).

6. Сыроделие. Применение КСБ для обогащения белком молока при производстве сыра позволяет сократить сроки созревания, улучшить органолептические показатели готового продукта и увеличить выход сыра, а также ускорить коагуля-

цию молока (следовательно, уменьшить расход дефицитного милокосвертывающего фермента).

7. Мясная промышленность. В общем случае концентраты с содержанием 30–50 % сывороточных белков могут быть рекомендованы для замены сухого обезжиренного молока и улучшения адсорбции жира и воды в разнообразных пищевых продуктах из мяса. Например, голландской фирмой DMV-Campina разработаны специальные модификации КСБ. В 15%-ном растворе они имеют превосходную вязкость, обладают высокими связывающими свойствами и предотвращают потерю жира и влаги во всех изделиях из измельченного мяса. Они являются идеальными стабилизаторами для мясных смесей.

Итак, сывороточные белки, выделяемые путем ультрафильтрации, являются полноценными пищевыми белками с узкоспецифическими функциями. Следовательно, научно-исследовательские работы, направленные на изучение химико-технологических свойств сывороточных белков, возможностей их модификации и на разработку методов целенаправленного применения концентрата сывороточных белков или его отдельных фракций, являются актуальными и имеют большое народно-хозяйственное значение.

Л и т е р а т у р а

1. Б р е н ц М.Я. Роль белков молочной сыворотки в повышении биологической ценности продуктов. -Хлебопекарная и кондитерская промышленность, 1983, № 8, с. 6–7.
2. XXI Международный молочный конгресс. Материалы, том 2. - М.: Агропромиздат, 1985. - 335 с.
3. M e l a c h o u r i c N. Critical aspects in development of whey protein concentrate. - J. Dairy Sci., 1984, vol. 67, N 11, p. 2693–2700.
4. D o s a k o S. Manufacture and use of whey protein concentrates. - New Food Ind., 1985, vol. 27, N 4, p. 60–68.
5. Z a l l R. Trends in whey fractination and utilization, a global perspective. - J. Dairy Sci., 1984, vol.67, N 11, p. 2621–2629.
6. W i t J.N. de. Structure and functional behaviour of whey proteins. - Neth. Milk and Dairy J., 1981, N 35, p. 57–64.

7. Wit J.N. de., Klarenbeck G., Hontelez - Backx E. Evaluation and functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 1. Isolation and characterization. - Neth. Milk and Dairy J., 1983, vol. 37, p. 37-49.
8. Wit J.N. de. Functional properties of whey protein in food systems. - Neth. Milk and Dairy J., 1984, vol. 38, N 2, p. 78-89.
9. Mangino M.E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. - J. Dairy Sci., 1984, vol. 67, N 11, p. 2711-2722.
10. Kinsella J.E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. - CRC Crit. Rev. Food Sci. and Nutr., 1984, vol. 21, N 3, p. 197-262.
11. West S.I. Food proteins: sources and properties. - J. Chem. Technol. and Biotechnol., 1984, vol. B 34, N 3, p. 176-181.
12. West S.I. What does the food industry require of dairy ingredients? - J. Soc. Dairy Technol., 1984, vol. 37, N 4, p. 117-119.
13. Сергеев В.Н. Молочная промышленность в завершающем году пятилетки. - Молочная промышленность, 1985, № 4, с. I-7.
14. Рациональные планирования в производстве молочных белковых концентратов. - Обзорная информация. М., 1985.
15. Молочников В.В. Перспективы переработки пахты, обезжиренного молока и сыворотки. - Молочная промышленность, 1983, № 8, с. 5-8.
16. Гурьянов А.И. Научно-исследовательские работы по сывороточным концентратам. - Хлебопекарная и кондитерская промышленность, 1983, № 8, с. 8-9.
17. Delancy R.A.M. Composition, properties and uses of whey protein concentrates. - J. Soc. Dairy Technol., 1976, vol. 29, N 2, p. 91-101.
18. Boer R. de, Wit J.N. de, Hiddink J. Processing of whey by means of membranes and some applications of whey protein concentrate. - J. Soc. Dairy Technol., 1977, vol. 30, N 2, p. 112-120.

19. A a l b e r s b e r g W.J. Utilization of dairy by-products and dairy waste. - In: IFST Annual Symposium - Food Technology in Europe - July 1981. Netherlands Institute for Dairy Research, 1981, p. 172-181.

20. L o r e n z e n P. Ultrafiltrierte Molken - proteinkonzentrate. - Lebensmitteltechnik, 1984, B. 16, Nr. 10, S. 512, 514-515.

21. M a t h e w s M.E. Whey protein recovery processes and products. - J. Dairy Sci., 1984, vol. 67, N 11, p. 2680-2692.

22. T h o m s o n A.R. Recent developments in protein recovery and purification. - J. Chem. Technol. and Biotechnol., 1984, B 34, N 3, p. 190-198.

23. M a r s h a l l K.R. Industrial isolation of milk proteins: whey proteins. - New Zealand Dairy Research Institute, Palmerston North.

24. H a r p e r W.J. Model food system approaches for evaluating whey protein functionality. - J. Dairy Sci., 1984, vol. 67, N 11, p. 2745-2756.

25. S c h m i d t R.H., P a c k a r d V.S., M o r r i s H.A. Effect of processing on whey protein functionality. - J. Dairy Sci., 1984, vol. 67, N 11, p. 2723-2733.

26. K e s t e r J.J., R i c h a r d s o n T. Modification of whey proteins to improve functionality. - J. Dairy Sci., 1984, vol. 67, N 11, p. 2757-2774.

27. Physico-chemical aspects of dehydrates protein-rich milk products. - In: Proceedings of IDF Symposium, 1983, Conference Centre Loskolew, Helsingør-Denmark, 1983.

28. С и д а н о в а М.Ю., К у з н е ц о в а Л.С., О л е й н и к о в а В.Н. Новая начинка для тортов длительного хранения. - Хлебопекарная и кондитерская промышленность, 1985, № 3, с. 17.

29. S a n c h e s H.D., T o r r e M.A. de la, O s e l l a C.A., M a n c u e l l o J.C., F a b r e H.C. Whey protein concentrates in baking. I. Effect on rheological properties. - Bakers Dig., 1984, vol. 58, N 3, p. 18-20.

Chemical-technological Properties of
Whey Proteins

Abstract

The future growth of the whey products industry with different functional demands to proteins is reviewed. Chemical composition of whey and whey protein concentrates and various processing procedures are discussed. The importance of the development of protein as an additive with the determination of the technological properties is shown. Various food uses with whey proteins are considered.

УДК 547.92.3:536.435:543.541.6

М.К. Фриденenthal, А.А. Клар

Белки тесно связаны с их природным состоянием, т.е. структурой конформационных изменений молекул белка [1,2]. Однако известно, что при промышленном обработке белковых препаратов осуществляются различные технологические операции (экстракция, осаднение, очистка, сушка и т.д.), которые могут вызывать конформационную перестройку белковых макромолекул, в результате чего изменяется реакционная способность и биологическая активность белка [3,4]. Следовательно, существенная важность белка является необходимым критерием для характеристики качества белка по сохранению функционального свойства.

В этом плане большой интерес вызывает альбумин — белковый белок, присутствующий во всех растительных и животных тканях (в основном в белке яич, сыворотке молока, семенах растений и т.д.). Среди белковых соединений особое значение принадлежит глутамину, который является плазмой крови. Их широко используют для пищевых целей, так как они отличаются уникальными свойствами, для характеристики которых важность белка является основным критерием.

Важнейшим свойством является способность к образованию геля, что является основным свойством для многих белков. В настоящее время широко используются различные методы для определения качества белка, такие как электрофорез, ультрафиолетовая спектроскопия, инфракрасная спектроскопия и т.д. В настоящее время широко используются различные методы

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА
ДЕНАТУРАЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

В настоящее время в пищевых и медицинских отраслях народного хозяйства широко используются препараты белкового происхождения, обладающие определенными химическими и биологическими функциями. Сохранение полной функциональности белков тесно связано с их нативным состоянием, т.е. отсутствием конформационных изменений молекул белка [1,2]. Однако известно, что при производстве белковых препаратов осуществляются различные технологические операции (экстракция, осаждение, очистка, сушка и т.д.), которые могут вызывать конформационную перестройку белковых макромолекул, в результате чего изменяются реакционная способность и биологическая активность белка [3,4]. Следовательно, относительная нативность белка является необходимым критерием для характеристики качества белка по сохранению функциональных свойств.

В этом плане большой интерес вызывают альбумины - глобулярные белки, присутствующие во всех растительных и животных тканях (в основном в белке яиц, сыворотке крови, молоке, семенах растений и т.д.). Среди перечисленных альбуминов особое внимание привлекают препараты, выделенные из плазмы крови. Их широко используют для медицинских целей, так как они отличаются узкоспецифическими функциями, для характеристики которых нативность белка является первостепенным значением.

Исследование изменений свойств белков в зависимости от разных внешних факторов осуществляется с помощью многих экспериментальных методов как седиментация, флуоресценция, электрофорез, калориметрия, хроматографические методы и т.д. [5, 6]. В последнее время особое внимание уделяют жидкост-

ной хроматографии, которая отличается высокой эффективностью разделения белков, а также простотой и быстротой анализа. Исходя из этого, в настоящей работе сделана попытка изучить процесс денатурации сывороточных белков с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и характеризовать препараты по их нативности.

Материалы и методы

В качестве белковых препаратов использовали альбумин из человеческой сыворотки крови различного происхождения — препарат, полученный по методу Кону и который был представлен Станцией переливания крови при Минздраве ЭССР (препарат ЧСА-1) и альбумин, лиофилизированный фирмой "Reanal", Венгрия (препарат ЧСА-2).

Растворы альбумина приготавливали в 0,05 М Трис-НСI буфере с рН 8,0 и концентрацией 1,0 мг сухого вещества/мл.

Температурную обработку белка проводили с помощью ультратермостата УТУ-2 (ПНР) при 8 различных температурах: 20, 50, 55, 60, 65, 70, 80 и 90 °С в течение 30 мин, после чего пробы охлаждали до комнатной температуры (20 °С) и анализировали хроматографически.

Хроматографический анализ осуществляли на оборудовании фирмы PHARMACIA FINE CHEMICALS (Швеция). Использовали жидкостный хроматограф с системой быстрого анализа белков FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY-FPLC с УФ детектором при длине поглощающей волны 280 нм и электронным интегратором LIQUID CHROMATOGRAPHY CONTROLLER LCC-500. Хроматографическое разделение белка проводилось на стандартной аналитической колонке HR 5/5, заполненной анионитом MONO Q (заряженными группами являются кватернарные амины— $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_3$).

Перед хроматографией элюенты и образцы подвергались мембранной фильтрации и деаэрации. Использовались фильтры типа 5M с пористостью 0,45 мкм (Millipore, США). После деаэрации дополнительно проверяли рН элюента.

Среди разных нами испытанных условий проведения хроматографического разделения было выбрано элюирование с линейным градиентом в 0-0,5 М NaCl в 0,05 М Трис-НСI буфере с рН 8,0 с задержкой начала градиента на 5,0 мин после ввода

пробы со скоростью подвижной фазы 0,7 мл/мин. Скорость образования градиента составляла 0,025 М NaCl/мин. После окончания градиента колонку обрабатывали с 1,0 М раствором NaCl в 0,05 М Трис-HCl буфере с pH 8,0 (2,0 мл), а перед вводом новой пробы уравнивали ее с буфером без NaCl (7,5 мл). Ввод пробы в количестве 100 мкл осуществляли с помощью дозирующей петли и семиходного вентиля.

При использовании описанной выше методики продолжительность одного анализа составляла 43 мин.

Было проведено 5 параллельных опытов, средние величины времен удерживания (t_R) характеризовали по дисперсии.

Результаты исследований

В данной работе изучение процесса денатурации и ее влияния на конформацию сывороточных белков основывалось на предположении, что температурная обработка белков вызывает конформационные перестройки, которые отражаются в изменении величины заряда белковых макромолекул, что позволяет ожидать разделение нативных и денатурированных форм исследуемых белков на высокоэффективном анионообменнике с применением линейного градиента NaCl.

Хроматограмма препарата ЧСА-I, не подвергавшегося к температурной обработке (рис. 1а), показывает, что препарат характеризуется двумя пиками, отличающимися по временам удерживания и своим содержанием в препарате. t_R первого и второго пика составляли, соответственно (16,8 \pm 0,2) мин и (18,5 \pm 0,2) мин. Точное содержание обоих компонентов в препарате, однако, прямо при эксперименте, определить не удалось, так как при использованных условиях не достигнуто полного разделения компонентов и поэтому интегратором отдельно не регистрировались. Тем не менее, возникает вопрос о происхождении примесей (т.е. второго компонента) в препарате. Являются ли они следом другого белка, присутствующего в препарате, или принадлежат олигомерным формам молекул альбумина? По данным Фостера [10], многие кристаллические препараты альбумина подлежат частичной спонтанной полимеризации (даже в пределах до 50 %) и после длительного хранения таких препаратов требуется их обязательная переоочистка.

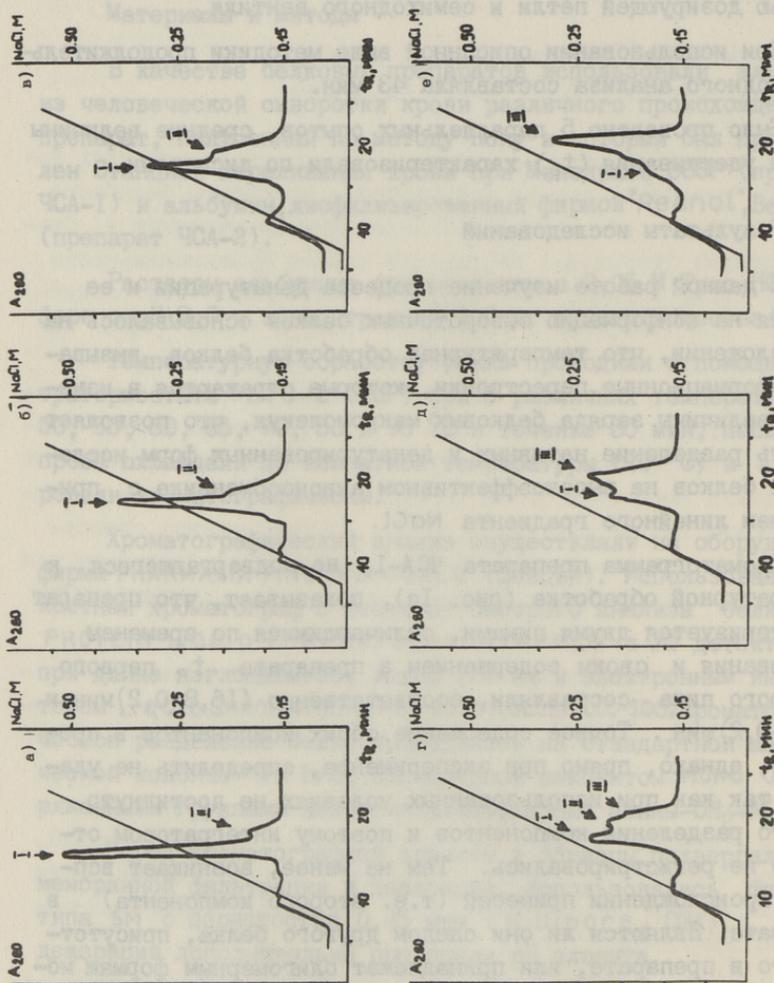


Рис. 1. Ионобменная хроматография препарата ЧСА-1 после термической обработки (30 мин) при различных температурах. Концентрация препарата 1,0 мг/мл в 0,05 М. Триэ-НС1 буфере с рН 8,0. а) исходный препарат 20 °С, б) 55 °С, в) 60 °С, г) 65 °С, д) 70 °С, е) 75 °С.

Хроматограммы белка, обработанного при различных температурах (рис. 1б-1е), показывают, что повышением температуры до 60 °С увеличивается относительное содержание второго пика. При температуре 65 °С проявляются контуры третьего пика, время удерживания которого составляет $(20,9 \pm 0,2)$ мин (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Время удерживания компонентов сывороточного альбумина препарата ЧСА-1

Температура обработки, °С	Время удерживания, мин		
	I компонент	II компонент	III компонент
20 (необработанный)	$16,8 \pm 0,2$	$18,5 \pm 0,2$	-
55	$16,9 \pm 0,2$	$18,5 \pm 0,2$	-
60	$17,0 \pm 0,2$	$18,5 \pm 0,2$	-
65	$16,9 \pm 0,2$	$19,2 \pm 0,9$	-
70	$17,5 \pm 0,2$	$19,7 \pm 0,4$	$20,9 \pm 0,1$
75	-	-	$20,8 \pm 0,5$
80	-	-	$21,4 \pm 0,1$

При дальнейшем нагревании наблюдается уменьшение пиков двух первых компонентов и увеличение пика третьего компонента, который при температуре 75 °С и выше станет главным, причем первый пик, характеризующийся основной компонент в исходном препарате, почти полностью исчезает. Необходимо также отметить, что при температуре 70 °С время удерживания первого пика увеличивается на 0,6 мин.

