

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Бийский технологический институт (филиал)
федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова»

М.Э. Ламберова

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

В двух частях

Часть 2

Допущено научно-методическим советом БТИ АлтГТУ
для внутривузовского использования в качестве
учебного пособия для самостоятельной подготовки
к практическим занятиям по специальным курсам для студентов
направлений подготовки 240700.62 и 260100.62
всех уровней и форм обучения

Издательство Алтайского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова
2013

УДК 663.15 (075.8)

Л21

Рецензенты: Е.Н. Широкова, к. т. н., зав. кафедрой перерабатывающей промышленности АКГБУ СПО «Алтайский колледж промышленных технологий и бизнеса»,
А.Н. Паседкина, к. б. н., доцент кафедры ОХЭТ
БТИ АлтГТУ

Ламберова, М.Э.

Л21 Ферментативная кинетика: учебное пособие. В 2 ч. Ч. 2 / М.Э. Ламберова; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. – 100 с.

Настоящее учебное пособие содержит теоретические сведения о физических и химических способах иммобилизации ферментов на нерастворимых носителях и практические – о математических моделях для расчетов скорости гетерогенных ферментативных реакций. Рассмотрено влияние на общую скорость процесса геометрии и других свойств носителей, а также массопередачи, диффузии и внешних условий рН, температуры и т.д. Кроме того, показано применение ферментов в биотехнологическом производстве и медицине.

УДК 663.15 (075.8)

Рассмотрено и одобрено на заседании научно-методического совета
Бийского технологического института
Протокол № 7 от 25.06.2013 г.

© Ламберова М.Э., 2013
© БТИ АлтГТУ, 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1 Теоретическая часть.....	5
1.1 Применение гидролитических ферментов.....	5
1.1.1 Гидролиз крахмалосодержащих материалов	11
1.1.2 Гидролиз целлюлозосодержащих материалов.....	17
1.1.3 Гидролиз белковых веществ	26
1.1.4 Применение эстераз	29
1.1.5 Ферментные смеси, пектиновые ферменты и другие пути использования ферментов.....	31
1.2 Области применения ферментативных реакций в растворах	33
1.2.1 Применение ферментов в медицине	33
1.2.2 Применение негидролитических ферментов в промышленности	35
1.3 Технологические процессы с участием иммобилизованных ферментов.....	37
1.3.1 Методы иммобилизации ферментов	37
1.3.2 Промышленные процессы на иммобилизованных ферментах	48
1.3.3 Применение иммобилизованных ферментов в медицине и биохимическом анализе.....	56
1.3.4 Утилизация и регенерация кофакторов	61
2 Практическая часть	64
2.1 Ферментативные реакции в гетерогенных системах.....	64
2.2 Кинетика реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами.....	70
2.2.1 Влияние внешнего сопротивления массопередаче.....	72
2.2.2 Моделирование диффузии и реакций внутри частицы катализатора.....	78
2.2.3 Одновременное сопротивление массопередаче в граничном слое и внутри частицы катализатора.....	91
2.2.4 Влияние ингибиторов, температуры и рН на каталитическую активность и инактивацию иммобилизованных ферментов	93
Литература	99

ВВЕДЕНИЕ

В данном учебном пособии мы рассмотрим некоторые примеры практического применения ферментов, системы гетерогенного катализа и различные типы и методы получения иммобилизованных ферментных катализаторов. Кинетические параметры таких биокатализаторов зависят от массопередачи, диффузии и от природы биохимических реакций, поэтому важно знать совместное влияние этих факторов на свойства катализаторов.

Все применяющиеся в практике ферменты получают из природных источников. Хотя ферменты синтезируются в любой живой клетке, конкретный фермент целесообразно выделять только из одного источника – растения, животного или микроорганизма. Выделенные из животных ферменты могут иметь сравнительно высокую стоимость. Выделение растительных ферментов (например, папаина из папайи) обычно проще, но сырье является продовольственным. Из-за быстрого самовоспроизведения микроорганизмов по сравнению с растениями и животными микробиологические процессы проще приспособить к спросу на ферменты. С другой стороны, ферменты для производства пищевых продуктов или лекарственных препаратов могут производиться только с помощью безопасных микроорганизмов.

Все ферменты подразделяют на две категории – *внеклеточные* и *внутриклеточные*. К первой категории относятся ферменты, выделяемые клеткой в среду, где они расщепляют питательные полимерные вещества до низкомолекулярных соединений, которые могут проникать в клетку через клеточную стенку. Внутриклеточные ферменты в нормальных условиях сконцентрированы в объеме клетки и в среду не транспортируются; для их выделения необходимо дезинтегрировать клетки путем размола или другим способом.

Для некоторых областей применения ферментов необходимы чистые препараты. Например, глюкозооксидаза, применяющаяся для обессахаривания яиц (в производстве яичного порошка) не должна содержать протеолитических ферментов, а также чистые ферменты применяются в клинической диагностике и в процессах, связанных с производством и обработкой пищевых продуктов. А в других случаях используются ферментные препараты, содержащие в разном соотношении различные ферменты. Это необходимо учитывать при расчете кинетики катализируемых ими процессов.

1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1 Применение гидролитических ферментов

Кинетика ферментативных реакций, как правило, изучалась на наиболее чистых препаратах ферментов в растворах. В ходе таких исследований применялось минимальное число субстратов (лучше всего один), а также строго контролировались параметры среды в отношении содержания активаторов (Ca^{2+} , Mg^{2+} и т.п.), кофакторов и ингибиторов. Результаты таких исследований наиболее достоверно отражают кинетику ферментативных реакций. В то же время многие из ферментных препаратов, применяемых в промышленности, очищены в гораздо меньшей степени (таблица 1) [1].

Катализируемые гидролитическими ферментами реакции лежат в основе не только макроскопических процессов (порча пищевых продуктов, ожигение крахмала или обработка сточных вод), но и в химии процессов дозревания незрелых плодов, лизисе (автолизе) отмерших клеток, созревания мяса, производства сыра, предотвращении образования осадка в пиве, текстурировании кондитерских изделий, обработке ран или расшлихтовке текстиля.

Таблица 1 – Ферменты, применяемые в промышленности

Фермент	Источник	Применение	Примечание	Важность
1	2	3	4	5
<i>Амилазы, разжижающие крахмал</i>				
Диастаза	Солод	Улучшение пищеварения; добавка к хлебопродуктам; производство патоки	α - и β -амилазная активности	+++
Такадиастаза	<i>Aspergillus oryzae</i>		Содержат также протеазы, рибонуклеазу	+++
Амилаза	<i>Bacillus subtilis</i>	Расшлихтовка тканей; производство патоки, глюкозы, этанола	Неочищенные препараты содержат протеазы	+++
Кислотоустойчивая амилаза	<i>Aspergillus niger</i>	Улучшение пищеварения	pH_{opt} 4–5	+

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
<i>Амилазы, осажаривающие крахмал</i>				
Амилоглюкозидаза	<i>Rhizopus niveus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Endomycoopsis fibuliger</i>	Производство глюкозы	–	+++
<i>Протеазы из организмов животных и растений</i>				
Трипсин	Поджелудочная железа животных	Применяется в медицине, для мягчения, осветления пива	–	+++
Пепсин	Желудок животных	Улучшение пищеварения; для мягчения мяса	–	+++
α -Химотрипсин	Желудок животных	Применяется в медицине	–	+++
Реннин	Желудок теленка	Производство сыра	–	+++
Панкреатическая протеаза	Поджелудочная железа животных	Улучшение пищеварения и качества кормов; мягчение кожи; обезволашивание шкур; производство детергентов	–	++
Папаин	Папайя	Улучшение пищеварения; мягчение мяса; осветление пива	–	+++
Бромеллаин, фицин	Ананас, инжир		–	++
<i>Протеазы из микроорганизмов</i>				
Протеаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	Осветление и вкусовая обработка сакэ	–	+
Протеаза	<i>Aspergillus niger</i>	Улучшение пищеварения и качества кормов	Кислотоустойчивая, рН _{opt} 2–3	++