Препарат ЧСА-2, необработанный при температуре, также содержит два компонента с t_R ($16,9 \pm 0,2$) мин и ($19,4 \pm 0,2$) мин для первого и второго пиков, соответственно (рис. 2). Различие, однако, в том, что второй пик по своей площади значительно больше, чем в препарате ЧСА-1. Повышение температуры сопровождается постепенным уменьшением этих двух пиков и появлением третьего пика с t_R ($21,2 \pm 0,3$) мин, который при 80 °С становится преобладающим.

На основе сравнения хроматограмм можно считать, что пик с временем удерживания $t_R = 16,8$ мин характеризует содержание нативного белка. Пики с большим или меньшим временем удерживания соответствуют измененным формам молекул.

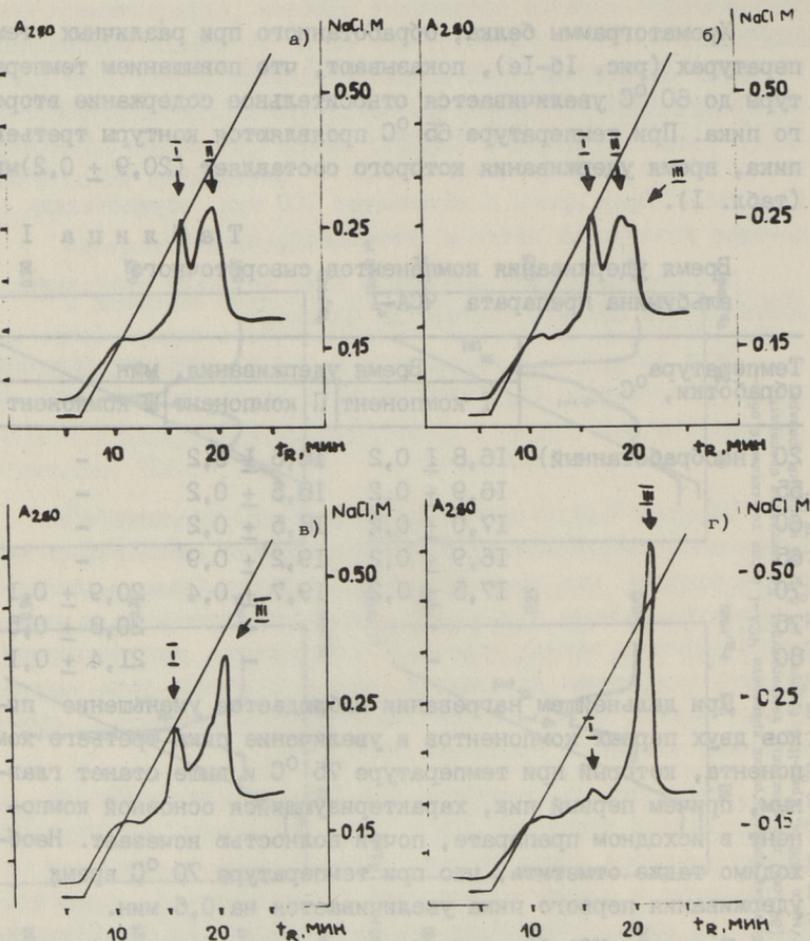


Рис. 2. Ионообменная хроматография препарата ЧСА-2 после термической обработки (30 мин) при различных температурах. Концентрация препарата 1,0 мг/мл в 0,05 М. Трис-НС1 буфере с pH 8,0, а) исходный препарат 20 °С, б) 60 °С, в) 70 °С, г) 80 °С.

Увеличение молекулярной массы и числа ионизируемых групп на одну молекулу должно увеличить время удерживания. И, наоборот, уменьшение времени удерживания может быть объяснено или распадом молекул или снижением количества ионизируемых групп на поверхности молекулы в результате перестройки третичной структуры белка. Однако характеризовать механизм инактивации только по данным хроматографии однозначно невозможно. По мнению авторов, увеличение времени удерживания

может являться доказательством образования денатурированных форм белка.

Для количественной характеристики нативного белка удобно использовать относительную нативность (соотношение количества нативного белка в общее количество белка в %), так как площади пиков отдельных компонентов являются пропорциональными их количеству в препарате. Таким образом, определяя общие площади хроматограмм препарата S и площади пика нативного белка S_N , легко выразить относительную нативность как

$$d_N = \frac{S_N}{S} \times 100, \%$$

Исходя из вышеизложенной формулы, рассчитали d_N для препарата ЧСА-1, соответствующие результаты изображены на фиг. 3. Из нее следует, что исходный препарат ЧСА-1 характеризуется нативностью около 90 %. Далее, свыше 55 °C наблюдается уменьшение нативности и после 30 мин обработки при 75 °C доля нативного белка составляет только 10 %. Препарат ЧСА-2 характеризуется низкой исходной нативностью (28,6 %) и подробный анализ процесса дальнейшей инактивации не представляет особого интереса, так как до температуры 70 °C нативность препарата ЧСА-2 практически не изменяется. При 80 °C нативность препарата незначительная.

Математическая обработка данных, представленных на рис. 3, показывала, что в температурном интервале 55 °C - 75 °C имеется хорошая взаимосвязь между $\ln d_N$ и обратной температурой в виде $\ln d_N = -(12,94 \pm 0,12) + (4540 \pm 40)/T$ с коэффициентом корреляции $r = 0,982$ и со стандартным отклонением 0,035.

На основе полученных результатов можно заключить, что при использованных условиях хроматографирования оба препарата сывороточного альбумина характеризуются двумя пиками. В пределах температур 60 - 65 °C наблюдается изменение сдвига равновесия в сторону образования второго компонента, а при последующей температурной обработке появляется новый - третий компонент, который при температурах 75 - 80 °C становится преобладающим.

Таким образом, жидкостная хроматография с системой FPLC является удобным методом определения нативности пре-

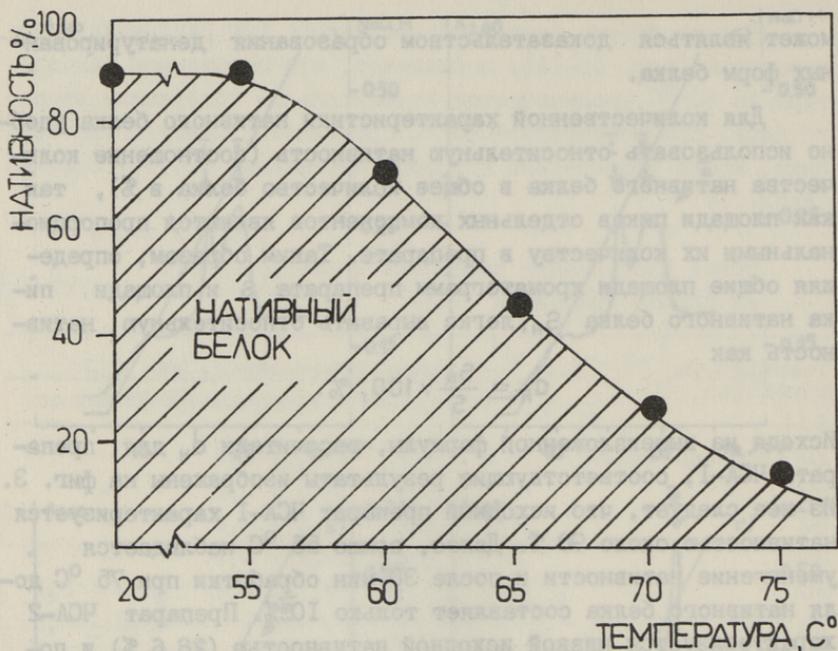


Рис. 3. Относительная нативность препарата ЧСА-1 в зависимости от температуры обработки (30 мин). Концентрация препарата 1,0 мг/мл в 0,05 М Трис-НС1-буфере с рН 8,0.

паратов альбумина, позволяющим количественно характеризовать нативность препаратов и качественно описать изменения протекающие в процессе инактивации.

Л и т е р а т у р а

1. West S.I. Food proteins: sources and properties. - J. Chem. Technol. and Biotechnol., 1984, В 34, N 3, p.176-181.
2. Peters T.J. Serum albumin. - In: Advances in Clinical Chemistry / Editors: O. Bodansky, C.P. Stewart. Acad. Press Inc., New-York, 1970, p. 37-111.
3. Ж о л и М. Физическая химия денатурации белков. - М.: Мир, 1968, 361 с.
4. Структура и стабильность биологических макромолекул, - М.: Мир, 1973, 584 с.
5. О с т е р м а н Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. - М.: Наука, 1985, 536 с.

6. Бейли Дж. Методы химии белков. - М.: Мир, 1965, 284 с.

7. Torres A.R., Dunn B.E., Edberg S.C., Peterson E.A. Preparative high performance liquid chromatography of proteins on ion-exchange columns with carboxymethyl dextrans as displacers. - J. Chromatogr., 1984, vol. 316, p. 125-132.

8. Goheen S.C., Engelhorn S.C. Hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography of proteins. - J. Chromatogr., 1984, vol. 317, p. 55-65.

9. Gupta B.B. Determination of native and denatured milk proteins by high-performance size exclusion chromatography. - J. Chromatogr., 1983, vol. 273, p. 463-475.

10. Foster J.F. Some aspects of the structure and conformational properties of serum albumin. - In: Albumin structure, function and uses / Editors: V.M. Rosencroft, M. Ornatz, M.A. Rothschild. Pergamon Press, Oxford, 1977, p. 53-84.

Investigation of the Denaturation Process
of Serum Albumin by Chromatography

Abstract

Thermal denaturation of two human serum albumin preparations by ion exchange fast protein liquid chromatography was investigated. It has been shown that both of the preparations contained at least two components with the retention time (t_R) of $(16,8 \pm 0,2)$ min and $(18,5 \pm 0,2)$ min measured under the fixed conditions. In the temperature range of $20 - 65^\circ\text{C}$ the increase of the proportional amount of the second component was observed. At elevated temperatures the contours of a new peak with t_R of $(20,9 \pm 0,2)$ min appeared, which became dominative at temperatures above 70°C . It was suggested that only the first peak on the chromatogram of serum albumin is responsible for the native form of protein, the latter components with the longer t_R characterize the nonactive state of serum albumin.

A method for the rapid estimation of the relative nativity d_N of human serum albumin preparations has been proposed.

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИМИНОЭФИРАМИ

Сообщение III

Микрокалориметрическое исследование кинетики реакции гидролиза иминоэфиров

В наших первых сообщениях [1, 2] обсуждены вопросы применения в качестве модифицирующих реагентов белков соединений типа иминоэфиров. Для практического использования диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты (в формах соли и свободного основания) для реакции амидинирования необходимо выяснить оптимальные условия его применения. Как нами было показано [1], диэтиловый эфир бисиминоадипиновой кислоты (ДЭБК) легко гидролизуеться в водных растворах, причем в щелочной среде основным продуктом реакции является сложный эфир.

Целью настоящей работы являлось исследование кинетики гидролиза ДЭБК в водно-органическом растворителе, в системе вода-диоксан, и тем самым выяснение возможности применения водно-органической среды для более эффективного использования ДЭБК для модифицирования белков (а также иммобилизации ферментов) через лизиновые остатки белка.

Для исследования кинетики реакции гидролиза двух форм ДЭБК нами ранее использовался спектрофотометрический метод [1]. Для растворов, содержащих диоксан, применение УФ-спектров в этих целях затруднительно из-за сильного поглощения в используемом диапазоне длины волн. Поэтому в данной работе применяли для получения кинетических кривых термохимический метод, микрокалориметрию. Основные принципы метода, в частности, для теплопроводящих калориметров типа Кальве, изложены нами ранее [3].

Материалы и методы

Диэтиловый эфир бисиминоадипиновой кислоты (ДЭБК) в форме соли и свободного основания синтезирован из адипонитрида; структура продуктов подтверждалась ИК-спектрами и элементарным анализом [1].

Реакция гидролиза ДЭБК исследовалась в системах 0,2 М боратный буфер - диоксан при температурах 20 и 30°.

Реакционная смесь с помощью перистальтического насоса непрерывно циркулировалась со скоростью 15 мл/ч в системе проточная ячейка микрокалориметра ЛКБ 2277 - реактор (объем 150 мл, снабженный магнитной мешалкой).

Эффективный объем измерительной ячейки - 0,7 мл. Автоматически записывалась зависимость выходного сигнала (теплового потока, пропорционального скорости реакции) в микроваттах от времени. Полученные термограммы корригировались на ЭВМ в отношении тепловой инерции измерительной системы. Для корригирования использовалось уравнение Тиана [4]; константа времени системы, определенная нами, предварительно равна 2,3 мин. Кроме того, также нужно проводить экстраполяцию кинетической кривой к началу реакции, так как требуется 10-20 мин. до поступления раствора в ячейку через соединительные трубки и для установления состояния, близкого к стационарному.

Как показали результаты исследования реакции гидролиза ДЭБК, эффективный порядок реакции всегда близок к единице.

Для каждой кинетической кривой порядок реакции определялся с помощью ЭВМ по специальной программе. Считая реакцию гидролиза псевдомономолекулярной, вычисляли значение константы скорости. Для реакций первого порядка легко показать, что логарифмы скорости реакции линейно зависят от времени:

$$\ln v = \ln(k \cdot c_0) - kt, \quad (I)$$

где v - скорость реакции,

k - константа скорости реакции,

c_0 - исходная концентрация вещества,

t - время.

Так как выходной сигнал (тепловая мощность) микрокалориметра пропорционален скорости реакции, значение константы скорости целесообразно вычислять непосредственно из кривой выходной сигнал (в микроваттах или сантиметрах от нулевой линии) — время с использованием уравнения (I) и метод наименьших квадратов. Пределы достоверности величины расчитаны с вероятностью 0,95.

Результаты и обсуждение

Исследование реакции гидролиза ДЭБК термохимическим методом показало, что проточная система (flow through) микрокалориметра ЛКБ 2277 может быть успешно применена для исследования кинетики химических реакций, в том числе относительно быстро протекающих. С одной стороны, суммарный тепловой эффект реакции гидролиза (10–30 кДж/моль, в зависимости от условий опыта) достаточен для достижения значительного теплового потока, подлежащего измерению точною не ниже 1%. С другой стороны, опыты с продолжительностью примерно 1–6 часов хорошо корригируются методами, разработанными ранее [4], погрешность корригирования увеличивается при очень быстрых процессах, и, очевидно, требует использования в процессе корригирования величины т.н. второй константы времени калориметра.

Исследовалось влияние концентрации диоксана в растворах 0,2 М боратный буфер — диоксан на скорость гидролиза солевой формы ДЭБК при pH буферного раствора 8,5 и температуре 30 °С.

Как видно из рис. 1, величина константы скорости реакции гидролиза быстро уменьшается с повышением содержания диоксана в системе. Уже 5%-ное содержание диоксана в растворе уменьшает скорость гидролиза больше чем в 2 раза по сравнению с водным раствором. Естественно, наблюдаемый эффект не может быть объяснен снижением содержания воды в системе (молярный избыток воды в отношении ДЭБК очень велик). По всей вероятности, происходит изменение структуры раствора, значительное падение активности воды.

Скорость гидролиза ДЭБК в смешанном растворителе значительно зависит от pH раствора. Как видно из рис. 2, в области pH 7–8 эта зависимость слабо выражена, но с дальнейшим

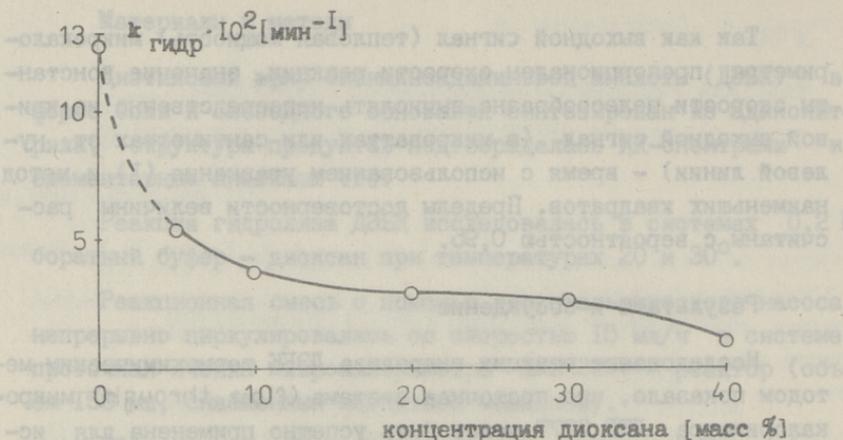


Рис. 1. Влияние концентрации диосгена на скорость реакции гидролиза формы соли ДЭБК при pH 8,5 и темп. 30 °С.