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Проте-аза	<i>Bacillus subtilis</i>	Производство детергентов и рыбных гидролизатов; разрушение желатиновых пленок при регенерации серебра; мягчение мяса	pH _{opt} 7	++
Проте-аза	<i>Streptomyces griseus</i>		pH _{opt} 8	++
Варидаза	<i>Streptococcus sp.</i>	Применяется в медицине	Производится компанией <i>Lederle</i>	++
Стрептокиназа	<i>Streptococcus sp.</i>		Профибринолизин	++
<i>Некоторые другие промышленно важные ферменты</i>				
Глюкозо-изомераза	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Arthrobacter simplex</i> , <i>Actinoplanes missouriensis</i>	Превращение глюкозы во фруктозу	Производится компаниями <i>Novo</i> , <i>ICI</i> , <i>Gist Brocades</i>	+++
Пенициллиназа	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Разрушение пенициллина	Производится компаниями <i>Takamine</i> , <i>Schenley</i>	+
Глюкозо-оксидаза	<i>Aspergillus niger</i> (Dee O, Dee G)	Связывание кислорода или деструкция глюкозы в пищевых продуктах; производство яичного порошка	Производится компанией <i>Takamine</i>	+
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Определение глюкозы	Производится компанией <i>Nagase Co.</i>	+

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Гиалу- ронидаза	Живот- ные, бак- терии	Применяется в медицине	–	+
Липаза	Поджелу- дочная железа, р. <i>Rhizo- pus</i>	Улучшение пищеварения и вкусовых ка- честв молочных продуктов	–	+
Цито- хром <i>c</i>	р. <i>Candida</i>	Применяется в медицине	Производит- ся компанией <i>Sankyo Co.</i>	+
Каталаза		Стерилизация молока		
Керати- наза	<i>Streptomy- ces fradiae</i>	обезволашива- ние шкур	Производит- ся компанией <i>Merck Co.</i>	+
5'- Фосфо- диэсте- раза	<i>Penicillium citrinum, Streptomy- ces griseus, Bacillus subtilis</i>	Производство 5'-нуклеотидов (инозиновой и гуаниловой кислот)	Производит- ся компа- ниями <i>Yamasa Co., Takeda Co.</i>	+++
Аде- нилатде- аминаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	Превращение <i>AMP</i> в <i>IMP</i>	Содержится в такадиастазе	+
Реннин	<i>Mucor sp.</i>	Производство сыра	Производит- ся компанией <i>Meito Sangyo</i>	++
Нарин- гиназа	<i>Aspergillus niger</i>	Устранение горького привкуса сока цитрусовых	Производит- ся компанией <i>Rohm and Haas</i>	+
Лакказы	<i>Coriotus versicolor</i>	Высушивание лаков		
Целлю- лаза	<i>Tricho- derma koningi</i>	Улучшение пищеварения	pH _{опт} 4,6	+
	<i>Tricho- derma viride</i>	Гидролиз целлюлозы	Смесь ферментов	+

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Инвертаза	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Предотвращение кристаллизации сахарозы в кондитерском производстве; производство шоколада, высококачественной мелассы	–	+
Пектиназа	<i>Sclerotinia libertina</i>	Осветление и повышение выхода сока	Производится на <i>Sankyo</i> (скраза), <i>Rohm and Haas</i> (пектинол), <i>Takamine</i> , <i>Haas Delete Takamine</i>	+++
	<i>Coniothyrium diplodiella</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Разрушение пектина, концентрирование кофе	Производится компаниями <i>Takamine</i> (пектиназа–клараза), <i>I.G. Farben</i> (филтрагол)	

Одни ферменты катализируют гидролиз разных гликозидных связей, а другие могут расщеплять только единственный олигомер глюкозы. Название фермента еще не определяет его субстратную специфичность. Названия большинства ферментов связаны с катализируемыми ими реакциями, а не с их химической структурой [5].

Поскольку в этом случае не существует правила «один фермент – одна реакция», то катализирующие одну и ту же реакцию ферменты, выделенные из различных растительных или животных источников, не всегда имеют одну и ту же структуру, и кинетика соответствующих реакций также может быть различной. Отсюда следует, что максимальная скорость реакции v_{max} , константа Михаэлиса K_m , pH оптимума стабильности и активности и другие свойства фермента будут определяться его природой, то есть источником его выделения.

Многие гидролазы компартментализованы в тех или иных структурных элементах клетки, отделенных от цитоплазмы мембранами. Такая локализация гидролаз защищает важные биополимеры цитоплазмы от деструкции. Грамположительные бактерии выделяют в среду множество гидролаз. У грамотрицательных бактерий надежным хранилищем для различных гидролаз служит ограниченное двумя мембранами периплазматическое пространство наружной оболочки. В клетках эукариот гидролазы могут локализоваться в ограниченных мембраной органоидах – лизосомах, в периплазме (в микроорганизмах типа дрожжей) или выделяться в среду. Большинство используемых в промышленности гидролитических ферментов представляет собой внеклеточные продукты жизнедеятельности микроорганизмов.

Некоторые гидролазы также обнаружены и в цитоплазме, где они в метаболических циклах помогают клетке полностью использовать все внутренние ресурсы. Внутриклеточные гидролазы важны также в методах генетической инженерии.

Поскольку вода является универсальным субстратом с концентрацией равной приблизительно 55 М, а гидролитические ферменты обычно катализируют реакции деградации, например превращение крахмала в сахара, белков в полипептиды, липидов в глицерин, жирные кислоты и фосфат, то ниже будут рассматриваться различные типы полимерных субстратов. В некоторых методах синтеза полипептидов в средах с низким содержанием воды природные протеазы используются в качестве конденсирующих агентов. В специфических условиях протеазы могут иногда катализировать и обратную реакцию синтеза.

Для бродильных производств важное значение имеют такие соединения класса гидролаз, как α -глюкозидаза, β -фруктофуранозидаза, α -галактозидаза, амилазы, гемицеллюлазы, протеолитические ферменты, пектолитические ферменты, α -глюкозидаза (3.2.1.20, α -D-глюкозидглюкогидролаза) – фермент, катализирующий расщепление мальтозы с образованием глюкозы (старое название фермента – мальтаза). Он содержится в плесневых грибах, дрожжах, бактериях.

α -Галактозидаза (3.2.1.22, α -D-галактозидгалактогидролаза) расщепляет мелибиозу с образованием галактозы и глюкозы, разлагает также рафинозу на галактозу и сахарозу. Содержится в пивных дрожжах, ферментном препарате, получаемом из плесневого гриба *Aspergillus oryzae*.

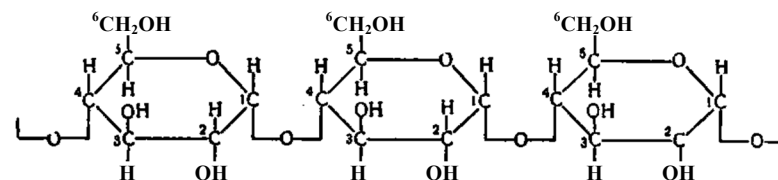
β -Фруктофуранозидаза (3.2.1.26, β -D-фруктофуранозидфруктогидролаза) расщепляет сахарозу на фруктозу и глюкозу, действует также на рафинозу, разлагая ее на фруктозу и мелибиозу (старое название фермента – сахараза, инвертаза). β -Фруктофуранозидаза содержится в дрожжах, плесневых грибах и высших растениях.

1.1.1 Гидролиз крахмалосодержащих материалов

Амилазы, находящие широкое применение, представляют собой ферменты, которые гидролизуют гликозидные связи в крахмале и родственных полимерах глюкозы.

Крахмал ($C_6H_{10}O_5$)_n является самым распространенным запасным углеводом растений (картофель, зерновые злаки и др.). В растениях крахмал накапливается в виде зерен различной формы и величины от 0,002 до 0,15 мм. Размер зерна крахмала определяют по длине его наибольшей оси. Крахмальное зерно состоит из концентрических слоев, представляющих собой радиально расположенные кристаллические мицеллы. Природный крахмал, содержащийся в растениях в неизменном виде, называют *нативным крахмалом*.

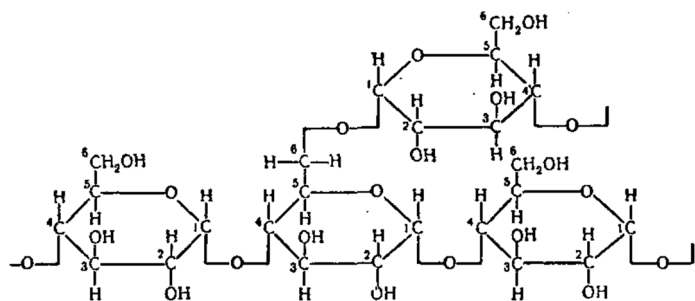
Крахмал представляет собой белый порошок; плотность безводного крахмала от 1,633 до 1,648, воздушно-сухого (10,0–20,0 % воды) от 1,5 до 1,6. С йодом дает характерное синее окрашивание. Эта реакция очень чувствительна и позволяет обнаруживать даже незначительные количества крахмала. Крахмал является типичным гидрофильным коллоидом. Состоит из двух полисахаридов: *амилозы* и *амилопектина*. Их соотношение в крахмале растений обычно составляет 1:4. Известны сорта кукурузы, в которой нет амилозы, а в некоторых бобовых растениях ее содержание в крахмале доходит до 75,0 %. Амилоза и амилопектин построены из остатков *D*-глюкозы.



Амилоза

Молекула *амилозы* – это длинная неразветвленная цепь с α-1,4-гликозидными связями между остатками *D*-глюкопиранозы. Молекулярная масса амилозы $3 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$.

Молекула *амилопектина* имеет разветвленное строение. Остатки *D*-глюкопиранозы в линейных участках амилопектина связаны, как и в амилозе, α-1,4-гликозидными связями, а в точках разветвления имеются α-1,6-гликозидные связи. Точки ветвления встречаются в среднем через 25 глюкозных остатков. Молекулярная масса амилопектина – до нескольких миллионов единиц.



Амилопектин

Кроме того, в нативном крахмале содержатся минеральные вещества (от 0,2 до 0,7 %) – преимущественно соли фосфорной кислоты, и высокомолекулярные жирные кислоты (до 0,6 %), представленные пальмитиновой, стеариновой и др.

Крахмал, амилоза и амилопектин нерастворимы в холодной воде, этиловом спирте и эфире. Амилоза легко растворима в теплой воде и образует растворы невысокой вязкости. Амилопектин растворяется в воде при нагревании под давлением и дает очень вязкие растворы. Растворы амилозы очень нестойкие, и при стоянии из них выделяются кристаллические осадки. Амилопектин дает чрезвычайно стойкие растворы. Амилоза дает с йодом синюю окраску, а амилопектин синефиолетовую.

В теплой воде крахмал набухает и превращается в гель. Степень набухания крахмала зависит от температуры. Так, кукурузный крахмал при температуре 55 °С почти не набухает, при 80 °С крахмальные зерна набухают и увеличиваются в размере в 25 и более раз, а при 120 °С структура крахмальных зерен кукурузы полностью нарушается.

При постепенном нагревании с водой крахмал превращается в вязкий коллоидный раствор, называемый *крахмальным клейстером*. Увеличение вязкости клейстера происходит за счет амилопектина, который сильно набухает, но не растворяется, а амилоза растворяется. Температура, при которой крахмальным клейстер приобретает наибольшую вязкость, называется *температурой клейстеризации*. Она неодинакова для крахмалов из разного сырья: для ячменного – от 60 до 80 °С, кукурузного – от 65 до 75 °С, пшеничного – от 54 до 62 °С, ржаного – от 50 до 55 °С, картофельного – от 59 до 64 °С.

Добавление нейтральных солей и щелочей снижает температуру клейстеризации. В присутствии сахара температура клейстеризации повышается. При нагревании до 110 °С клейстер начинает разжижаться, при 120–130 °С становится жидким.

При кипячении с кислотами крахмал превращается в глюкозу. Под действием фермента амилазы, содержащейся в проросшем зерне (*солоде*), крахмал расщепляется с образованием мальтозы в качестве конечного продукта; при гидролизе крахмала ферментом глюкоамилазой, содержащейся в плесневых грибах *Aspergillus awamori*, *Aspergillus batatae* и дрожжеподобных грибах *Endomycopsis bispora*, получается глюкоза.

В качестве промежуточных продуктов при гидролизе крахмала образуются полисахариды различной молекулярной массы, называемые *декстринами*. На первой стадии гидролиза образуются амилодекстрины, близкие по размерам и свойствам к крахмалу. При дальнейшем гидролизе молекулярная масса декстринов уменьшается, изменяется их окраска в реакции с йодом и растворимость в этиловом спирте (таблица 2).

Гидролиз крахмала амилотическими ферментами может быть представлен схемой:

Крахмал → *Растворимый крахмал* → *Декстрины (амило-, эритро-, хроо-, мальто-)* → *Мальтоза* → *Глюкоза*.

Под действием кислот и амилотических ферментов крахмал гидролизует до сахаров и поэтому процесс называют *осахариванием*.

Амилазы гидролизуют нативный крахмал, крахмальный клейстер и растворимый крахмал. Действие амилазы на целые или механически поврежденные крахмальные зерна незначительно, значительно быстрее амилазы действуют на крахмальный клейстер и растворимый крахмал.

Таблица 2 – Растворимость декстринов в этиловом спирте и их окраска в реакции с йодом

Группа декстринов	Окраска с йодом	Отношение к этиловому спирту
Амилодекстрины	Фиолетово-синяя	Растворяются в 25%-ном, осаждаются 40%-ным
Эритродекстрины	Красно-бурая	Растворяются в 55%-ном, осаждаются 65%-ным
Ахроодекстрины	Не окрашиваются	Растворяются в 70%-ном
Мальтодекстрины	Не окрашиваются	Растворяются в крепком спирте

Известно три типа амилаз: α -амилаза, β -амилаза и глюкоамилаза.

α -Амилаза (3.2.1.1, α -1,4-глюкан-4-глюкогидролаза) содержится в плесневых грибах, бактериях, в проросшем зерне ячменя, ржи, пшеницы. β -Амилаза (3.2.1.2, β -1,4-глюканмальтогидролаза) содержится в зерне ячменя, ржи, пшеницы. Глюкоамилаза (3.2.1.3, β -1,4-глюкан-глюкозидгидролаза) содержится в плесневых грибах.

α - И β -амилаза существенно отличаются устойчивостью к кислотности среды (рН) и к нагреванию. К повышению кислотности среды более чувствительна α -амилаза. Оптимальная зона рН для α -амилазы около 5,7, для β -амилазы – около 4,8. Доведение величины рН среды до 3,3 при температуре 0 °С ведет почти к полной инактивации α -амилазы; в этих же условиях β -амилаза практически сохраняет активность.