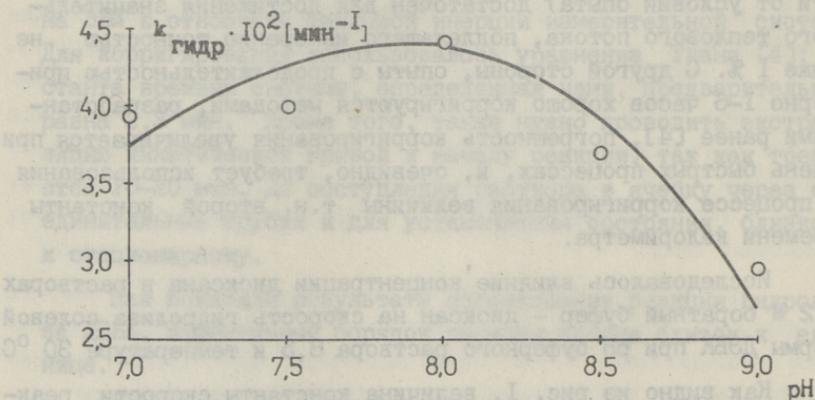


Рис. 2. Влияние pH на реакцию гидролиза соли ДЭБК в 5%-ном растворе диосгена в 0,2 М боратном буфере при темп. 30 °С.

увеличением щелочности раствора значение констант скорости гидролиза быстро уменьшается.

Аналогичные исследования проведены с другой формой ДЭБК, свободным основанием.

В таблице I представлены результаты исследования влияния pH на скорость гидролиза. Наблюдаемый эффективный порядок реакции равен 0,9–1,2, т.е. он близок к единице. Следовательно, реакцию гидролиза можно действительно считать

псевдомолекулярной. Как видно из таблицы I, а также из рис. 3, скорость гидролиза ДЭБК снижается с повышением pH раствора. В таблице 2 приведены результаты изучения влияния концентрации диоксана на скорость гидролиза ДЭБК при двух температурах и pH 8,5. Это влияние значительно отличается от наблюдаемого при гидролизе солевой формы ДЭБК. Интересно, что скорость гидролиза максимальна при содержании диоксана в растворе около 10 %. С дальнейшим увеличением содержания диоксана скорость гидролиза значительно уменьшается, но эта зависимость не слишком сильно выражена. В исследованных условиях основание ДЭБК более устойчиво к гидролитическому расщеплению по сравнению с солевой формой ДЭБК.

Т а б л и ц а I
Кинетическая характеристика реакции гидролиза
ДЭБК при температуре 30 °С

pH	Константа скорости гидролиза $k_{\text{ГИАР}} \cdot 10^2, \text{ мин}^{-1}$	Время полу-распада $t_{1/2}, \text{ мин}$	Эффективный порядок реакции гидролиза
3,0	6,76 ± 0,88	10,3	0,9
4,0	4,50 ± 0,38	15,4	1,1
5,0	3,74 ± 0,38	18,5	0,9
6,0	3,58 ± 0,21	19,4	1,1
7,0	2,64 ± 0,29	26,3	0,9
7,5	1,94 ± 0,28	35,7	1,2
8,0	1,81 ± 0,15	38,3	1,2
8,4	1,77 ± 0,09	39,2	0,9
8,9	1,55 ± 0,08	44,7	1,2
9,5	1,42 ± 0,10	48,8	1,1
9,9	1,26 ± 0,09	55,0	1,0
10,5	1,12 ± 0,08	61,9	1,1

Из данных настоящей работы явствует, что при применении двух форм ДЭБК в качестве модификатора белков можно существенно уменьшать гидролитическое расщепление бифункционального реагента. Это достигается применением вместо водной среды смешанного растворителя вода (буфер) – диоксан, причем скорость гидролиза тем меньше, чем выше содержание диоксана в системе. Повышение pH раствора до 8–10 способствует снижению гидролиза ДЭБК.

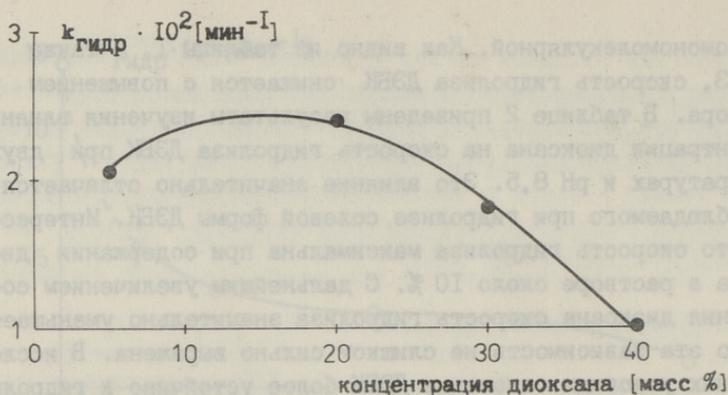


Рис. 3. Влияние концентрации диосгена на реакции гидролиза формы свободного основания ДЭБК при pH 8,5 и темп. 30 °С.

Т а б л и ц а 2

Влияние концентрации диосгена на реакции гидролиза формы свободного основания ДЭБК при pH 8,5

Концентрация диосгена, масс %	Константа скорости реакции гидролиза $k_{\text{гидр}} \cdot 10^2, \text{мин}^{-1}$	
	20 °С	30 °С
0	0,98 ± 0,16	1,64 ± 0,07
5	1,63 ± 0,31	2,08 ± 0,15
10	1,76 ± 0,47	3,01 ± 0,56
20	1,31 ± 0,34	2,39 ± 0,25
30	1,11 ± 0,18	1,81 ± 0,38
40	0,57 ± 0,08	1,00 ± 0,34

Очевидно, для оптимизации условий модификации белков следует учитывать также возможную денатурацию белка при высоких значениях pH и при высоком содержании органического растворителя в системе. Важную роль имеет зависимость скорости реакции амидинирования от условий проведения процесса модификации. Только после выяснения этих закономерностей можно окончательно выбрать условия для проведения реакции модификации белков или иммобилизации ферментов, гарантирующие предпочтительное протекание целевых реакций, подавление гидролиза бифункционального реагента и тем самым целесообразное использование последнего. Материалы дальнейших исследований в этой области будут изложены в наших следующих сообщениях.

Л и т е р а т у р а

1. К я э р д А.Я. Модификация белковых веществ иминоэфирами. Сообщение I. Получение и свойства диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1985, № 598, с. 55-65.

2. К я э р д А.Я., Т а м м е р а й д И.И. Модификация белковых веществ иминоэфирами. Сообщение II. Математическая модель кинетики процесса. - Тр. Таллинского политехн. ин-та, 1985, № 598, с. 67-76.

3. С и й м е р Э.Х., К у р в и т с М.А. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение III. Применение калориметров типа Кальве для исследования стационарной кинетики. - Тр. Таллинского политехн. ин-та, 1985, № 598, с. 9-20.

4. S u u r k u s k J., W a d s ö I. A multichannel microcalorimetry system. - *Chemica Scripta*, 1982, vol. 20, N 2, p. 155-163.

A. Käär, E. Siimer

Modification of Proteins with Iminoethers III
Microcalorimetric Study of the Hydrolysis
Reaction of Iminoethers

Abstract

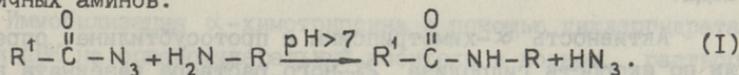
The hydrolysis of diethyl ether of bisiminoadipic acid (DEBA) in water-dioxane solutions at 20 and 30 °C has been investigated using the thermochemical method for kinetical measurements. It has been found that the reaction is pseudomonomolecular and the values of rate constants have been calculated for systems with different content of dioxane in solution and pH. The increase of organic solvent's content leads to noticeable decrease of the rate of hydrolysis reaction. Consequently, the use of DEBA as a bifunctional reagent for the modification of proteins can be recommended namely in water-organic solvent systems.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ИМИНОЭФИРАМИ И АЗИДАМИ
ОКСИКИСЛОТ НА ОРГАНОМИНЕРАЛЬНОМ НОСИТЕЛЕ

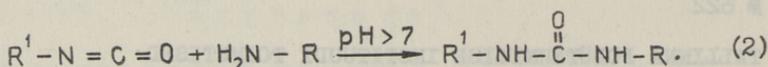
В практике модифицирования белков применены многие реагенты, которые реагируют с первичными аминогруппами. Эти модификаторы характеризуются различной реакционной способностью и образующиеся ковалентные С-N связи имеют разную прочность. Из-за прочности амидной связи при модифицировании белков предпочитают реакции ацилирования и амидинирования по сравнению, например, с образованием азометиновой связи.

Реакция ацилирования является одним из наиболее часто используемых методов получения модифицированных белков. Однако под действием побочных продуктов ацилирования происходит инактивация реакционноспособных групп белка. В качестве мягких ацилирующих агентов могут быть рекомендованы азиды и иминоэфиры карбоновых кислот. И хотя последние в первой стадии модифицирования образуют амидины вследствие гидролиза, эти соединения в конечном результате дают амидную связь. Для применения азидов оксикислот при модифицировании или иммобилизации белков необходимо синтезировать их водорастворимые производные. По литературным данным эти соединения практически не исследованы (кроме тартилдiazида) [1].

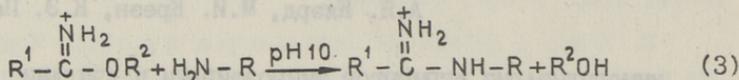
Азиды карбоновых кислот используются для ацилирования первичных аминов:



При термоллизе ацилазидов происходит перегруппировка Курциуса и образуются эфиры изоциановых кислот ($R^1 \cdot N:C:O$, которые активно реагируют с первичными аминогруппами, образуя производные мочевины):



Иминоэфиры в мягких условиях (темп., pH) специфически реагируют с аминокислотами и их производными, образуя ами-
дины:



быстро

Целью настоящей работы являлось получение нераствори-
мых, иммобилизованных на носителе ферментных препаратов при
помощи синтезированных нами дихлоргидрата диэтилового эфира
бисиминоадипиновой кислоты $(ClH \cdot NH : C(OC_2H_5) \cdot (CH_2)_4 \cdot (H_5C_2O)C :$
 $NH \cdot HCl)$ диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты
 $(NH : C(OC_2H_5) \cdot (CH_2)_4 \cdot (H_5C_2O)C : NH)$, триазида лимонной кис-
лоты $(N_3 \cdot CO \cdot CH_2 - C(OH) \cdot CO \cdot N_3 - CH_2 \cdot CO \cdot N_3)$ и диазида
глюкаровой кислоты $(N_3 \cdot CO \cdot CH(OH) - CH(OH) - CH(OH) - CH(OH) \cdot CO \cdot N_3)$.

Поскольку реакция рассматриваемых модификаторов с пер-
вичными аминогруппами белка происходит в щелочной среде, в
данной работе исследовалась возможность иммобилизации таких
ферментов, pH-оптимум которых находится в области $pH > 7$ -
 α -химотрипсина, протосубтилина. Кроме этих ферментов иссле-
довали иммобилизацию β -галактозидазы, имеющей pH-оптимум в
области $pH < 7$.

Материалы и методы

Объектами иммобилизации служили α -химотрипсин (Е.С.
3.4.2I.1), марка В, ТУ 6-09-10-1150-76; β -галактозидаза (Е.
С. 3. 2. I.23) - опытная партия Ладжинского завода фер-
ментных препаратов; щелочная протеаза *Bac. subtilis* Г 10 X
(протосубтилин) - производство Ладжинского ферментного за-
вода.

Активность α -химотрипсина и протосубтилина определя-
ли по скорости гидролиза 2%-ного раствора казеината натрия
при pH 8,5 и 30 °C, измеряя содержание ароматических амино-
кислот в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктах
гидролиза спектрофотометрически при $\lambda = 278 \text{ нм}$ [2]. Актив-
ность α -химотрипсина составляла 120 мккат/г и протосубти-
лина - 28,7 мккат/г.

Активность β -галактозидазы определялась по начальной скорости гидролиза синтетического субстрата β -(о-нитрофенил- β -галактопиранозид (НФГ) в стандартных условиях: темп. 30 °С; 0,2 М ацетатный буфер рН 4,0 и 0,139 М НФГ. Концентрация о-нитрофенола как продукта гидролиза НФГ измерялась на спектрофотометре "Specord M40" ("Carl Zeiss", ГДР) при $\lambda = 402$ нм [3]. Ферментативная активность β -галактозидазы по НФГ равнялась 30–40 мккат/г. Субстрат НФГ синтезирован нами.

Активность иммобилизованных препаратов вышеупомянутых ферментов определялась в тех же условиях, что и свободных ферментов, т.е. в термостатированной ячейке, снабженной магнитной мешалкой.

Активность свободных ферментов выражена в мккат на 1 г сухого фермента, а активность иммобилизованных ферментов выражена в мккат на 1 г сухого носителя.

Для иммобилизации ферментов использовали органоминеральные носители, синтезированные нами. Удельная поверхность носителя 25–40 м²/г и средний объем пор 0,9 см³/г. Число свободных аминогрупп органоминерального носителя определялось при помощи 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС) на спектрофотометре при $\lambda = 340$ нм [4]. Органоминеральные носители содержали 40–60 мк/экв аминогрупп на 1 г сухого носителя.

Химические модификаторы – диэтиловый эфир бисиминоадипиновой кислоты (ДБК), дихлоргидрат ДБК, триазид лимонной кислоты (ТЛК) и диазид глюкаровой кислоты (ДГК) – синтезированы нами. Состав ДБК и дихлоргидрата ДБК подтверждали данными элементного анализа и измерением ИК-спектра. В случае ТЛК и ДГК из-за взрывоопасности азидов оксикислот в чистом виде данными элементного анализа и измерением ИК-спектра подтверждали состав соответствующих гидразидов.

Иммобилизация α -химотрипсина с помощью дихлоргидрата ДБК и ДБК на органоминеральный носитель в водном растворе проводилась при темп. 5 °С и рН 9,0. Условия выбирались для иммобилизации в водных растворах по данным кинетических исследований, приведенных в предыдущих сообщениях [5, 6]. Иммобилизацию провели с разными количествами модификатора при одинаковых количествах фермента (1 мл α -химотрипсина,

100 мг/мл в 4 мл боратном буфере рН 9,0) и носителя (1 г) в течение 4 ч. Активность 1 мл α -химотрипсина (100 мг/мл) — 12,2 мккат по казеину. Для иммобилизации раствор α -химотрипсина перемешивали с сухим органоминеральным носителем и, после этого, добавляли дихлоргидрат ДБК или ДБК.

Протосубтилин иммобилизовали на органоминеральный носитель с помощью ДБК при рН 8,5 и темп. 5 °С в таких же условиях, как α -химотрипсин.

β -Галактозидазу иммобилизовали в системе: 0,01 М ацетатный буфер рН 4,2 и 40 мас. % органического растворителя (диоксан, ацетон). На 1 г органоминерального носителя добавляли 6 мл вышеприведенного раствора и, после этого, 0,15 г порошковой β -галактозидазы. Смесь держали 10 мин. при темп. 5 °С и добавляли $3,96 \cdot 10^{-3}$ моль ДБК на 1 г сухого носителя. Иммобилизация продолжалась 4 ч. при темп. 5 °С.

Модифицирование ферментов с помощью ТЛК и ДГК проводили в условиях, описанных в случае использования диазида винной кислоты (тартилдиазида) [1]. α -Химотрипсин (100 мг) иммобилизовали на органоминеральный носитель (1 г) с помощью 0,25 ммоль ДГК при рН 8,5 и темп. 2 °С. β -Галактозидазу (100 мг) иммобилизовали на органоминеральный носитель (1 г) с 0,25 ммоль ДГК при рН 4,2 и темп. 2 °С. С помощью 0,15 моля ТЛК на органоминеральный носитель (1 г) иммобилизовали α -химотрипсин в 0,2 М боратном буфере рН 8,5 (6–43 мккат на 1 г сухого носителя) и β -галактозидазу в 0,2 М ацетатном буфере рН 4,2 (6–40 мккат на 1 г сухого носителя) при 2 °С.

Поскольку при термоллизе ацилазидов образуются эфиры изоциановых кислот, а фотолиз изоциановых эфиров приводит к образованию активных частиц — нитренов, иммобилизационный раствор облучали УФ-светом.