К действию тепла более устойчива α -амилаза. Оптимальная температура ее действия выше, чем β -амилазы. Оптимальная температура действия α -амилазы ячменя – от 51 до 60 °С, ржи – от 54 до 63 °С, β -амилазы ячменя – 48 °С, ржи – 51 °С. При нагревании раствора, содержащего α -амилазу, до 70 °С в течение 15 мин активность ее снижается незначительно; β -амилаза в этих условиях инактивируется полностью. Различные α -амилазы отличаются по устойчивости и нагреванию или, как говорят, по термолабильности. Самой лабильной, то есть быстрее всего разрушающейся при нагревании, является α -амилаза плесневых грибов, на втором месте зерновая α -амилаза (α -амилаза проросшего зерна – солода) и наиболее устойчива к нагреванию бактериальная α -амилаза.

α - И β -амилаза существенно различаются между собой по характеру действия на крахмал. При обработке α -амилазой вязкость растворов снижается за счет *неупорядоченного* разрыва любых α -1,4-гликозидных связей; по этой причине α -амилазу часто называют *разжижающим* крахмал ферментом. β -амилаза может атаковать α -1,4-связи только на невосстанавливающих концевых участках полимерной цепи, поэтому при гидролизе линейных полимеров этим ферментом всегда образуется мальтоза. По этой причине β -амилазу называют также *осахаривающим ферментом*. α - И β -амилазы разрывают только 1,4-связь, а 1,6-связь ими не затрагивается.

При действии на крахмал β -амилазы образуется преимущественно мальтоза и небольшое количество декстринов; α -амилаза расщепляет крахмал с образованием главным образом декстринов и небольшого количества мальтозы. При совместном действии α - и β -амилаз на крахмал примерно 80 % его превращаются в мальтозу и около 20 % – в декстрины. Если удалять образующуюся мальтозу (например, сбраживая ее дрожжами), то 92–95 % крахмала превращается в мальтозу. Оставшиеся неосахаренными декстрины называют *предельными декстринами* (*конечные декстрины*, *фосфодекстрины*). Эти декстрины расщепляются под действием фермента олиго-1,6-глюкозидазы (3.2.1.10, декстрин-6-гликаногидролаза, старое название – декстриназа). Этот фермент катализирует разрыв α -1,6-связей и превращает предельные декстрины в мальтозу.

Глюкоамилаза (*амилоглюкозидаза*) – осахаривающий фермент, гидролизует крахмал до глюкозы, атакует прежде всего невосстанавли-

вающие концевые α -1,4-связи крахмала, гликогена, декстринов и мальтозы; амилоглюкозидаза гидролизует также α -1,6-связи, но со значительно меньшей скоростью. Глюкоамилаза характеризуется высокой кислотоустойчивостью. Если целью процесса является получение глюкозы, а не мальтозы, то применяют смесь ферментов или последовательную обработку α -амилазой и глюкоамилазой; такие процессы применяются на спиртоводочных заводах (в отличие от пивоваренных предприятий), в производстве концентрированных растворов глюкозы (кукурузной патоки) и кристаллической глюкозы (таблица 3).

Амилаза из *Clostridium acetobutylicum* участвует в микробиологическом превращении полисахаридов в бутанол и ацетон.

Таблица 3 – Области наиболее широкого применения амилазных ферментов

Производство 1	Применение 2
Производство глюкозы и патоки	Крупномасштабное производство сахаров путем полного или частичного гидролиза крахмала амилоглюкозидазой или α -амилазой
Пивоварение	Превращение размолотых зерен крахмала в мальтозу – дисахарид, пригодный для дальнейшего дрожжевого брожения
Хлебопечение	Заквашивание теста: превращение части крахмала в дисахариды, образующие при последующем ферментативном распаде диоксид углерода
Производство фруктовых соков	Осветление путем гидролиза нерастворимых фракций крахмала
Бумажная промышленность	Снижение вязкости раствора крахмала под действием α -амилазы, предшествующее нанесению раствора на целлюлозную основу (бумага с регулируемой массой)
Текстильная промышленность	Шлихтование: α -амилаза снижает вязкость растворов крахмала, применяющихся затем для усиления волокон основы

Продолжение таблицы 3

1	2
	Расшлихтовка: обработка α - и β -амилазами удаляет шлихт из тканого материала; это обеспечивает равномерность последующего окрашивания и необходимую текстуру ткани
Кондитерская промышленность	Производство кондитерских изделий необходимой консистенции

Препараты амилазы, используемые человеком для пищевых целей, обычно получают из зерновых культур, в первую очередь из ячменя, пшеницы, ржи, овса, кукурузы, сорго и риса.

В амилазах зерна отношение осаживающей и разжижающей ферментативных активностей зависит не только от типа растения, но и от состояния зерен, в первую очередь от того, проросли они или нет. В производстве солода (размягченных проросших зерен ячменя), применяемого в пивоварении, непроросшие зерна ячменя хранят в условиях высокой влажности и соответствующей температуры, способствующих их быстрому прорастанию, причем одновременно в них возрастает содержание α -амилазы. Затем проросшие зерна высушивают в режиме, соответствующем типу солода; в сухом препарате амилазная активность не проявляется, но ферменты не подвергаются необратимой инактивации. Высушенный и измельченный солод с гидролитической активностью используют затем для превращения крахмала в сахара, которые впоследствии могут быть переработаны путем спиртового брожения дрожжами либо молочнокислого брожения бактериями.

Другие перечисленные в таблице 1 карбогидразы также расщепляют гликозидные связи. Сообщалось, например, что комбинированное применение *пуллуланы*, которая селективно расщепляет 1,6-гликозидные связи боковых цепей, и амилазы повышает выход глюкозы из крахмала. В производстве мороженого обычно используют *лактазу*, расщепляющую лактозу на более сладкие моносахариды глюкозу и галактозу. Родственный фермент *инвертаза* гидролизует сахарозу и полисахариды, содержащие β -D-фруктофуранозильные связи. Свое название этот фермент получил после того, как было установлено, что гидролиз сахарозы в растворах и образование глюкозо-фруктозного раствора сопровождается изменением направления вращения плоскости поляризации света. Частично или полностью гидролизованный раствор сахарозы обладает двумя ценными для кондитерской промышленности качествами – он несколько более сладок, чем

исходный раствор, и не кристаллизуется при упаривании до значительно более высоких концентраций.

1.1.2 Гидролиз целлюлозосодержащих материалов

Целлюлоза (клетчатка) ($C_6H_{10}O_5$)_n является составной частью клеточной стенки растений. В древесине содержится 40–50 % целлюлозы на сухое вещество. Каждая молекула целлюлозы представляет длинную неразветвленную цепь из глюкозных остатков, соединенных β -1,4-гликозидными связями. В воде целлюлоза нерастворима и только набухает в ней. При кипячении с минеральными кислотами (серной, соляной) целлюлоза превращается в глюкозу.

Гемицеллюлозы (полуклетчатки), как и целлюлоза, являются составными частями межклеточной стенки – мембраны растительных организмов. Они содержатся в значительном количестве в соломе, древесине, кукурузных початках, в отрубях. Заметные количества гемицеллюлоз содержатся в зернах злаков. Гемицеллюлозами называют совокупность полисахаридов клеточной стенки растений, которые можно экстрагировать водными растворами щелочей. В воде гемицеллюлозы нерастворимы. В состав гемицеллюлоз входят гексозаны и пентозаны. Гемицеллюлозы гидролизуются кислотами легче, чем целлюлоза; при гидролизе образуются пентозы (арабиноза или ксилоза) и гексозы (манноза, галактоза и др.). Важной составной частью гемицеллюлоз ячменя является β -глюкан, выделенный в чистом виде путем осаждения 20%-ным раствором сульфата аммония. Остатки глюкозы в β -глюкане связаны гликозидными связями β -1,3 и β -1,4.

Гемицеллюлазы (цитазы) – ферменты, катализирующие гидролиз гемицеллюлоз, образуются при проращивании зерна, а также плесневыми грибами, в частности грибом *Trichothecium roseum*.

Лигнин ($C_9H_{10}O_2$, $C_{10}H_{12}O_3$, $C_{11}H_{14}O_4$) – вещество, характеризующее одревеневшие стенки растительных клеток. Сложное полимерное соединение в клетках сосудистых растений и некоторых водорослей.

Ферментные препараты, используемые для деполимеризации целлюлозы и обычно называемые целлюлазой, представляют собой сложную смесь многих ферментов. Природа входящих в состав целлюлазы ферментов и их относительные количества зависят от типа микроорганизма, из которого была выделена целлюлаза и от процесса получения ферментного препарата. Вся биомасса и промышленные отходы различных производств различаются по ряду свойств, в том числе по степени кристалличности и удельной поверхности, а также по химическому составу. Некоторые методы предварительной обработки позволяют модифицировать эти субстраты и тем самым снизить их

устойчивость к гидролизу. Таким образом, скорость гидролиза целлюлозных материалов и выходы продуктов в каждом конкретном процессе зависят от совокупности нескольких факторов: во-первых, от природы и свойств субстрата, во-вторых, от результатов предварительной обработки и, в-третьих, от степени активности и специфичности индивидуальных ферментов, входящих в состав целлюлазы.

В настоящее время наиболее тщательно изучены и охарактеризованы целлюлазные системы, продуцируемые грибами *Trichoderma*. Как показано на рисунке 1, в состав этих систем входят три типа ферментов, действующих на различные субстраты и образующих различные продукты реакции.

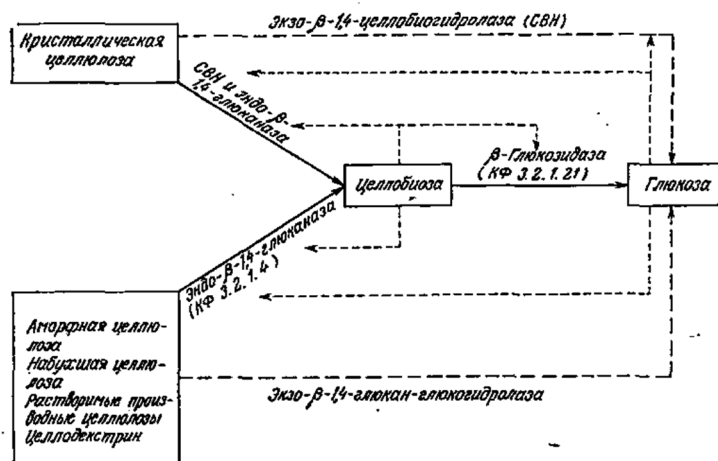


Рисунок 1 – Схема взаимодействия субстратов, целлюлаз и продуктов реакции в ходе биологической деградации целлюлозы

(→ основная реакция; - - - → побочная реакция;
 - - - - - → эффекты ингибирования)

На рисунке 1 также указаны пути ингибирования индивидуальных ферментов по принципу обратной связи. Кинетика каждой стадии системы реакций подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен со строго конкурентным или неконкурентным ингибированием. Целлюлазы с различными свойствами и активностями продуцируют и другие микроорганизмы, в том числе плесени *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Cellulomonas sp.*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*.

В таблице 4 приведены дополнительные сведения о целлюлазной системе из *Trichoderma viride*. Для определения специфических активностей применяются различные «стандартные» субстраты.

Немаловажны и размеры молекул ферментов, сравнимые с размерами микрофибрилл природной целлюлозы.

Таблица 4 – Свойства различных типов ферментов в целлюлазной системе *Trichoderma viride*

Свойства ферментов	Типы ферментов		
	Эндо- β -1,4-глюканаза	Экзо- β -1,4-целлобио-гидролаза	β -Глюкозидаза (целлобиоза)
Стандартный субстрат	Карбоксиметил-целлюлоза (КМЦ)	Авицель ^a	Целлобиоза
Ингибиторы	Целлобиоза	Глюкоза (Целлобиоза)	
Молекулярная масса	~ 12500–52000	~ 46000	~ 76000
Расчетный диаметр сферической молекулы, Å	34–64	62	76
^a – выпускаемая промышленностью кристаллическая целлюлоза, прошедшая стадию кислотной обработки.			

Скорость гидролиза зависит главным образом от степени кристалличности целлюлозы. Соответствующие выражения, описывающие кинетику гидролиза с учетом степени кристалличности, рассмотрим ниже, в примере 1.

Сначала рассмотрим основные химические и физические методы предварительной обработки лигноцеллюлозных материалов. Изучение методов химической обработки древесины дает представление о влиянии лигнина на устойчивость целлюлозных материалов к ферментативному гидролизу. В бумажной промышленности для растворения лигнинов и пектинов измельченную древесину подвергают сульфитной варке (обработке водным раствором гидросульфита, содержащим свободный SO₂) или сульфатной варке (обработке водным раствором NaOH и Na₂S) при повышенных температуре и давлении (крафт-процесс). Путем такой обработки четырех различных пород древесины в различных условиях были получены целлюлозные массы с различным содержанием лигнина, которые затем были обработаны серной кислотой для гидролиза веществ целлюлозной природы. Результаты этого эксперимента (рисунок 2) наглядно показывают, что способность

целлюлозы к гидролизу в первую очередь зависит от количества оставшегося лигнина. Для разрушения лигнина применяют и другие методы, в том числе обработку газообразным SO_2 , минеральными кислотами и специфическими ферментами, которые продуцируются рядом грибов, например *Sporotrichum pulverulentum* и *Pleuroitius ostreatus*.

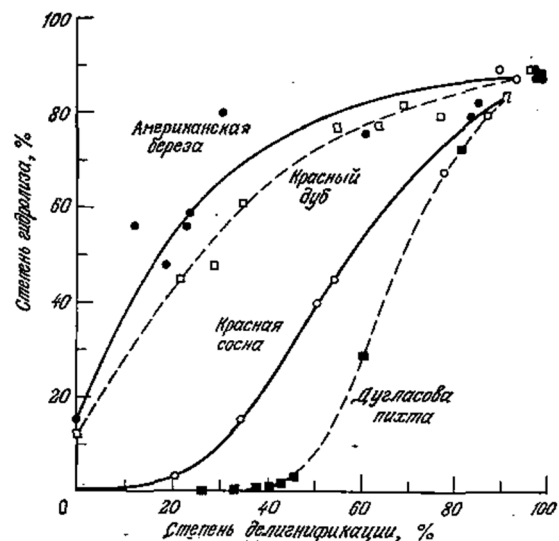


Рисунок 2 – Результаты экспериментального изучения влияния степени делигнификации на гидролизуемость целлюлозы из четырех различных пород древесины

Структуру целлюлозы, в том числе такие ее характеристики, как степень кристалличности, удельная поверхность, степень полимеризации, можно изменить с помощью предварительной обработки, например путем размала на шаровой или роликовой мельнице, γ -облучения, пиролиза, обработки кислотными или щелочными реагентами.

Рассмотрим кинетику изменения степени кристалличности целлюлозы при кислотной обработке древесины. Как показано на рисунке 3а, влияние предварительной обработки на кристалличность лучше всего контролировать методом рентгеноструктурного анализа, который позволяет определить параметр, называемый *индексом кристалличности (Crl)* и рассчитываемый по эмпирическим формулам

$$Crl (\%) = \left[1 - \frac{I(am)}{I(002)} \right] \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где $I(am)$ (am – аморфный) и $I(002)$ – интенсивности дифракции при 2θ равном $18,5^\circ$ и $22,5^\circ$ соответственно.