Результаты и обсуждение

Прежде всего сравнивали иммобилизационные свойства дихлоргидрата ДБК и ДБК в одинаковых условиях для выяснения эффективности этих модификаторов. Результаты иммобилизации α -химотрипсина с помощью ДБК и дихлоргидрата ДБК приведены в табл. I. По этим данным (см. табл. I) лучшие резуль-

Т а б л и ц а 1

Иммобилизация α -химотрипсина на органоминеральный носитель с помощью ДБК и дихлоргидрата ДБК, рН 9 (0,2 М боратный буфер), темп. 5 °С, взятое для иммобилизации количество единиц активности 12,2 мккат

Количество модификатора, моль/г носителя	Актив. иммоб. преп., мккат/г носителя	Степень иммобилизации, %	Потеря актив. при иммоб., %
Дихлоргидрат ДБК			
$1,83 \cdot 10^{-4}$	0,7	6	12
$3,66 \cdot 10^{-4}$	1,0	8	11
$7,33 \cdot 10^{-4}$	1,5	12	34
$1,83 \cdot 10^{-3}$	1,8	15	62
ДБК			
$4,96 \cdot 10^{-4}$	2,4	20	15
$1,49 \cdot 10^{-3}$	2,6	21	19
$2,48 \cdot 10^{-3}$	2,8	23	17
$3,47 \cdot 10^{-3}$	3,0	25	24

Т а б л и ц а 2

Иммобилизация протосубтилина на органоминеральный носитель с помощью ДБК, рН 8,5 (0,2 М боратный буфер) и темп. 5 °С, взятое для иммобилизации количество единиц активности 5,7 мккат

Количество ДБК, моль/г носителя	Актив. иммоб. преп., мккат/г носителя	Степень иммобилизации, %	Потеря при иммобилизации, %
$4,96 \cdot 10^{-4}$	0,8	15	11
$1,49 \cdot 10^{-3}$	0,8	15	9
$2,48 \cdot 10^{-3}$	1,0	17	14
$3,47 \cdot 10^{-3}$	1,1	19	16

таты иммобилизации получены с реагентом ДБК, что можно объяснить его большей реакционной способностью по сравнению с формой соли ДБК. В случае гидролиза дихлоргидрата ДБК в водных растворах образуется больше инактивирующих веществ.

Можно предполагать, что одновременно с иммобилизацией фермента к носителю, часть бифункционального модифицирующего реагента реагирует только с аминокруппами белка, поперечно сшивая их. В результате этого активность иммобилизованных препаратов оказывается относительно низкой.

Поскольку при иммобилизации с помощью ДБК получены лучшие результаты по сравнению с дихлоргидратом ДБК в дальнейшем исследовали стабильность препарата α -химотрипсина, иммобилизованного с ДБК (см. рис. 1). Исходная активность исследуемого препарата 0,54 мккат/г носителя. Показано, что при промывании препарата 0,2 М боратным буфером с pH 8,5 активность не изменяется. Можно полагать, что α -химотрипсин

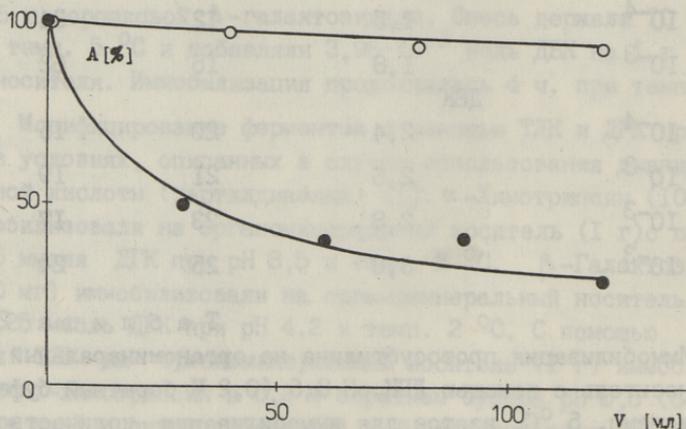


Рис. 1. Стабильность препарата α -химотрипсина, иммобилизованного с помощью ДБК на органоминеральном носителе. Промывание препарата 2%-ным водным раствором казеина pH 8,5 (●) и 0,2 М боратным буфером pH 8,5 (O) при темп. 25 °C в течение 1 часа. Исходная активность исследуемого препарата 0,54 мккат/г носителя

на органоминеральном носителе адсорбирован и химически связан. При промывании данного препарата 2 % водным раствором казеина pH 8,5 сохранялась только 40 % активности иммобилизованного препарата. Делаем вывод, что 40 % иммобилизованного α -химотрипсина присоединено к носителю ковалентно, а остальная часть иммобилизованного фермента адсорбирована на нем.

Для иммобилизации протосубтилина выбрали ДБК как более реакционноспособный реагент по сравнению с дихлоргидратом

ДБК (см. данные табл. 1). Имобилизацию протосубтилина провели с разными количествами ДБК (см. табл. 2) при одинаковых количествах фермента и носителя. Продолжительность процесса имобилизации 4 ч. По данным табл. 2 коэффициент сохранения активности не велик и при увеличении концентрации ДБК медленно растет. Но при имобилизации протосубтилина с ДБК потеря активности незначительна. В связи с низкими значениями коэффициента сохранения активности и ничтожной активностью имобилизованных препаратов их стабильность не исследовали.

Как указано в сообщениях [5, 6], в присутствии органического растворителя в водных растворах скорость реакции гидролиза уменьшается, а скорость реакции амидинирования повышается, поэтому β -галактозидазу имобилизовали в системе органический растворитель - вода. Результаты имобилизации β -галактозидазы в данной системе приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Имобилизация β -галактозидазы с помощью ДБК
в системе орг. растворитель-вода

Растворитель	Актив. имоб. преп., мккат/г _{нос.}	Степень иммо- билизации, γ , %	Потеря актив. при им- моб., %
Диоксан	1,23	25	II
Ацетон	1,17	23	I4

Как видно по данным табл. 3, активности имобилизованной β -галактозидазы уже значительно выше. Поскольку реакция имобилизации β -галактозидазы в данной системе происходит при pH 4,2, маловероятно, что реакция амидинирования протекает полностью. Фермент может адсорбироваться на носителе, а модификатор - реагировать с другими функциональными группами белка, кроме аминокрупп.

При имобилизации ферментов азидами оксикислот, как неразлагающимися модификаторами, исследовали различные способы активирования носителя.

При имобилизации α -химотрипсина с помощью ДБК использовали три разных способа. Первый способ: активация

органоминерального носителя ДГК, после чего добавляли раствор α -химотрипсина. Получали активности препаратов порядка 6,5 мккат на 1 г сухого носителя ($\gamma = 25\%$). Второй способ: адсорбция α -химотрипсина на органоминеральном носителе и, после этого, поперечное сшивание ДГК. Активности препаратов получали порядка 1,3 мккат на 1 г сухого носителя ($\gamma = 4,4\%$). Третий способ: органоминеральный носитель смешивали с раствором α -химотрипсина и добавляли раствор ДГК. Активности препаратов получали порядка 5,5 мккат на 1 г сухого носителя ($\gamma = 18\%$). Все опыты проводили с одинаковыми количествами органоминерального носителя, ДГК и α -химотрипсина при темп. 2 °С. По результатам экспериментов лучшим оказался первый способ, при котором вначале с аминогруппами органоминерального носителя реагирует ДГК, а потом свободные азидные группы реагируют с аминогруппами фермента. Стотносительно низкое значение коэффициента выхода активности при втором способе объясняется адсорбционными свойствами органоминерального носителя. Поэтому в дальнейших опытах при иммобилизации с помощью ДГК использовали первый способ.

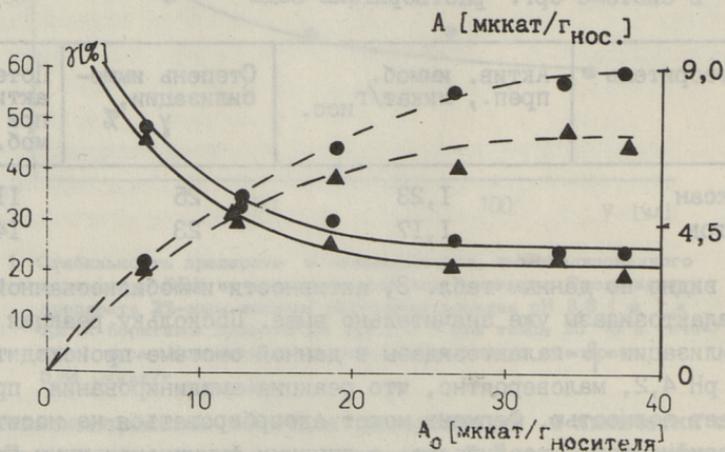


Рис. 2. Иммобилизация α -химотрипсина на органоминеральном носителе глутаровым альдегидом (▲) и диазидом глюкаровой кислоты (●), — γ, ---- A.

При иммобилизации α -химотрипсина с помощью ДГК на органоминеральном носителе активность α -химотрипсина варьировалась в пределах 6–40 мккат. Параллельный опыт с глутаровым диальдегидом (ГА) провели с такими же количествами вещества и по той же методике. Результаты иммобилизации при-

ведены на рис. 2. Как видно из рис. 2, оптимальным оказывается значение исходной активности порядка 10–20 мккат на 1 г сухого носителя и иммобилизация с помощью ДГК дала немного лучшие результаты (на ~ 5 %), чем иммобилизация с ГА.

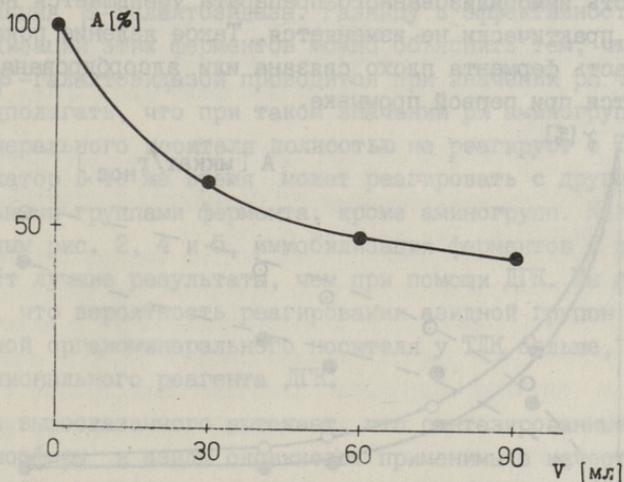


Рис. 3. Стабильность иммобилизованного на органоминеральном носителе диазидом глюконовой кислоты α -химотрипсина. Промывание иммобилизованного препарата 2%-ным раствором казеина на pH 8,5 при темп. 25 °C в течение 1 часа. Исходная активность исследуемого препарата 6,4 мккат/г носителя

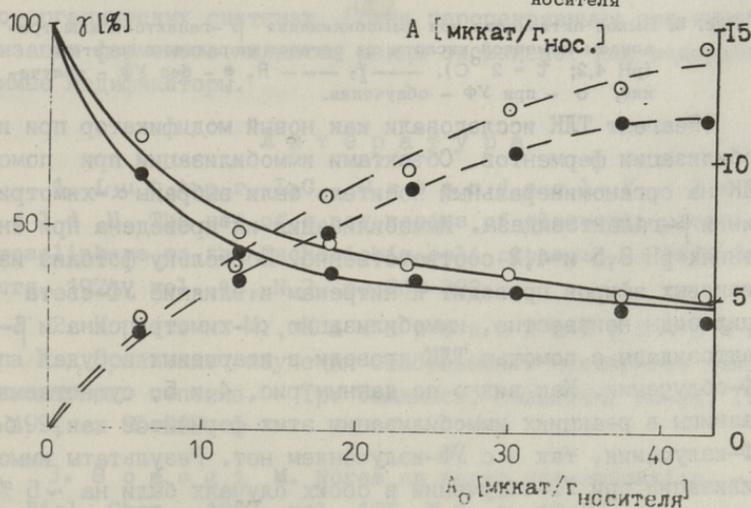


Рис. 4. Выход активности при иммобилизации α -химотрипсина триазидом лимонной кислоты на органоминеральном носителе (pH 8,5; $t = 20$ °C). — γ , --- A, ● - без УФ - облучения, ○ - при УФ - облучении.

Стабильность иммобилизованного с помощью ДЖ α -химотрипсина изучали при промывании иммобилизованного препарата 2%-ным раствором казеина pH 8,5 30 мл-выми порциями в течение 1 часа (см. рис. 3). После первого промывания активность иммобилизованного препарата уменьшается на 40 % и затем практически не изменяется. Такое явление показывает, что часть фермента плохо связана или адсорбирована, и вымывается при первой промывке.

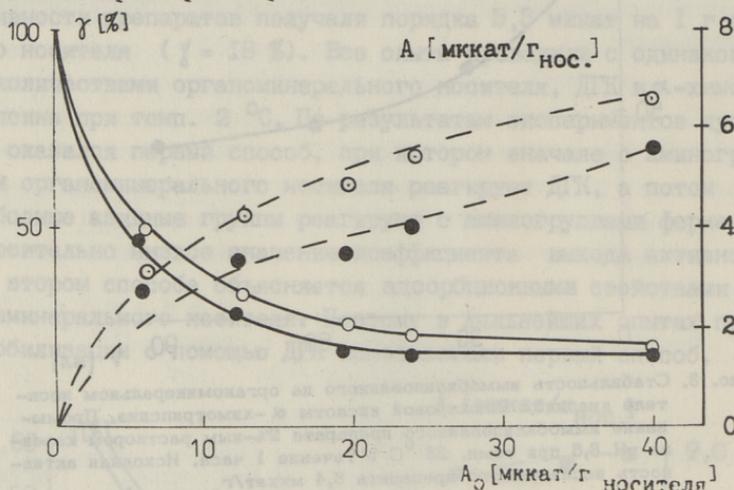


Рис. 5. Выход активности при иммобилизации β -галактозидазы триазидом лимонной кислоты на органоминеральном носителе (pH 4,2; $t = 2^\circ\text{C}$). — γ , — — A, ● — без УФ-облучения, ○ — при УФ-облучении.

Реагент ТЛК исследовали как новый модификатор при иммобилизации ферментов. Объектами иммобилизации при помощи ТЛК на органоминеральный носитель были выбраны α -химотрипсин и β -галактозидаза. Иммобилизация их проведена при значениях pH 8,5 и 4,2 соответственно. Поскольку фотолиз изоциановых эфиров приводит к нитренам и влияние УФ-света на ацилазиды неизвестно, иммобилизацию α -химотрипсина и β -галактозидазы с помощью ТЛК провели в кварцевых сосудах при УФ-облучении. Как видно по данным рис. 4 и 5, существенной разницы в реакциях иммобилизации этих ферментов как без УФ-излучения, так и с УФ-излучением нет. Результаты иммобилизации при УФ-облучении в обоих случаях были на ~5 % лучше. Это явление можно объяснить некоторым повышением эффективности реакции между аминогруппами носителя и ТЛК под действием УФ-излучения. При увеличении исходной актив-

ности α -химотрипсина коэффициент выхода активности γ уменьшается приблизительно до 30 %, а при иммобилизации β -галактозидазы - приблизительно до 20 %. По этим данным иммобилизация α -химотрипсина в некоторой мере эффективнее, чем иммобилизация β -галактозидазы. Разницу в эффективностях при иммобилизации этих ферментов можно объяснить тем, что реакция с β -галактозидазой проводится при значении pH 4,2. Можно предполагать, что при таком значении pH аминогруппы органоминерального носителя полностью не реагируют с ТЛК и модификатор в то же время может реагировать с другими функциональными группами фермента, кроме аминогрупп. Как видно по данным рис. 2, 4 и 5, иммобилизация ферментов с помощью ТЛК даёт лучшие результаты, чем при помощи ДГК. Мы предполагаем, что вероятность реагирования азидной группы с аминогруппой органоминерального носителя у ТЛК больше, чем у бифункционального реагента ДГК.

Из вышесказанного вытекает, что синтезированные нами бисиминоэфир и азиды оксикислот применимы в качестве модификаторов и сшивающих агентов при иммобилизации ферментов. Сравнение ДБК и дихлоргидрата ДБК как модификаторов показало преимущество первого. Учитывая лабильность ДБК в водной среде, желательным можно считать его применение в водно-органических системах. Более перспективными при иммобилизации ферментов являются азиды оксикислот как водорастворимые модификаторы.

Л и т е р а т у р а

1. L u t t e r L. C., O r t a n d e r l F., F a s o l d H. The use of a new series of cleavable protein-crosslinkers on the Escherichia coli ribosome. - FEBS Letters, 1974, vol. 48, N 2, p. 288-292.
2. К р е э н М., К а ч а р о в с к а - Ж о н ч и н ь с к а М. Сравнение изучения стабильности препаратов иммобилизованного пепсина. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 95-103.
3. S o m o g i M. Notes on sugar determination. - J. Biol. Chem., 1952, vol. 195, N 1, p. 19-24.

4. Antoni G., Presentini R., Neri P. A simple method for the estimation of amino groups on insoluble matrix beads. - Anal. Biochem., 1983, vol. 129, N 1, p. 60-63.

5. Кяэрд А. Модификация белковых веществ иминоэфирами I. Получение и свойства диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1985, № 598, с. 55-65.

6. Кяэрд А., Таммерайд И. Модификация белковых веществ иминоэфирами II. Математическая модель кинетики процесса. Там же, с. 67-76.

A. Käärd, M. Kreen, K. Pappel

Immobilization of Enzymes by Iminoethers and Azides of Hydroxyacids on Organic-inorganic Composition Carriers

Abstract

The possibility of the immobilization of α -chymotrypsine, β -galactosidase and alkaline protease from Bac.subtilis with derivatives of carbamic acids, synthesized in our laboratory, has been investigated. Diethylether of bisiminoadipic acid (DBA), its dichlorohydrate, diazide of glucaric acid (DGA) and triazide of citric acid (TCA) have been used in water and water-organic solvent medium.

Optimal conditions for the immobilization of proteins on porous organic-inorganic composition comprising free aminogroups have been found. The stability of immobilized enzyme preparations has been investigated. The advantage of DBA for the immobilization of enzymes has been shown. Azides of hydroxyacids as compounds soluble in water can be recommended for the modification of proteins.

Г.И. Микшите, А.А. Дикчювене, А.Б. Паулюконис,
Д.А. Казлаускас, А.И. Кёстнер

ИММОБИЛИЗАЦИЯ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК ВКЛЮЧЕНИЕМ В МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АГАР

Иммобилизация клеток микроорганизмов является новым перспективным направлением получения биокатализаторов, используемых в биотехнологических процессах. Однако многие известные способы иммобилизации клеток, как, например, включение в гели полиакриламида, альгината кальция, каррагинана и др., по различным причинам мало пригодны для технологии биокатализаторов, предназначенных для крупномасштабных процессов. Акриламид и каррагинан отечественной промышленностью не выпускаются и являются практически недоступными для крупномасштабного производства биокатализаторов. Гель альгината кальция быстро разрушается в случае присутствия в среде соединений, комплексующихся с ионами Ca^{2+} .

Нами были изучены возможности получения иммобилизованных микробных клеток по следующей общей схеме: клетки диспергировали в среде, содержащей водорастворимый полимер и полиамин, и смесь обрабатывали бифункциональным реагентом, растворенным в воде или органическом растворителе. Выбор материалов обусловлен их доступностью в больших количествах и низкой стоимостью. В качестве объекта иммобилизации были использованы клетки дрожжей *Cryptococcus species* № II2, обладающие L - α -аминокапролактамамгидролазной и L -лизинамидазной активностями. В ходе другого исследования [1] было найдено, что обе упомянутые активности характерны для одного и того же фермента. Биокатализатор на основе данных клеток может быть использован в технологии получения L -лизина из химического сырья.

Материалы и методы

В работе использовали L-лизин гидрохлорид, кристаллический, отечественного производства, который дополнительно перекристаллизовывали из смеси вода-метанол. Субстрат L- α -аминокапролактam синтезировали из L-лизина по методике [2]. В качестве водорастворимых полимеров применяли желатину пищевую, картофельный крахмал, агар пищевой отечественного производства, поливиниловый спирт (мол. вес 30000) - фирмы "Merck", натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы - фирмы "Serva". В реакциях иммобилизации использовали 25 % глутаровый альдегид, эпихлоргидрин, цианурхлорид, толуолдизоцианат - продукты фирмы "Merck". В качестве полиаминов применяли 50% полиэтиленимин и гексаметилендиамин - фирмы "Fluka". Биомассу клеток дрожжей *Cryptococcus species* № II2 выращивали по методике [3] и после высушивания ацетоном использовали для иммобилизации.

Иммобилизацию клеток в полимерный каркас проводили по следующей общей методике (таблица I, опыты № I - IO): полимер растворяли в воде, прибавляли 50% раствор полиэтиленимина, затем прибавляли раствор I и HCl до значения pH 8,2-8,5 и смешивали с суспензией клеток в воде. Во всех случаях весовое соотношение полимер:клетки составляло I:I. Полученную гомогенную массу полимера, клеток и полиэтиленимина обрабатывали бифункциональным реагентом. Для этого в смесь добавляли определенный объем водного раствора бифункционального реагента до желаемой концентрации (вариант а), или в другом случае гомогенную массу выдавливали по каплям через иглу шприца в раствор бифункционального реагента в органическом растворителе или воде (вариант б).

Иммобилизацию клеток в модифицированный агар (таблица I, опыты № II-16) осуществляли следующим образом (оптимальные условия): 0,75 мл 50% раствора полиэтиленимина растворяли в 7-8 мл воды, прибавляли I и раствор HCl до значения pH 8,5, прибавляли 0,22 г агара, объем смеси доводили водой до 10 мл, и подогревали до 80° для полного растворения агара. Смесь охлаждали до 50°, прибавляли I,6 г сухих клеток, перемешивали и охлаждали льдом и водой до 5 °С. Образовавшийся блок геля с включенными клетками измельчали

продавливанием через сито. Полученные гранулы помещали в стакан с 50 мл 1% раствора глутарового альдегида. После контактирования смеси в течение 20 минут при 4-6 °С гранулы промывали дистиллированной водой, затем высушивали промыванием ацетоном и хранили до использования в эксикаторе над CaCl_2 , помещенном в холодильник.

Ферментативную активность биокатализаторов определяли по начальной скорости образования продукта реакции L-лизина при гидролизе L- α -аминокапролактама. Определение проводили в термостатируемой при 50 °С ячейке, при перемешивании магнитной мешалкой. Препараты биокатализаторов в сухом виде прибавляли к раствору субстрата и после 2-3 мин набухания брали контрольную пробу для определения фоновой концентрации лизина. Активность определяли при концентрации субстрата 0,1 М и рН 8,0. Дополнительные буферные соединения в реакционную смесь не вводили, так как L- α -аминокапролактама обладает определенной буферной емкостью. Длительность ферментативной реакции 30 минут. Пробу реакционной смеси обрабатывали реактивом, содержащим фурфурол и измеряли концентрацию лизина спектрофотометрически при 535 нм по методу [4]. Более детально методика определения аминокaproлактамагидролазной активности и ее аналитическая характеристика описаны в статье [5]. Единица ферментативной активности - количество биокатализатора, образующего один мкмоль лизина в мин. Активность биокатализаторов рассчитывали на сухой вес препаратов (Е/г). Активность в Е/мл получали делением значения активности на сухой вес (Е/г) на величину набухаемости.

Для определения набухаемости препаратов в стаканчик приливали воды и накладывали на него фильтровальную бумагу так, чтобы ее один конец был опущен в воду. На бумагу клали точно взвешенное количество (50-100 мг) сухого препарата, стаканчик помещали в эксикатор и оставляли при комнатной температуре до полного набухания, т.е. на 20 часов. Затем набухший препарат взвешивали. Набухаемость v_m рассчитывали по формуле

$$v_m = g_1/g_2,$$

где g_1 - вес набухшего препарата, г

g_2 - вес сухого препарата, г.

Для определения ферментативной стабильности биокатализаторов через термостатируемые при 50° колонки, заполненные испытуемыми препаратами, со скоростью II ± I мл/час прокачивали 0,1 М раствор L-лизина, pH 8,25 (консервант - толуол). Через определенные интервалы времени извлекали образцы препаратов, хорошо отмывали водой и определяли остаточную активность.

Результаты и их обсуждение

Для изучения возможности иммобилизации микробных клеток путем их включения в сшитый полимерный каркас нами были использованы легкодоступные водорастворимые полимерные материалы: карбоксиметилцеллюлоза, желатина, крахмал, поливиниловый спирт и агар. В качестве сшивающих реагентов использовали эпихлоргидрин, толуолдиизоцианат, цианурхлорид и глутаровый альдегид и в качестве полиаминного компонента - полиэтиленимин. Первоочередной задачей явилось определение возможности формирования гранулируемого материала, обладающего достаточной механической прочностью для последующего использования в качестве биокатализатора. Результаты, полученные при опробовании различных комбинаций упомянутых материалов показаны в таблице I. Во всех случаях при использовании карбоксиметилцеллюлозы различной концентрации, после прибавления любого применяемого нами бифункционального реагента, не был получен материал с достаточной механической прочностью, который можно было бы измельчать (опыты № 1-5). В опытах 6 и 7 смесь клеток, карбоксиметилцеллюлозы и полиэтиленимина вводили по каплям в раствор соответствующего бифункционального реагента в органическом растворителе. Однако образовавшиеся гранулы были механически непрочными. Неудачными оказались также попытки получить механически устойчивые гранулы при использовании в качестве полимера желатина, крахмала и поливинилового спирта. Во всех случаях смесь клеток, полимера и полиэтиленимина вводили по каплям в раствор соответствующего бифункционального реагента в ацетоне, однако, капли слипались в механически непрочные комки.

Механически устойчивые биокатализаторы были получены при использовании агара в качестве водорастворимого полиме-

Т а б л и ц а I

Результаты опробования различных вариантов получения биокатализаторов

№ опыта	2	3	4	5	6
Растворимый полимер, концентрация	Аминный компонент, концентрация	Бифункциональный реагент, концентрация	Способ обработки (растворители)	Механическая прочность	
I					
1	Карбоксиметилцеллюлоза, 1 %	Полиэтиленимин, 1 %	Толуолдиизоцианат, 5 %	а	-
2	То же	То же	Эпихлоргидрин, 5 %	а	-
3	Карбоксиметилцеллюлоза, 4 %	То же	Толуолдиизоцианат, 5 %	а	-
4	Карбоксиметилцеллюлоза, 5 %	Полиэтиленимин, 5 %	Толуолдиизоцианат, 1,25 - 3,75 %	а	-
5	То же	То же	Глутаровый альдегид, 2,5 %	а	-
6	То же	То же	Эпихлоргидрин, 10 %	б (толуол)	+
7	То же	То же	Цианур хлористый, 5 %	б (ацетон)	+
8	Желагина, 5 %	Полиэтиленимин, 2,5 %	Глутаровый альдегид, 2,5 %	б (ацетон)	-
9	Крахмал, 5 %	То же	Эпихлоргидрин, 10 %	б (ацетон)	-
10	Поливиниловый спирт, 5 %	То же	Толуолдиизоцианат, 2,5 %	б (ацетон)	-
II	Агар, 4 %	Полиэтиленимин, 2,5 %	Эпихлоргидрин, 5 %	б (ацетон)	+

I	2	3	4	5	6
I2	Агар, 4 %	Полиэтиленглимин 2,5 %	Гутаровый альде- гид, 2,5 %		
I3	То же	—	То же		++
I4	Агар, 2 %	Полиэтиленглимин, 5 %	То же		+
I5	То же	Гексаметилендиамин, 5 %	То же		++
I6	То же	Лизин, 5 %	То же		+

х Примечание: механическую прочность оценивали по результатам перемешивания водной суспензии продукта в ячейке, установленной на магнитной мешалке: — препарат не обладает заметной механической прочностью, + препарат постепенно измельчается при перемешивании в течение I часа; ++ препарат остается устойчивым при перемешивании в течение I часа.

ра. Гранулы, содержащие клетки, агар и полиэтиленимин, обработанные водным раствором глутарового альдегида (опыт № 12) не измельчались при перемешивании при 40–50 °С в течение часа. Можно отметить, что обработка гранул раствором эпихлоргидрина в ацетоне (опыт № 11) является неприемлемой, так как гранулы при перемешивании в течение часа полностью измельчались. То же самое можно сказать о гранулах, обработанных глутаровым альдегидом, однако, полученных в отсутствие полиэтиленимина (опыт № 13). Наряду с полиэтиленимином в качестве полиамина нами были использованы гексаметилендиамин и лизин, которые, однако, оказались непригодными. Полученные при этом продукты отличались низкой механической устойчивостью (опыты № 15, 16). Таким образом, препараты с достаточной механической прочностью нам удалось получить только при иммобилизации клеток в систему агара, полиэтиленимина и глутарового альдегида (опыты № 12, 14).

Данный метод иммобилизации оптимизировали по методу последовательного симплекс-планирования [6]. В качестве факторов оптимизации были избраны концентрация агара в % (Z_1), концентрация клеток в мг/мл (Z_2), концентрация полиэтиленимина в % (Z_3), концентрация раствора глутарового альдегида в % (Z_4). В качестве критериев оценки рассматривались активность препарата в Е/мл (Y_1) и выход ферментативной активности в процессе иммобилизации в % (Y_2), а также механические свойства, если они значительно ухудшались. Целевой функцией считали произведение $Y = Y_1 \cdot Y_2 \cdot 0,01$. Основной уровень факторов (Z_j) и интервалы варьирования факторов (ΔZ_j) приведены ниже:

Факторы	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4
Z_j^0	3,0	100	2,0	1,8
ΔZ_j	2,0	69,2	2,45	1,26

В таблице 2 приведены данные серии последовательных экспериментов, выполненных при оптимизации способа иммобилизации в модифицированный агар методом симплекс-планирования, показывающие влияние изменения концентраций исходных материалов на ферментативную активность препарата и выход активности. Полученный в 9-м опыте препарат был механически нестойким. Причиной этого может быть слишком низкая концентрация бифункционального реагента, т.е. глутарового альдегида. В связи с этим условия 8-го опыта были использованы в

качестве основного уровня факторов и уменьшены интервалы варьирования факторов ($\Delta z_1 = 1,0$, $\Delta z_2 = 86,5$, $\Delta z_3 = 1,5$ и $\Delta z_4 = 1,0$). Данные, полученные в последующих экспериментах, представлены в таблице 3.

Т а б л и ц а 2

Матрица симплекса и результаты опытов
иммобилизации клеток в модифицированный агар

№ опы-та	z_1	z_2	z_3	z_4	Активность y_I		Выход акт. $y_2, \%$	y
					Е/Г	Е/мл		
1	4,0	120	2,5	2,0	273	74,9	51,9	38,9
2	2,0	120	2,5	2,0	293	93,5	49,6	46,4
3	3,0	60	2,5	2,0	243	71,2	57,3	40,8
4	3,0	100	0,5	2,0	384	57,2	63,9	36,6
5	3,0	100	2,0	1,0	403	119	74,4	88,7
6	3,0	100	4,3	1,5	284	78,3	60,4	47,3
7	1,5	70	3,1	1,25	384	102	78,7	79,9
8	1,75	135	3,4	0,88	533	139	90,8	126
9	2,65	83	3,9	0,31	575	89,8	98,0	88,0

Т а б л и ц а 3

Последующая матрица симплекса и результаты опытов
иммобилизации клеток в модифицированный агар

№ опыта	z_1	z_2	z_3	z_4	Активность y_I		Выход акт. $y_2, \%$	y
					Е/Г	Е/мл		
1	2,25	160	3,75	1,0	539	142	91,3	129
2	1,25	160	3,75	1,0	588	157	95,1	149
3	1,75	85	3,75	1,0	415	125	84,1	105
4	1,75	135	2,52	1,0	455	129	73,8	95,3
5	1,75	135	3,44	0,24	784	174	99,9	174

Полученные в опытах 2 и 5 препараты при перемешивании легко распадались на мелкие частицы. Таким образом, приведенные в опыте 1 концентрации компонентов можно считать оптимальными, однако, ясно, что изменение концентрации клеток в более широких пределах может оказать существенное влияние на активность препарата. Изучение этого вопроса дало резуль-

таты, из которых следует, что данная система "насыщается" клетками при их концентрации 160-180 мг/мл. Дальнейшее повышение исходной концентрации клеток ведет к понижению выхода ферментативной активности, а также сильному ухудшению механических свойств.

Таким образом, путем планирования экспериментов симплекс-методом, применяя вышеуказанную систему компонентов, нами был получен препарат иммобилизованных клеток с высокой ферментативной активностью и хорошим выходом в процессе иммобилизации.

Из литературных данных известно, что включение в агар используется как метод иммобилизации микробных клеток, в частности, клеток, обладающих глюкозоизомеразной активностью [7]. Однако в известном методе используется сравнительно небольшое исходное соотношение клетки/гельобразующие материалы (1:1), что препятствует достижению высокой ферментативной активности биокатализатора. В разработанном способе иммобилизации вышеуказанное весовое соотношение достигает 2,7:1, благодаря чему ферментативная активность препарата значительно повышается.