Значения Crl не являются точной мерой содержания кристаллической фракции; тем не менее индекс Crl удобен для оценки изменения степени кристалличности и средних размеров кристаллитов в различных целлюлозных материалах. Приведенные на рисунке 3а экспериментальные данные наглядно показывают, что при многократной обработке на роликовой мельнице степень кристалличности целлюлозы снижается.

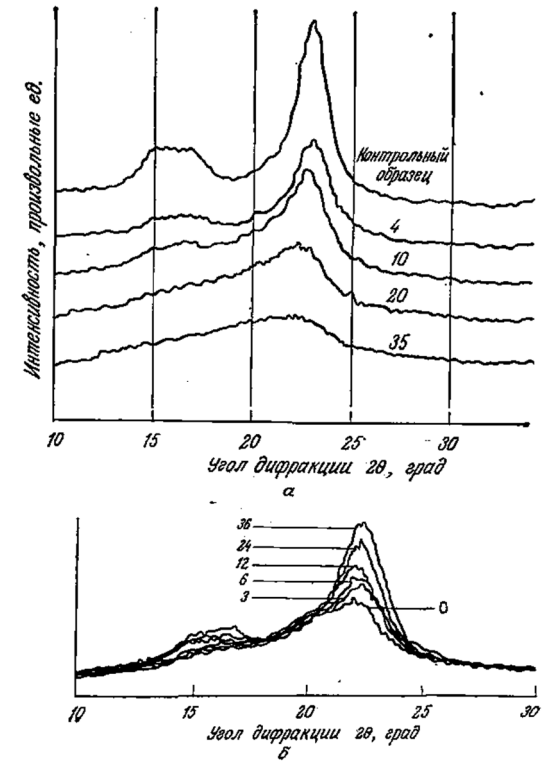


Рисунок 3 – Изменение характера дифракции рентгеновского излучения целлюлозой типа авицель после многократных пропусков через двухроликовую мельницу (на кривых указано число пропусков) (а); после обработки целлюлозой из *Trichoderma reesei* (на кривых указано время инкубирования в часах) (б).

Для расчета индекса кристалличности Crl использовались интенсивности при углах дифракции 2θ равных $18,5^\circ$ и $22,5^\circ$.

Ранее, при обсуждении структуры целлюлозы и активности целлюлазных ферментных систем, мы уже упоминали, что скорость гидролиза аморфных и паракристаллических участков, целлюлозы должна быть выше скорости гидролиза кристаллической целлюлозы. То есть снижение степени кристалличности целлюлозы должно сопровождаться повышением скорости ее ферментативного гидролиза. Действительно, такая зависимость была обнаружена, в частности, при изучении гидролиза тех же целлюлозных материалов, которые исследовались в эксперименте, изображенном на рисунке 3а, под действием суммарного препарата целлюлаз из *Trichoderma reesei* MCG-77 (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние числа пропусканй через роликовую мельницу на кристаллическую структуру целлюлозы типа авицель и средние кинетические параметры ее гидролиза под действием целлюлазы из *Trichoderma reesei*

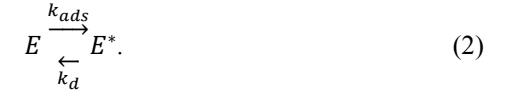
Число пропусканй	Crl , %	Размер кристаллитов, Å	v_{max}^{app} , мкг/(мл·мин)	K_m^{app} , мг/мл	v_{max}^{app}/K_m^{app} , ч ⁻¹
0	81	38	–	–	–
4	71	31	19,6	31,3	0,038
10	61	21	22,2	20,0	0,067
20	37	10	23,1	14,8	0,110
30	17	7	19,3	7,7	0,150

В таблице 5 приведены кажущиеся средние значения параметров в обычном уравнении Михаэлиса–Ментен; их определяли, допустив, что при измерении начальной скорости реакции целлюлозы в смеси отсутствовала. Расчеты изменения скорости ферментативного гидролиза целлюлозных материалов во времени осложняются тем, что в ходе таких процессов меняется также относительное содержание кристаллической и аморфной фракций субстрата (рисунок 3б).

В примере 1 рассмотрим принципы моделирования в применении к системам такого рода.

Пример 1. Влияние степени кристалличности целлюлозы на скорость ее ферментативного гидролиза

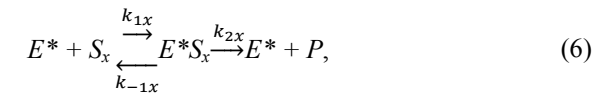
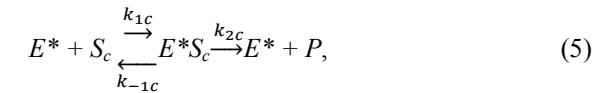
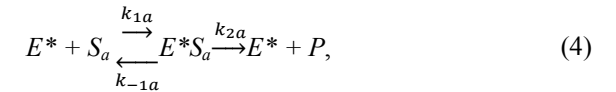
Для изучения гидролиза целлюлозы ферментными системами типа целлюлазы разработано несколько математических моделей кинетики этих процессов. В одной из них наибольшее внимание уделяется влиянию кристалличности; в этом подходе принимается, что ферменты целлюлазы (их сумма обозначается здесь символом E) адсорбируются на целлюлозе в состоянии E^*



Допуская, что адсорбция фермента носит равновесный характер и что концентрация фермента в растворе достаточно низка (на практике $e_0 < 0,5$ мг белка в 1 мл реакционной смеси), получим

$$e = K_D e^*. \quad (3)$$

Описание модели завершается еще двумя допущениями, согласно которым адсорбированный фермент катализирует гидролиз аморфной (S_a) и кристаллической (S_c) целлюлозы в соответствии со следующими уравнениями параллельно осуществляющихся реакций, адсорбированная и свободная целлюлазы связываются с инертным материалом целлюлозного субстрата, а также с продуктом реакции



Применив ко всем фермент-субстратным комплексам приближение квазистационарного состояния и суммируя концентрации всех форм фермента, получим следующее выражение для начальной скорости гидролиза чистой целлюлозы ($s_x = 0$) при низкой концентрации фермента и в отсутствие продукта реакции ($p = 0$)

$$v|_{t=0} = -\frac{ds}{dt}|_{s=s_0, p=0, s_x=0} = \frac{v_{max}^{app} s_0}{K_m^{app} + s_0}, \quad (8)$$

где s ($s = s_a + s_c$) – общая концентрация целлюлозы. Зависимость кажущихся максимальной скорости и константы Михаэлиса от начального индекса кристалличности Crl_0 [$Crl_0 = s_{c0}/(s_{a0} + s_{c0})$] и констант скоростей элементарных реакций можно выразить следующим образом

$$v_{max} \equiv \frac{v_{max,a}(1 - Crl_0) + v_{max,c}Crl_0 \left(\frac{K_a}{K_c}\right)}{1 - Crl_0 + Crl_0 \left(\frac{K_a}{K_c}\right)}, \quad (9)$$

$$K_m \equiv \frac{K_a}{1 - CrI_0 + CrI_0 \left(\frac{K_a}{K_c}\right)}, \quad (10)$$

где

$$v_{max,a} = k_{2a}e_0 \text{ и } v_{max,c} = k_{2c}e_0,$$

$$K_a = \frac{(1 + K_D)(k_{-1a} + k_{2a})}{K_D k_{1a}},$$

$$\frac{K_a}{K_c} = \frac{k_{1c}(k_{-1a} + k_{2a})}{k_{1a}(k_{-1c} + k_{2c})}. \quad (11)$$

Цифры указывают число предварительных пропусков субстрата через роликовую мельницу. Характер дифракции рентгеновского излучения субстратами представлен на рисунке 3а.