Иммобилизация предполагаемым методом приводит к существенной стабилизации ферментативной активности биокатализатора. Нами была исследована стабильность двух биокатализаторов, полученных включением в агар: 1) полученного модифицированным методом и 2) полученного по литературной методике [7] без применения дополнительных реагентов. Определяли стабильность биокатализаторов, находящихся в условиях непрерывного протекания раствора продукта катализируемой реакции. Полученные результаты представлены на рис. 1. Можно отметить наличие существенного стабилизирующего эффекта, характерного описываемому методу. По литературным данным известно, что глутаровый альдегид легко вступает в реакцию со свободными аминогруппами. По-видимому, в случае иммобилизации в модифицированный агар, образуются прочные ковалентные связи между отдельными молекулами полиэтиленimina через глутаровый альдегид. В такую цепь могут быть включены свободные аминогруппы, находящиеся на поверхности клеточной стенки или мембраны. Такая "сшивка" становится препятствием для вымывания клеток из гранул агарового геля и это приво-

Ферментативная
активность, Е/г

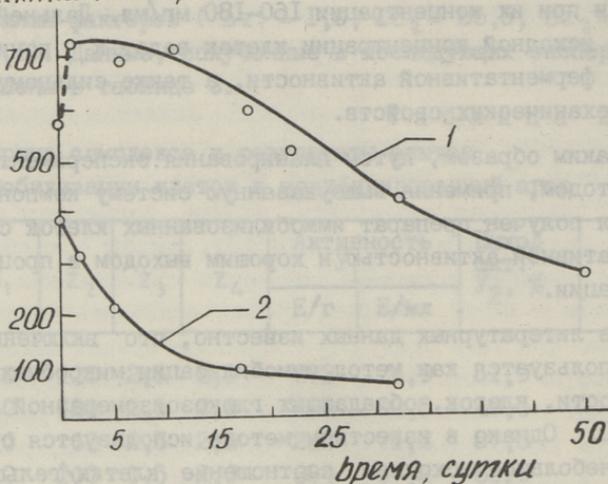


Рис. 1. Ферментативная стабильность биокатализаторов, полученных включением в агар: 1 — модифицированным методом; 2 — по литературной методике [7].

дит к повышению ферментативной стабильности биокатализатора. Присутствие полиэтиленimina препятствует и инактивации фермента глутаровым альдегидом. Препарат иммобилизованных клеток, полученный в отсутствие полиэтиленimina (таблица I, опыт № 13), после обработки глутаровым альдегидом теряет ферментативную активность на 35 %.

Полученные результаты показывают, что способ иммобилизации включением в модифицированный агар обеспечивает высокую ферментативную активность и стабильность препарата иммобилизованных клеток, что приводит к существенному увеличению продуктивности при применении такого биокатализатора в технологическом процессе.

Л и т е р а т у р а

1. Č esk í s B. I., Š e b e k a H. B., J a n u - l a i t i e n e K. K., P a u l i u k o n i s A. B., K a z - l a u s k a s D. A. Purification of L-lysineamidase from *Cryptococcus laurentii*. — Eur. J. Biochem., in press.
2. B o y l e W. J., S i f n i a d e s S., V a n P e r p e n J. F. Asymmetric transformation of α -amino- ϵ -

caprolactam, a lysine precursor. - J. Org. Chem., 1979, vol. 44, N 26, p. 4841-4847.

3. Микшите Г.И., Дикчювене А.А., Вайткявичюс А.К., Паулюконис А.Б., Казлаускас Д.А., Кёстнер А.И. Иммунизация микробных клеток, обладающих L-лизинамидазной и L- α -аминокапролактамгидролазной активностями. - Биотехнология, 1985, № 1, с. 51-59.

4. Patthy M., Patthy A. Specific colour reaction for determination of lysine and/or ornithine. - Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 1975, vol. 10 (4), p. 277-286.

5. Дагис Р.И., Ческис Б.И., Шебека Г.Б., Паулюконис А.Б., Казлаускас Д.А. Определение активности L- α -амино- ϵ -капролактамгидролазы. - Прикл. биохим. микробиол., 1985, т. 21, № 3, с. 428-431.

6. Ахназарова С.Л., Кафаров В.В. Оптимизация эксперимента в химии и химической технологии. М.: Высшая школа, 1978, с. 221-230.

7. Ehrental I., Miner K.E. Immobilization of glucose isomerase. - U. S. Patent No 4208482, 1980. Int. Cl. C 07 G7/02.

G. Mikšite, A. Dikčiuvėnė, A. Paulionis, D. Kazlauskas, A. Köstner

Immobilization of Microbial Cells by Entrapment
in Modified Agar Gel

Abstract

Biomass of yeasts *Cryptococcus* sp. No. 112 has been entrapped in modified agar gel yielding a biocatalyst with lysinamidase activity. Using the optimization procedure activity up to 800 U/g has been obtained with almost complete retaining of initial activity. With the help of modifiers the stability of biocatalyst has been enhanced and half-life time about 40 days obtained. The proposed catalyst may be used for stereoselective production of L-lysine from racemic α -aminocaprolactam.

Получены результаты исследования, что процесс иммобилизации дрожжей в модифицированном агаре обеспечивает высокую ферментативную активность и стабильность препарата в лабораторных условиях, что позволяет в существующем уровне продуктивности при применении такого биокатализатора в технологическом процессе.

Литература

1. J. Štešić, M. J. Čuček, M. B., J. Lepičević, M. B., Paulionis A. B., Kazlauskas D. A. Purification of L-lysine from *Cryptococcus laurentii*. - *Rev. J. Biochem.*, in press.
2. Boyle W. J., Miniadou S., Van Pelt J. P. Asymmetric transformation of α -amino-

Т.И. Ранд, Ю.М. Канн, Т.А. Кыргма

ИЗУЧЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ И СОСТАВА КАРОТИНОИДОВ
ИЗ ПАНЦИРЯ КРЕВЕТКИ

Яркий розово-красный цвет креветки, крылья и других ракообразных обусловлен каротиноидами, которые содержатся в основном в их панцире. Во время переработки креветки в промышленности остается панцирь, а также головы и усы. Накапливаются отходы, приблизительно 70 % от веса креветки, которые содержат в значительных количествах каротиноидные пигменты, протеин и минеральные вещества. Эти отходы используются в мире для производства хитина-хитозана, рыбо-кормовых добавок, а также красителя для пищевой промышленности.

По данным литературы основным пигментом креветки и других ракообразных является астаксантин (Ас)-3,3'-дигидрокси- β , β -каротин-4,4-дион (рис. 1). Названный каротиноид встречается в свободной форме, в виде эфиров или в комплексе с белком. Кроме Ас содержатся и β -каротин, кантаксантин и др. соединения. Общее содержание Ас в креветке 14,9 мкг/г, в муке креветки от 4 мкг/г до 76 мкг/г, исходя от режима сушки [1].

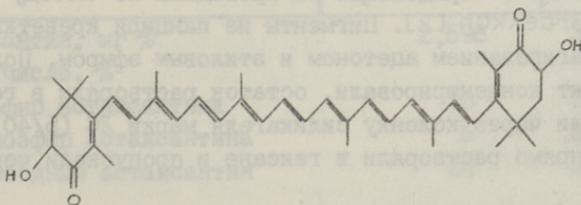


Рис. 1. Химическая структура астаксантина.

В настоящей работе исследовали сухой панцирь креветки с целью получения красителя для рыбных продуктов.

Материалы и методы

Панцирь, как отход при переработке креветки, получен из холодильного завода № I Мурманского рыбокомбината. Панцирь был предварительно высушен (содержание влажности было 7-8 %) и измельчен, имел слабый розовый цвет и запах, свойственный креветкам.

Выделение каротиноидных пигментов из панциря проводили экстрагированием техническим этанолом. Определен химический состав панциря до и после экстрагирования (см. табл. I). Отфильтрованный экстракт пигмента упаривали в ротационном испарителе при разведении до маслянистого остатка.

Количественное определение каротиноидных пигментов как в экстракте, так и в концентрате красителя проводили в спектрофотокориметре "СПЕКОЛ" ZV измерением величины экстинкции E. Содержание каротиноидов в этанольном экстракте установили измерением экстинкции разбавленного экстракта при длине волны 475 нм. Содержание каротиноидных пигментов в красителе выразили соотношением:

$$\frac{E_{490}}{m},$$

где E_{490} - экстинкция хлороформенного раствора красителя при длине волны 490 нм, объем раствора 100 мл;
 m - навеска концентрата, г (около 0,1 г точностью 0,0001 г).

Для более точного определения и идентификации каротиноидов в панцире креветки и в полученном красителе были применены методы колоночной и тонкослойной хроматографии.

Выделение и определение Ас проводили по методу Lambertsen и Braekkan [2]. Пигменты из панциря креветки выделяли экстрагированием ацетоном и этиловым эфиром. Полученный экстракт концентрировали, остаток растворяли в гексане и пропускали через колонку силикагеля марки ЛС (5/40 мкм). Краситель прямо растворяли в гексане и пропускали через колонку.

Гексановый раствор красителя, а также фракции Ас из колонки (растворы в гексане) проверяли на тонком слое. Нами были использованы пластинки "Silufol" UV 254 (150 x 150 мм), пластинки силикагеля марки ЛС (90 x 120 мм) и

пластинки силикагеля фирмы "Reanal" (95 x 100 мм). В качестве движущей фазы применяли 25 % раствор пропилацетата или изопропилацетата в бензоле. Объем пробы 10-100 мкл.

Результаты и обсуждение

Средний химический состав панциря до и после экстрагирования приведен в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Средний химический состав панциря креветки, %

Показатель	Сухой панцирь до экстрагирования		Панцирь после экстрагирования		Панцирь после экстрагирования и высушивания	
	в продукте	в сухом веществе	в продукте	в сухом веществе	в продукте	в сухом веществе
I	2	3	4	5	6	7
Влажность	8,4	-	71,8	-	7,2	-
Сырой белок (N x 6,25)	47,7	52,1	11,2	39,6	55,8	60,1
Сырой жир	4,1	4,4	0,4	1,2	3,4	3,7
Зола	24,6	26,9	7,8	27,6	25,3	27,3

Выход концентрированного красителя составлял 2-4 % от веса панциря.

Т а б л и ц а 2

Содержание астаксантина и его эфиров в сухом панцире креветки и в красителе

	Сухой панцирь креветки	Краситель
Астаксантин, мг %	2,598	39,061
В том числе, %		
диэфир астаксантина	70	59
моноэфир астаксантина	5	21
свободный астаксантин	24	20

В таблице 2 приведены полученные результаты о содержании Ас и его эфиров в панцире креветки и в красителе. Содержание Ас в сухом панцире было 2,6 мг %, что соответствует литературным данным [2].

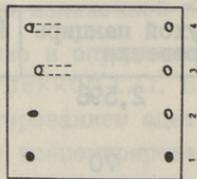


Рис. 2. Рисунок хроматограммы на пластинках "Silufol":
1 - краситель; 2 - диэфир атаксангина; 3 - моноэфир атаксангина; 4 - свободный атаксангин.

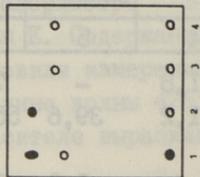


Рис. 3. Рисунок хроматограммы на пластинках силикагеля марки ЛС: 1 - краситель; 2 - диэфир атаксангина; 3 - моноэфир атаксангина; 4 - свободный атаксангин.

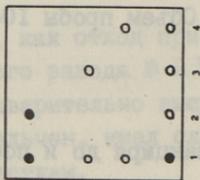


Рис. 4. Рисунок хроматограммы на пластинках фирмы "Reanal":
1 - краситель; 2 - диэфир атаксангина; 3 - моноэфир атаксангина; 4 - свободный атаксангин.

На рисунках 2, 3 и 4 приведены результаты тонкослойной хроматографии.

На пластинках "Silufol" (рис. 2) краситель и фракция диэфира Ас дали розовые пятна, моноэфир Ас и свободный Ас желтые пятна с "хвостиком". Разделения красителя не произошло, так как значения R_f для составных компонентов проб очень близки (0,94–0,98).

На пластинках силикагеля марки ЛС (рис. 3) диэфир Ас дал оранжевое пятно ($R_f = 0,88$), моноэфир Ас и свободный Ас дали желтые пятна (R_f у обоих 0,76). Краситель разделяли на два пятна – на оранжевое пятно диэфира Ас ($R_f = 0,89$) и на желтое пятно моноэфира Ас вместе со свободным Ас ($R_f = 0,74$).

На пластинках фирмы "Reanal" (рис. 4) из красителя получены три пятна – розовое пятно диэфира Ас ($R_f = 0,8–0,9$), красное пятно моноэфира Ас ($R_f = 0,55–0,65$) и оранжево-красное пятно свободного Ас ($R_f = 0,25–0,35$). Фракции Ас из колонки имели следующие значения R_f : 0,84–0,85 для диэфира Ас, 0,55–0,60 для моноэфира Ас и 0,30–0,32 для свободного Ас.

Из полученных данных явствует, что наилучшее разделение астаксантинов достигнуто на пластинках фирмы "Reanal". Самым ярким красным цветом обладает диэфир Ас, содержание которого самое высокое (см. табл. 2).

В ы в о д ы

1. Панцирь креветки является подходящим сырьем для получения красного красителя. Выход концентрата составляет 2–4 %.

2. Наиболее интенсивный красный цвет имеет диэфир астаксантина, содержание которого составляет 59 % от общего содержания астаксантина в красителе.

3. Для экспресс-анализа и определения каротиноидных пигментов в красителе предлагается применение соотношения

$$\frac{E_{490}}{m}$$

где E_{490} – экстинкция хлороформенного раствора красителя при длине волны 490 нм, объем раствора 100 мл;

m – навеска концентрата, г (около 0,1 г точностью 0,0001 г).

Л и т е р а т у р а

1. S i m p s o n K.L., K a t a y a m a T., C h i c h e s t e r C.O. Carotenoids in fish feeds. - In: Carotenoids as colorants and vitamin A precursors / Edited by J.Ch. Bayernfeind. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1981, p. 463-538.

2. L a m b e r t s e n G., B r a e k k a n O.R. Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. - J. Sci. Fd. Agric., 1971, vol. 22, p. 99-101.

T. Rand, J. Kann, T. Kõrgmaa

Isolation and Composition of Carotenoid Pigment from Shrimp Exoskeleton

Abstract

Red-orange carotenoid pigment has been isolated from dried exoskeleton of shrimp using the ethanol extraction process. The value of 2 - 4 % of the colour extract has been recovered.

The content and composition of carotenoid pigment have been investigated by column and thin-layer chromatography. It has been found that fraction of astaxanthin diesters has more intensive red colour than fractions of monoesters and free astaxanthin.

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ДЕЙСТВИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК

I. УСТАНОВКА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Иммобилизованные на нерастворимых носителях клетки микроорганизмов могут иметь ряд преимуществ как перед обычными культурами, так и перед иммобилизованными ферментами. Так, с помощью иммобилизованных клеток *Sacch.cerevisiae* показана возможность осуществления многих биохимических реакций. Иммобилизованные интактные клетки способны к жизнедеятельности и сохраняют ферментативную активность и ультраструктурную организацию в течение многих суток [1].

Сохранение жизнеспособности (метаболической активности) клеток после иммобилизации необходимо для обеспечения биохимических реакций с получением целевого метаболита. Наиболее общим показателем метаболической активности аэробных микроорганизмов является уровень дыхания иммобилизованных клеток [2]. В частности, в случае клеток, требующих для поддержания их роста низких концентраций растворенного кислорода, таких как *Saccharomyces cerevisiae* [1], этот показатель при наличии чувствительного метода анализа может оказаться наиболее информативным.

Интенсивность использования кислорода является важной составляющей характеристики биореакторов для аэробных процессов. Разработаны различные методы измерения концентрации растворенного кислорода и скорости его потребления микроорганизмами, применимые как к модельным системам, так и к промышленным культиваторам [3, 4]. Нами для определения дыхательной активности клеток *Sacch.cerevisiae* был применен один из вариантов динамического метода, который обычно применяется при исследовании условий массопередачи кислорода в ферментаторах. Однако нашей целью является исследование

не массопередачи между газовой фазой и средой, а транспорта кислорода, растворенного в жидкой среде, к иммобилизованным в гранулах биокатализаторов клеткам микроорганизмов.

В литературе экспериментальные установки для таких измерений не описаны. В данном сообщении излагаются принципы построения и использования собранного нами аппарата, а также первые результаты, полученные с его помощью. Результаты определения кинетических характеристик иммобилизованных клеток будут сообщены в дальнейшем.