Выражения (9) и (10) свидетельствуют о зависимости начальной скорости реакции от начальной кристалличности субстрата CrI_0 , константа скорости реакции псевдопервого порядка v_{max}^{app}/K_m^{app} и величина $1/K_m^{app}$ линейно зависят от CrI_0 ; это дает возможность проверить соответствие описанной модели экспериментальным данным (рисунок 4).

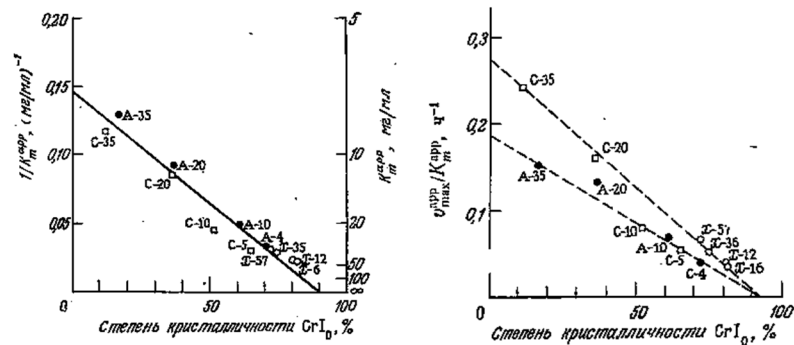


Рисунок 4 – Экспериментальное определение зависимости кажущихся кинетических параметров v_{max}^{app} и K_m^{app} от начальной степени кристалличности субстрата CrI_0 для авицеля (A, ●), хлопка (X, ○) и целлюлозы типа солка-флок (C, □)

Большинство данных хорошо согласуется с описанной моделью; наибольшее отклонение обнаружено в случае константы скорости реакции псевдопервого порядка для целлюлозы типа солка-флок.

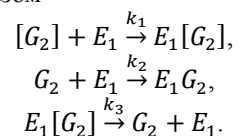
Из механизма процесса видно, что начальная скорость гидролиза должна зависеть от всех параметров, входящих в состав этого уравнения. Более того, соответствующее выражение для зависимости скорости реакции гидролиза целлюлозы в реакторе периодического действия от времени будет сложнее, поскольку в нем необходимо учитывать и ингибирование процесса продуктом реакции (7). При расчете изменения концентрации субстрата во времени следует учитывать и тот факт, что субстрат представляет собой смесь кристаллической и аморфной форм, гидролизующихся с различными скоростями. Следовательно, описывающее кинетику гидролиза выражение должно отражать два параллельных процесса с двумя различными субстратами, причем эти процессы взаимосвязаны, поскольку относительные количества аморфной и кристаллической целлюлозы также не постоянны во времени, о чем свидетельствует изменение индекса кристалличности.

Этот пример иллюстрирует только некоторые из тех многочисленных затруднений, которые встречаются при моделировании биологических субстратов и катализаторов. В примере рассматривали некоторый идеализированный субстрат целлюлозной природы. Такое допущение позволяет оценить влияние кристалличности на ход гидролиза, определить соответствующие кинетические параметры и рассчитать закономерность изменения кристалличности субстрата в реакторе периодического действия. Все приведенные экспериментальные данные были получены с использованием одного и того же целлюлозного ферментного комплекса, поэтому описанная модель вообще не учитывает влияние индивидуальных ферментов, входящих в состав комплекса, и их относительное содержание в комплексе. При сравнении с данными, полученными в ходе изучения целлюлаз из других источников, необходимо будет учесть относительное содержание различных ферментов в комплексе и их активности. В идеальном варианте в результате ряда экспериментальных исследований и разработки соответствующих математических моделей типа рассмотренной выше можно получить разностороннюю информацию о превращениях, происходящих в системе целлюлоза – целлюлаза, и на этой основе разработать некоторую общую модель, которая более полно отражала бы свойства субстратов и ферментов этой системы.

Существуют и другие физические и химические методы деградации целлюлозы. Так, в последние годы были разработаны усовершенствованные процессы кислотного гидролиза целлюлозы, отличающиеся применением более высоких температур и сокращенным временем обработки и позволяющие получать необходимые продукты деградации при минимальном количестве побочных веществ. Другой метод переработки целлюлозы базируется на ее пиролитической деградации. Изучаются, разрабатываются или уже применяются также методы

переработки лигноцеллюлозы, основанные на шнековой экструзии, обработке гетерогенными катализаторами, газификации в псевдоожженном слое и на самом старом способе переработки путем сжигания.

Задача 1. Кинетика гидролиза целлюлозы. Гидролиз целлюлозы протекает с участием солубилизирующего фермента, фермента, образующего дисахарид целлобиозу, и гидролизующей этот дисахарид β -глюкозидазы (см. рисунок 1). Первые два фермента ингибируются целлобиозой (будем считать, что целлобиоза представляет все олигомерные ингибиторы), поэтому упрощенная схема реакций будет выглядеть следующим образом



Здесь $[G_2]$ и G_2 – нерастворимая целлюлоза и растворимая целлобиоза соответственно, а E – фермент, катализирующий наиболее медленную стадию образования целлобиозы.

А. Можно допустить, что в отсутствие β -глюкозидазы глюкоза не образуется. Найдите соответствующие выражения, исчерпывающе описывающие зависимость g_2 от времени для случаев конкурентного и неконкурентного ингибирования.

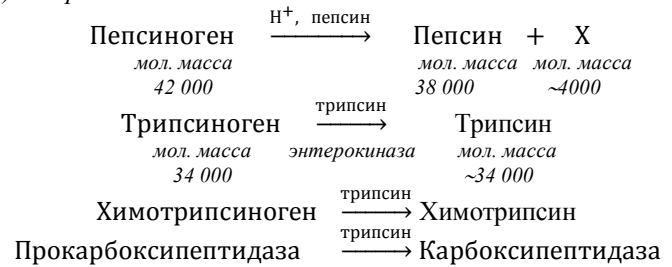
Б. Покажите, что по графику зависимости g_2/t от $(1/t)\ln(s_0/g_2)$ можно различить системы без ингибирования, с конкурентным ингибированием и неконкурентным ингибированием. Почему в этом случае лучше применять g_2 , а не концентрацию непрореагировавшего субстрата? Экспериментально показано, что описанная система ингибируется неконкурентно. Подтвердите это математически.

1.1.3 Гидролиз белковых веществ

Множество ферментов, селективно атакуют азотсодержащие соединения, особенно белки. Эти ферменты находят и разнообразные практические применения. Как и амилазы, протеазы разделяются на ферменты, гидролизующие концевые группы (экзопептидазы), и ферменты, расщепляющие внутренние пептидные связи (эндопептидазы).

Поскольку ферменты сами являются белками, протеолитические ферменты часто синтезируются сначала в неактивной форме. Неактивная форма фермента или хранится в клетке, или транспортируется от места ее синтеза к тому центру, где этот фермент необходим в активной форме; в частности, в клетке транспортируются неактивные формы пепсина, трипсина, химотрипсина и карбоксипептидазы. Активация этих протеолитических ферментов осуществляется по одному из двух путей (рисунок 5).