Описание установки

Для определения потребления кислорода микроорганизмами нами собрана установка, которая включает (рис. 1) ячейку I с датчиком растворенного кислорода, циркуляционный контур с ячейками для измерения pH (2) и Eh-окислительно-восстановительного потенциала (3) культуральной жидкости и систему подачи стерильного воздуха в ячейку I. Ячейки I, 2 и 3 термостатированы при одинаковой температуре; магнитная мешалка B обеспечивает постоянную скорость перемешивания среды с биокатализатором в ячейке I.

При конструировании ячейки I с датчиком концентрации растворенного кислорода мы использовали в качестве прототипа известное [5] устройство. Однако несмотря на аналогичность конструкции, наша ячейка имеет более самостоятельное применение. В ней предусмотрена возможность аэрации, т.е. калибровки датчика, и выполнение верхней части ячейки в форме конуса и наличие отводящего канала у вершины конуса способствуют полному удалению пузырьков воздуха перед началом измерений. Внешняя циркуляция культуральной жидкости не является обязательной для получения параметрической кривой и используется для получения дополнительной информации. Если описанное [5] устройство не имеет термостатирующей рубашки, то в нашем случае это условие является обязательным и реализовано.

Собранная нами установка применима для продолжительных исследований. Эти исследования проводятся циклами.

Измерительный цикл начинается с заполнения ячейки жидкой питательной средой. При заданной в рубашке температуре

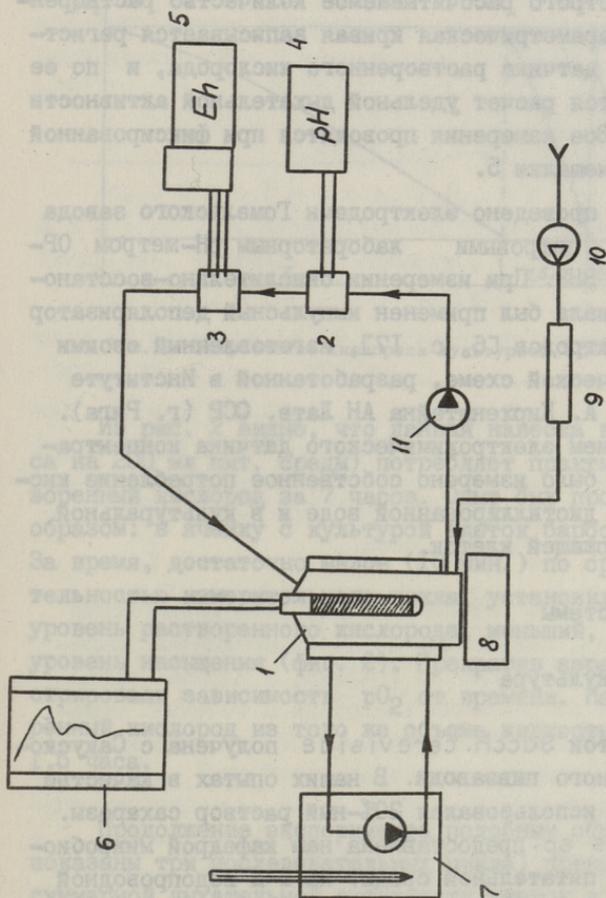


Рис. 1. Схема экспериментальной установки. 1 — ячейка с датчиком концентрации хлорода; 2 — ячейка для измерения pH; 3 — ячейка для измерения Eh; 4 — pH-метр; 5 — милливольтметр с деполяризатором электродов; 6 — регистрирующий прибор датчика концентрации хлорода; 7 — термостат; 8 — магнитная мешалка; 9 — стерильный фильтр для воздуха; 10 — компрессор, 11 — насос.

питательная среда насыщается кислородом путем подачи воздуха через стерильный фильтр до выхода показания кислородного датчика на стационарный уровень. После этого подача воздуха прекращается, в ячейку доливается питательная среда так, чтобы полностью вытеснить оставшийся воздух, и вводится навеска клеточного материала (в нативном или иммобилизованном виде). Таким образом, поверхностная аэрация отсутствует, и клетки поглощают строго рассчитываемое количество растворенного кислорода. Параметрическая кривая записывается регистрирующим прибором датчика растворенного кислорода, и по ее наклону производится расчет удельной дыхательной активности микроорганизмов. Все измерения проводятся при фиксированной частоте вращения мешалки 5.

Измерение рН проведено электродами Гомельского завода согласованными с цифровыми лабораторным рН-метром ОР-218 производства ВНР. При измерении окислительно-восстановительного потенциала был применен импульсный деполяризатор измерительных электродов [6, с. 17], изготовленный своими силами по электрической схеме, разработанной в Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латв. ССР (г. Рига). Перед использованием электрохимического датчика концентрации кислорода [7] было измерено собственное потребление кислорода датчиком в дистиллированной воде и в культуральной жидкости, не содержащей клеток.

Испытание системы

Материалы и культура

Культура клеток *Sacch. cerevisiae* получена с Сакусского экспериментального пивзавода. В наших опытах в качестве питательной среды использовался 20%-ный раствор сахарозы. Культура *Bacillus* sp. предоставлена нам кафедрой микробиологии МГУ. Состав питательной среды: на 1 л водопроводной воды 150 г картофеля и 15 г мела.

Иммобилизация клеток проведена по принципу включения в кальций-полисахаридный гель [2] с содержанием клеток 25 % (по весу). Гранулы катализатора имели неправильную форму, но были достаточно однородны по размерам.

Сначала мы определяли потребление растворенного кислорода нативными клетками *Sacch. cerevisiae* при 36 °С. После насыщения питательной среды кислородом навеска дрожжей, высушенных на нутч-филтре, помещалась в ячейку с датчиком растворенного кислорода.

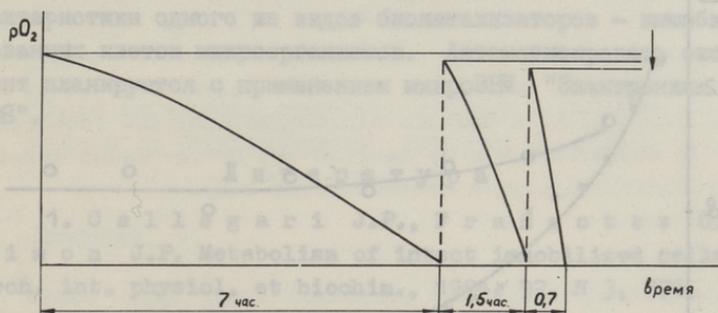


Рис. 2. Потребление кислорода культурной *Sacch. cerevisiae*.

Из рис. 2 видно, что данная навеска клеток (2 г вл. веса на 200 мл пит. среды) потребляет практически весь растворенный кислород за 7 часов. Опыт был продолжен следующим образом: в ячейку с культурой клеток барботировали воздух. За время, достаточно малое (10 мин.) по сравнению с длительностью измерительного цикла, установился стационарный уровень растворенного кислорода, меньший, чем начальный уровень насыщения (фиг. 2). Прекратив аэрацию, снова регистрировали зависимость pO_2 от времени. На этот раз растворенный кислород из того же объема жидкости был поглощен за 1,5 часа.

Продолжение эксперимента подобным образом (на рис. 2 показаны три последовательных цикла) приводит к увеличению суммарной дыхательной активности клеток в ячейке, что можно объяснить ростом клеток в культуре.

Аналогичный эксперимент был проведен с культурой *Bacillus* sp.. Наблюдалось изменение pO_2 в системе, схожее с

представленным на рис. 2. Рост клеток в ходе опыта подтвержден данными микроскопического исследования.

скорость потребления
кислорода

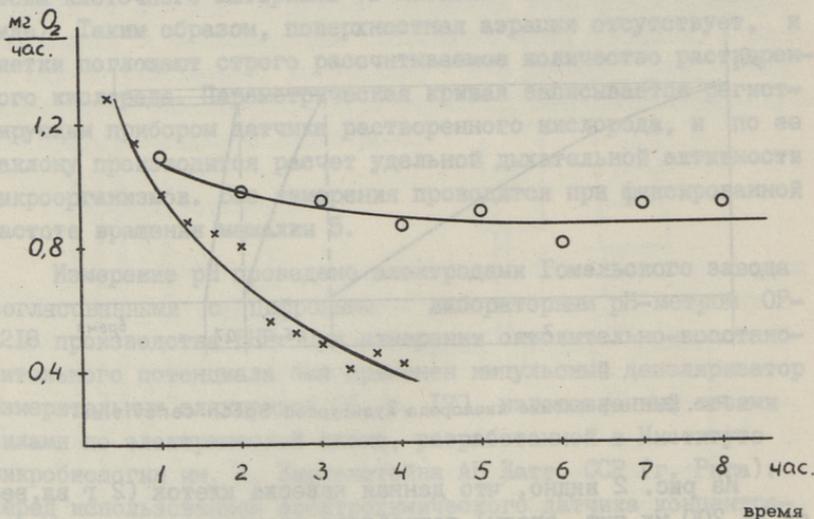


Рис. 3. Скорость потребления растворенного кислорода клетками
 —○—○— нативными,
 —x—x— иммобилизованными.

На рис. 3 приведена зависимость скорости потребления кислорода от времени, полученная дифференцированием параметрической кривой. Как видно из графика, в случае нативных клеток скорость потребления кислорода в течение измерительного цикла изменяется незначительно. Это показывает, что нативные клетки имеют низкое значение K_M по кислороду, т.е. снижение концентрации кислорода мало влияет на его потребление. В следующих циклах скорость потребления растет из-за прироста клеток. В случае иммобилизованных клеток скорость потребления кислорода существенно зависит от его концентрации, что свидетельствует об увеличении кажущегося значения K_M в результате иммобилизации. Этот вывод согласуется с теорией о влиянии диффузионного сопротивления на скорость ферментативных реакций.

Таким образом, имеется возможность контролировать жизнеспособность аэробных микроорганизмов, проводя измерения только одного параметра - уровня растворенного кислорода в культуральной жидкости. В сочетании с аналитическим определением целевого метаболита и предусмотренной возможностью измерения pH и Eh мы имеем измерительный комплекс для характеристики одного из видов биокатализаторов - иммобилизованных клеток микроорганизмов. Автоматизировать эксперимент планируется с применением микроЭВМ "Электроника ДЗ-28".

Л и т е р а т у р а

1. Callegari J.P., Francotte C., Simon J.P. Metabolism of intact immobilized cells. - Arch. int. physiol. et biochim., 1984, 92, N 3, B76.
2. Brodelius P., Nilsson K. Entrapment of plant cells in different matrices. - FEBS Letters, 1980, 122, N 2, p. 312-316.
3. Sobotka M., Prokop A., Dunn I.J., Einsle A. Review of methods for the measurement of oxygen transfer in microbial systems. - Annual Reports Ferment. Processes, 1982, 5, p. 127-210.
4. Spriet J.A., Botterman J., de Buyser D.R. et al. A computer-aided noninterfering on-line technique for monitoring oxygen-transfer characteristics during fermentation processes. - Biotechnol. and Bioeng., 1982, 24, N 7, p. 1605-1621.
5. Кувшинников В.Д., Eroшин В.К., Сикита Б. Устройство для измерения поглощения кислорода микроорганизмами. А.с. 487540 СССР. Оpubл. в Б.И., 1983, № 1, МКИ С 12М 1/34.
6. Кристапсонс М.Ж., Хабибуллин Р.Э. Принципы измерения окислительно-восстановительного потенциала в биотехнологии микробного синтеза. Обзорная информация. Серия УП. Процессы и аппараты микробиологических производств. - М., 1985, 36 с.
7. Марвет Р.В., Яэтме Т.Х. Электрохимический датчик концентрации кислорода. А.с. № 532798 СССР. Оpubл. в Б.И., 1976, № 39, МКИ G 01 N 27/46 // G 01 N 27/30.

Research of Kinetics of Immobilized Cells I
Apparatus for the Estimation of Oxygen Consumption

Abstract

An apparatus for the estimation of kinetic parameters of biocatalyst is described. The biocatalyst represents the immobilized cells of aerobic microorganisms. The respiratory activity monitoring can be carried out by the measurement of the dissolved oxygen concentration only.

А.К. Абдвахитова, М.И. Креэн,
Н.Р. Холстинина

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ ГИДРОЛИЗАТА
КАЗЕИНА НА РОСТ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *Papaver
somniferum*

Введение

Ранее нами было показано, что используемые в составе питательной среды гидролизаты казеина, полученные различными методами, по-разному влияют на рост каллусной культуры клеток *Papaver somniferum* [1]. Так гидролизат казеина (ГК), полученный с помощью иммобилизованного протосубтилина, способствует наибольшему накоплению биомассы, что примерно в 2-3 раза превышает накопление биомассы в случае ГК, полученного с помощью панкреатина. Испытанные нами ГК различались степенью гидролиза и, следовательно, пептидным составом.

Целью данной работы было выяснение влияния различных пептидных фракций одного препарата ГК на рост каллусной культуры клеток *P. somniferum*.

Материалы и методы

Культура. Каллусную культуру клеток *P. somniferum* выращивали в пробирках на агаризованной среде при 26 °С, в темноте. Минеральную основу питательной среды готовили по прописи Мурасиге и Скува [2], добавляли витамины, ростовые вещества, сахарозу, гидролизат казеина. Пересаживали каллусы через 29-32 дня. Для характеристики роста культуры в различных условиях питания снимали ростовые кривые, отражающие скорость нарастания сырого веса w , относительный прирост сырого веса ткани ($\frac{w-w_0}{w_0}$) во времени, ростовый индекс $\frac{w}{w_0}$ и относительное содержание сухого вещества в ткани. Вес ткани каллусов измеряли через каждые 3-4 дня. Сухую

ткань получали высушиванием сырой биомассы клеток при 60-70 °С в течение суток

Гидролизат казеина. В работе использовали гидролизат казеина, полученный с помощью щелочной протеазы *Vac. subtilis* (протосубтилин), иммобилизованной на органоминеральном носителе, разработанном на кафедре органической и биологической химии ТПИ. Условия получения гидролизата казеина приведены в нашей предыдущей работе [1]. Использовали сухой препарат гидролизата казеина с содержанием аминокислотного азота 4,7 %.

Ультрафильтрация. Для фракционирования использовали лабораторную ультрафильтрационную установку "Millipor". Использовали ацетат-целлюлозную мембрану УАМ-150 типа "Владипор" со средним диаметром пор ~15 нм. Граница разделения мембраны по молекулярной массе порядка 5000. Фильтрацию проводили до уравнивания объемов фильтрата и концентрата. Полученные растворы во избежание микробияльного заражения автоклавировали и хранили в холодильнике. Содержание белка в концентрате 50-80 мг/мл, в фильтрате 30-44 мг/мл.

Гель-фильтрация. Разделение пептидов ГК гель-фильтрационным способом проводили на колонке размером 56 x 2 см, наполненной сефадексом Г-25 (medium). Свободный объем колонки определяли с помощью синего декстрана, он равен 40 мл. В колонку вносили 5 мл 2%-ного раствора ГК в боратном буфере с pH = 8,5, элюировали тем же боратным буфером со скоростью 1,8 мл/мин, объем отдельной фракции равен 3 мл.

В целях получения отдельных фракций в больших количествах использовали колонку размером 45 x 5,5 см. Поскольку полученные пептидные фракции в дальнейшем использовали для приготовления питательных сред для каллусных культур, то гидролизат казеина растворяли и элюировали дистиллированной водой. Свободный объем колонки равен 350 мл, скорость элюирования 10 мл/мин, объем отдельной фракции - 10 мл. В колонку вводили 30 мл либо ультрафильтрационного концентрата (20 мг/мл) либо фильтрата (30 мг/мл).

Объемный коэффициент распределения каждой фракции пептидов определяли по формуле:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

где V_0 - свободный объем;
 V_t - полный объем, соответствующий удерживаемому объему триптофана;
 V_e - объем выхода пептида или белка [3].

Лиофилизационная сушка. В целях лучшей сохранности и удобного обращения фракции пептидов высушивали лиофилизацией. Сушку проводили на лабораторной установке NETOSICC (Denmark).

Результаты и обсуждение

В данной работе была поставлена задача выяснить влияние разных пептидных фракций гидролизата казеина, полученного с помощью иммобилизованного протосубтилина на рост клеток.

Полученные путем ультрафильтрации фракции, а именно фильтрат и концентрат, а также комплексный гидролизат казеина добавляли к питательным средам в количестве 200 мг/л, а затем на каждый из трех вариантов питательной среды высевали клетки, которые выращивали сроком 3-4 недели. Это необходимо для того, чтобы клетки привыкли именно к данному варианту питательной среды. Отличия, касающиеся роста, цвета и структуры ткани, проявились уже в клетках первого пассажа. На 2-3-ей неделе роста было видно, что клетки хуже растут на питательной среде, содержащей фильтрат ГК и кроме того быстрее темнеют, чем клетки на питательных средах, содержащих пермеат или комплексный гидролизат.

Второй пассаж клеток производили в пробирки и наблюдали за ростом клеток в течение месяца. Уже на 18-е сутки роста наблюдали подобное вышеописанному явление. На 25-е сутки роста каллусы, выращенные на среде с фильтратом ГК, становятся темными приблизительно на 2/3 объема, а каллусы, выращенные на концентрате ГК - лишь на 1/3 объема. К концу месяца все каллусы приобретают коричневый цвет. Кривые роста клеток II пассажа каллусной культуры *P. somniferum* представлены на рис. 1. Наименьшими интенсивностью роста и накоплением биомассы характеризовалась ткань, культивируемая на среде с добавкой фильтрата ГК, в то время как концентрат ГК, а также комплексный ГК способствуют большему накоплению биомассы, что превышает вариант с фильтратом ГК

примерно в 2-3 раза. За цикл роста на 30-е сутки накопление биомассы составило ~400 г на 1 л среды в случае добавления в питательную среду концентрата ГК и ~200 г на 1 л среды за пассаж в случае фильтрата ГК. Время удвоения сырого веса ткани для варианта с фильтратом ГК составляло примерно 8 дней, а для вариантов с концентратом ГК и комплексным ГК 3-5 дней. Ростовый индекс при месячном культивировании составил соответственно 10,1 и 18,8. Динамика содержания сухого вещества ткани (рис. 2) в целом одинакова для обоих вариантов опыта: на 11-12-е сутки роста наблюдается падение содержания сухого вещества в ткани каллуса в среднем на 2 %,

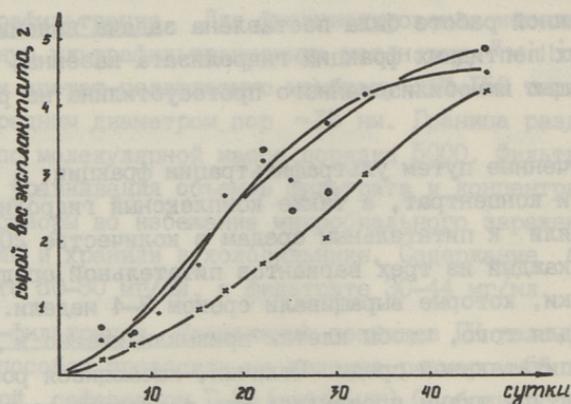


Рис. 1. Кривая роста клеток 11 пассажа каллусной культуры *P. Somniferum* на средах, содержащих разные фракции ГК. о - комплексный ГК, ● - концентрат ГК; × - ультрафильтрат ГК.

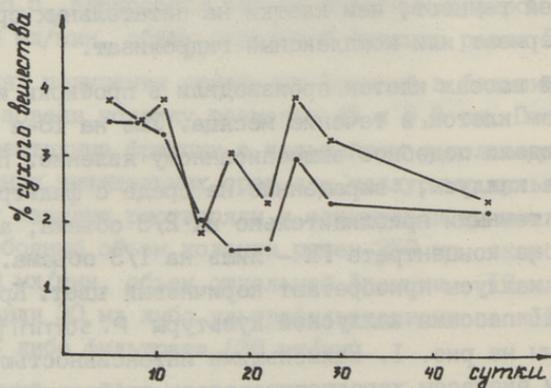


Рис. 2. Динамика содержания сухого вещества в ткани клеток 11 пассажа каллусной культуры *P. Somniferum* на средах с разными фракциями ГК. ● - концентрат ГК; × - фильтрат ГК.

а затем временное нарастание. Клетки каллусной культуры, выращенные на среде с фильтратом ГК, с меньшим выходом биомассы отличаются и меньшей скоростью роста в сравнении с клетками каллусной культуры на среде с концентратом ГК (рис. 3). Максимальное накопление биомассы наблюдается через 30–35 дней в случае питательной среды с комплексным ГК и концентратом ГК, а через ~40 дней в случае фильтрата ГК.

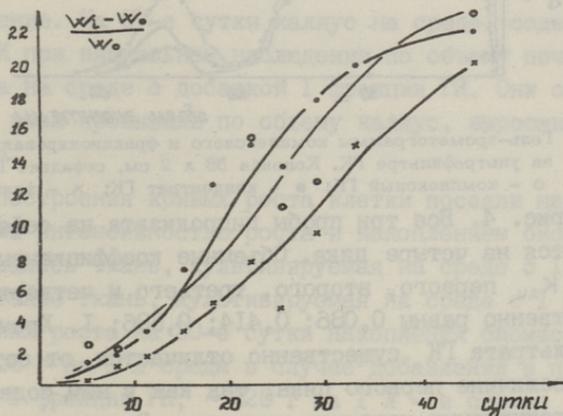


Рис. 3. Динамика относительного прироста биомассы клеток 11 пассажа каллусной культуры *P. somniferum* на средах, содержащих: ● — концентрат ГК; x — фильтрат ГК; ○ — комплексный ГК.

Таким образом, нами было показано, что не только полученные разными протеазами гидролизаты казеина по-разному влияют на рост растительных клеток, но и разные пептидные фракции одного и того же препарата гидролизата казеина различаются по своему влиянию на рост клеток каллусной культуры. При этом фракция, которая содержит высокомолекулярные пептиды ($M. v. > 5000$) наряду с низкомолекулярными, способствует более интенсивному росту клеток по сравнению с фракцией, которая содержит лишь пептиды с молекулярным весом ниже 5000.

Целью нашей дальнейшей работы явилось изучение влияния пептидных фракций ГК, полученных гелем-фильтрацией на сефадексе Г-25, на рост клеток каллусной культуры. Гель-хроматограммы ультрафильтрата, концентрата и комплексного ГК пока-

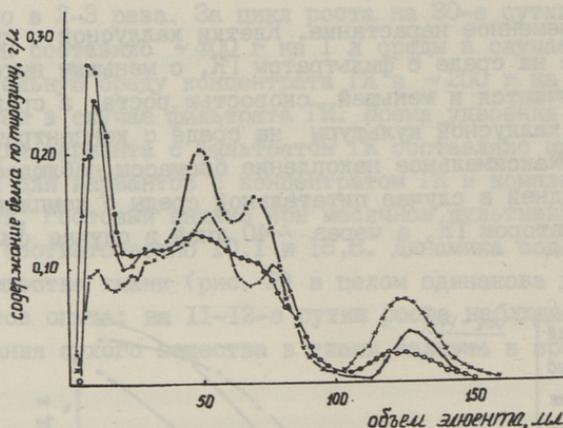


Рис. 4. Гель-хроматограммы комплексного и фракционированного на ультрафильтре ГК. Колонка 56 x 2 см, сефадекс Г-25.
 о - комплексный ГК; ● - концентрат ГК; × - фильтрат ГК.

заны на рис. 4. Все три пробы гидролизата на сефадексе Г-25 разделяются на четыре пика. Объемные коэффициенты распределения K_{AV} первого, второго, третьего и четвертого пиков соответственно равны 0,086; 0,414; 0,586; 1. Хроматограмма ультрафильтрата ГК существенно отличается от остальных двух по величине первого пика, так как в нем содержание крупномолекулярных пептидов ничтожно. В связи с тем, что II и III пики плохо разделяются, их соединяли и в дальнейшем использовали три пептидные фракции - первая (I пик), вторая (II + III пики), третья (IV пик). Относительное содержание белка в 3-х фракциях комплексного ГК составляет 26, 55 и 7 %, для концентрата эти фракции составляют 7, 40 и 7 %, для фильтрата соответственно 8, 67 и 13 %.

При хроматографировании ультрафильтрата и концентрата ГК в колонке с размерами 45 x 5,5 см концентрат разделяется на три фракции со следующими объемными коэффициентами распределения K_{AV} : I пик - 0,033; II пик - 0,700; III пик - 1. Ультрафильтрат ГК разделяется практически на две фракции - I пик весьма незначительный по величине. Объемные коэффициенты распределения K_{AV} равны: для II пика - 0,733, для III пика - 0,983.

Полученные на этой колонке фракции пептидов высушивали методом лиофилизационной сушки и добавляли в питательные среды в количестве 200 мг/л с целью исследования их влияния на рост каллусной культуры. Уже в клетках перво-

го пассажа, произведенного в колбы, проявились отличия, касающиеся роста и цвета культуры. Каллус, растущий на III фракции ГК, содержащей свободные аминокислоты и низкомолекулярные пептиды, начал темнеть уже на 15-е сутки роста, в то время, как каллусы на остальных фракциях ГК оставались светлыми. На 10-е сутки прирост каллусной культуры на среде, содержащей I фракцию ГК, по объему был в 2 раза больше, чем прирост культуры на среде с III фракцией ГК, каллус на среде с добавкой II фракции ГК занимал по объему промежуточное положение. На 27-е сутки каллус на среде, содержащей II фракцию ГК при визуальном наблюдении по объему почти дорос до каллуса на среде с добавкой I фракции ГК. Они оба примерно в 4 раза превышали по объему каллус, выросший на III фракции ГК.

Для построения кривых роста клетки посеяли на пробирки. Наименьшими интенсивностью роста и накоплением биомассы характеризовалась ткань, культивируемая на среде с III фракцией ГК, а также ткань, культивируемая на среде с I фракцией ГК. За цикл роста на 30-е сутки накопления биомассы составило ~400 г на I л среды в случае добавления в питательную среду I фракции ГК, ~420 г на I л - в случае III фракции ГК, ~520 г на I л - в случае II фракции ГК, ~500 г на I л - при добавлении комплексного ГК. Ростовые индексы при добавлении I, II, III фракций ГК и комплексного ГК в питательные среды при месячном культивировании были соответственно равны 19,8; 25,9; 21,2 и 25,1. Время удвоения сырого веса ткани для варианта с II фракцией ГК составило 8-9 дней, в то время как для варианта с III фракцией ГК время удвоения было 11 дней, а для варианта с I фракцией ГК было наименьшим и составило 7 дней (рис. 5). Динамика содержания сухого вещества ткани (рис. 6) в целом одинакова для всех вариантов питательной среды, кроме варианта с III фракцией ГК, при добавлении которой интенсифицируются процессы клеточного деления в лаг - фазе роста.

Как нами было уже показано в опытах с ультрафильтратом ГК, концентратом ГК и комплексным ГК, клетки одинаково хорошо растут на среде с концентратом и комплексным ГК и хуже на среде с ультрафильтратом ГК (рис. 1). Гель-фильтрационные хроматограммы этих препаратов ГК (рис. 4) позволяют предположить, что наиболее высокомолекулярная фракция I, присутствующая

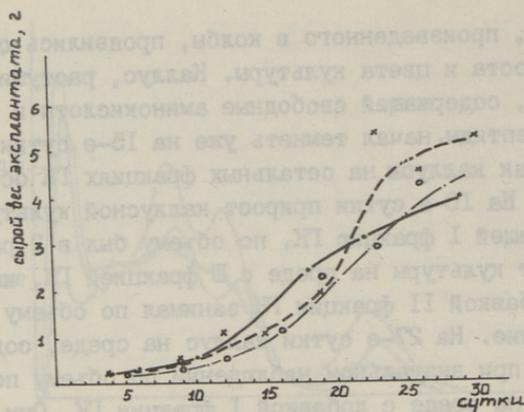


Рис. 5. Кривые роста клеток каллусной культуры *P. somniferum* на средах, содержащих разделенные на сефадексе Г-25 пептидные фракции ГК. ● - 1 фракция ГК; × - 11 фракция ГК, ○ - 111 фракция ГК.

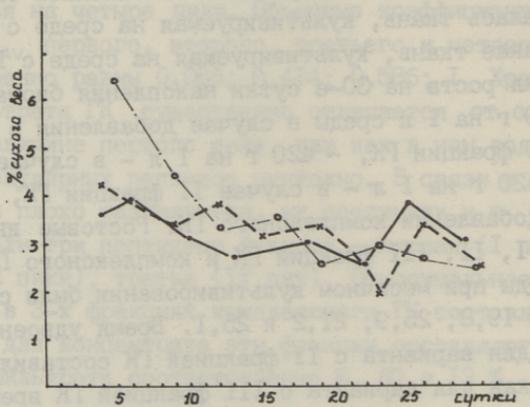


Рис. 6. Динамика содержания сухого вещества в ткани клеток каллусной культуры *P. somniferum* на средах с разными фракциями ГК. ● - 1 фракция ГК; × - 11 фракция ГК; ○ - 111 фракция ГК.

щая как в комплексном ГК, так и в концентрате ГК, и которой практически нет в фильтрате ГК, является определяющей в ростовом процессе. Вышеприведенные данные, однако, позволяют сделать и другое предположение о том, что самая низкомолекулярная фракция оказывает в определенных концентрациях некоторое ингибирующее действие на рост клеток, что само по себе очень странно, т.к., казалось бы, клетки должны в первую очередь использовать пептиды в наиболее расщеплен-

ном, готовом для потребления виде, но как показывает опыт, они предпочитают более высокомолекулярные фракции ГК. Наши дальнейшие исследования позволили внести ясность в рассматриваемый процесс. Из ростовых кривых каллусной культуры на питательных средах с I, II и III фракциями ГК видно, что I фракция ГК является определяющей для роста культуры на ранней логарифмической фазе роста, а II фракция ГК является определяющей на поздней логарифмической фазе роста. Поэтому можно сделать заключение, что более выраженный ростовой эффект при добавлении концентрата ГК и комплексного ГК по сравнению с фильтратом ГК определяется не одной какой-то фракцией, а двумя фракциями: I ГК и II ГК. Подтверждением подобного заключения является сравнение кривых роста клеток на I и II фракциях с кривой роста клеток на комплексном ГК (см. рис. 5). Ростовая кривая, составленная из участка ростовой кривой I на ранней логарифмической фазе и участка ростовой кривой II на поздней логарифмической фазе, в точности повторяет кривую роста клеток на комплексном ГК.

Что касается низкомолекулярной III фракции ГК, то она, по-видимому, играет определенную роль в процессах клеточного деления.

Л и т е р а т у р а

1. Архангельская Н.В., Абдвахитова А.К., Калда А.Х., Креэн И.И. Влияние разных источников азотного питания на рост каллусной культуры. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1985, № 598, с. 117-127.

2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964, с. 52.

3. Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. М., 1978, т. 2. с. 428.

A. Abdvakhitova, N. Holstina,
M. Kreen

Comparison of the Influence of Different Fractions
of Caseine Hydrolysat on the Growth of Papaver
Somniferum Callus Culture

Abstract

Papaver somniferum callus culture has been grown in nutrient medium with different fractions of caseine hydrolysate as nitrogen source. Different fractions of caseine hydrolysate have been obtained by gel-filtration in columns with Sephadex G-25. Culture biomass yield and growth rates have been studied. Callus culture grown on highmolecular fractions has been characterized with rapid growth and high biomass yield in comparison with low molecular fraction.

С о д е р ж а н и е

1.	А.И. Кёстнер, И.Р. Роос. Программы для оптимизации биокаталитических процессов. Сообщение II. Оптимизация гидролиза лактозы в молочной сыворотке.....	3
2.	М.А. Курвитс, Э.Х. Сиймер. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение X. Кинетика гидролиза лактозы с помощью β -галактозидазы из <i>Penicillium canescens</i>	15
3.	М.К. Фриеденталь. Химико-технологическая характеристика белков подсырной сыворотки	25
4.	М.К. Фриеденталь, А.В. Игнат. Хроматографическое изучение процесса денатурации сывороточного альбумина.....	37
5.	А.Я. Клярд, Э.Х. Сиймер. Модификация белковых веществ иминоэфирами. Сообщение III. Микрокалориметрическое исследование кинетики реакции гидролиза иминоэфиров.....	47
6.	А.Я. Клярд, М.И. Креэн, К.Э. Паппель. Иммуобилизация ферментов иминоэфирами и азидами на органоминеральном носителе.....	55
7.	Г.И. Микшите, А.А. Дикчювене, А.Б. Паулюконис, Д.А. Казлаускас, А.И. Кёстнер. Иммуобилизация микробных клеток включением в модифицированный агар	67
8.	Т.И. Ранд, Ю.М. Канн, Т.А. Кыргма. Изучение выделения и состава каротиноидов из панциря креветки.	79
9.	Г.Г. Калбин. Исследование кинетики действия иммуобилизованных клеток. I. Установка для определения потребления кислорода.....	85
10.	А.К. Абдвахитова, М.И. Креэн, Н.Р. Холстинина. Сравнение влияния различных фракций гидролизата казеина на рост каллусной культуры.....	93

EESTI AKADEEMILINE RAAMATUKOGU



1 0200 00089549 4

Цена 85 коп.