а) Из предшественников



б) В присутствии ионов металлов

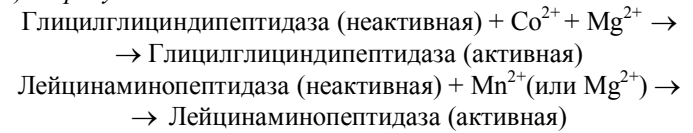


Рисунок 5 – Активация протеолитических ферментов:

а – образование активных ферментов из предшественников;

б – образование активных ферментов в присутствии ионов металлов

Активация пепсина и трипсина происходит *автокаталитически*: неактивный предшественник фермента является субстратом для активной формы, поэтому в результате реакции образуется большее количество активной формы фермента. Интересен и тот факт, что после превращения неактивного трипсина или пепсина в активную форму дальнейшее автокаталитическое расщепление фермента не наблюдается. Для активации второй группы ферментов экзопептидаз необходимы ионы одного или нескольких определенных металлов. Стандартный метод определения потребности ферментов и других компонентов клетки в ионах металлов заключается в изучении изменения активности раствора фермента в процессе диализа.

В промышленных масштабах протеазы выделяют из организмов животных (из поджелудочной железы), высших растений (из соков и латексов), а также из дрожжей, плесеней и бактерий. Некоторые из протеаз и области их применения перечислены в таблице 1.

Свободные протеазы применяются в производстве моющих средств, в химической чистке, при мягчении мяса, в сыроделии (только реннин), дублении кож, извлечении серебра из фотографических пленок и бумаг, производстве препаратов для пищеварения, а также в медицине при лечении воспалительных процессов и вирулентных ран. В качестве добавок к моющим средствам ферменты применялись начиная уже с 1913 г., однако особенно резкий рост потребления протеаз в производстве детергентов наблюдался в конце 60-х гг. XX века.

Ферменты, способствующие удалению загрязнений белковой природы, представляют собой смесь нейтральной и щелочной бактериальных протеаз, активных в интервале рН от 6,5 до 10,0 при температурах от 30 до 60 °С. Наибольшего уровня производство ферментов для этих целей достигло в 1969 г., когда с ферментными добавками выпускалось 30,0–75,0 % всех моющих средств в Западной Европе и 40,0 % в США. Затем, однако, Федеральная комиссия по торговле США высказала опасение, что такие детергенты оказывают вредное воздействие на здоровье человека, и в 1970–1971 гг. производство бактериальных протеолитических ферментов резко сократилось. Последовавшее позднее снятие предупреждения Федеральной комиссии и внедрение усовершенствованных методов производства, при которых образование ферментных аэрозолей сводится к минимуму (путем «парафинирования»), способствовали частичному восстановлению спроса на бактериальные протеазы для детергентов. В 1980 г. в США таких протеаз было произведено на сумму около 6 млн долларов.

Различные методы мягчения разделанных мясных туш с помощью специальных агентов основаны на протеолитической активности относительно недорогих и устойчивых к действию тепла растительных протеаз папаина и бромелаина. Процесс «созревания» целых туш проводят до их разделки и расфасовки путем контролируемого автолиза при температуре 15 °С с одновременным облучением ультрафиолетом, выполняющим роль гермицидного препарата и предотвращающим рост микроорганизмов на поверхности туш.

Сырые ферментные препараты поджелудочной железы различных животных содержат все пищеварительные протеазы, в том числе трипсин, а также липазы и амилазы. Эти смеси, обладающие мощной гидролитической активностью, используются для обезволашивания (удаления волос) шкур животных и одновременного гидролиза других неколлагеновых белков. Поскольку пепсин гидролизует и коллаген (фибрилярный белок, являющийся основой кожного покрова животных), его нельзя применять при выделке кож.

В молочной промышленности широко применяется только один фермент – реннин. Реннин отщепляет гликопептид от растворимого казеината кальция и таким образом превращает его в относительно малорастворимый параказеинат кальция, осаждающийся в виде творожного сгустка. Превращать казеинат кальция в параказеинат могут и другие протеазы, однако катализируемый ими протеолиз обычно на этом не останавливается, а поскольку продукты более глубокой деградации казеина обладают большей растворимостью, то творожный сгусток в этих условиях не образуется. Нехватка животного реннина стимулировала разработку методов получения аналогичных бактериальных ферментов, и последние уже применяются в сыроделии.

Для получения реннина с помощью микроорганизмов применяются также методы генетической инженерии.

Протеолитические ферменты применяются в медицине и клинической практике как пищеварительные средства, а также при лечении тяжелых ран. Поскольку ферменты представляют собой белки, то способствующие пищеварению ферменты применяют только в капсулах, предохраняющих ферменты от кислой среды желудка, которая неминуемо вызвала бы их денатурацию. Из ферментов, перечисленных в таблице 1, нет ни одного, который был бы выделен из организма человека. Введение протеаз животных человеку (трипсин свиньи, например, отличается от трипсина человека) применяется также для подавления воспалительных процессов в тканях; реакция иммунной системы человека минимальна в случае высокоочищенных кристаллических препаратов ферментов. В отличие от живых мертвые клетки обычно не способны защищать себя от действия протеаз. На этом различии основано применение растворов протеаз для лечения вирулентных или сочащихся ран; протеазы способствуют размягчению омертвевшей ткани и клеток, облегчая тем самым дренаж ран и ускоряя их заживление.

Протеолитические ферменты, особенно трипсин, подавляют воспалительные процессы и опухоли, связанные с внутренними повреждениями и инфекциями. Их действие основано на растворении тромбов и осадков внеклеточных белков, или на локальной активации других защитных систем организма, выполняющих те же функции, или на обоих этих факторах одновременно. Протеолитические ферменты тормозят развитие или полностью излечивают ряд тяжелых инфекционных заболеваний, приводящих к накоплению в легких слизи.

Задача 2. Автокатализ. Принять, что в периодическом процессе кинетика автокаталитической активации пепсина (см. рисунок 5) описывается уравнением Михаэлиса–Ментен [1].

А. Покажите, что максимальная скорость активации достигается при $s = \frac{K_s(s_0 + e_0 - s)}{K_s + s}$.

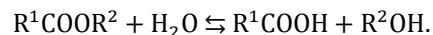
Б. Покажите, что ход реакции во времени описывается уравнением

$$-t = \frac{1}{k_3} \left[\frac{K}{s_0 + e_0} \ln \left(\frac{e_0}{s_0} \cdot \frac{s}{s_0 + e_0 - s} \right) - \ln \left(1 + \frac{s_0 - s}{e_0} \right) \right].$$

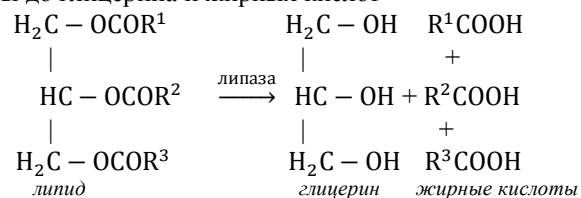
В. Для указанной автокаталитической системы начертите график зависимости $1/v$ от $1/s$ в координатах Лайнуивера–Бэрка. График какой другой зависимости был бы более удобным?

1.1.4 Применение эстераз

Ферменты этой группы расщепляют сложноэфирные связи с образованием спирта и кислоты или катализируют обратную реакцию



Наиболее важной подгруппой эстераз являются липазы, гидролизующие жиры до глицерина и жирных кислот



Панкреатическая липаза, выделяемая в пищеварительный тракт после нейтрализации желудочной кислотности, расщепляет непереваренные жиры до жирных кислот; при этом образуются и промежуточные продукты гидролиза – моно- и диглицериды. Нерастворимость высокомолекулярных жиров служит причиной того, что липазы проявляют каталитический эффект только на границе раздела фаз вода–липид.

Специфичность липаз, так же как и специфичность второй группы эстераз, называемых *алиэстеразами*, невысока. Липазы активны при гидролизе высокомолекулярных жиров и не действуют на жиры, построенные из карбоновых кислот с короткой углеводородной цепью. Последние, напротив, легко гидролизуются алиэстеразами, не активными по отношению к высокомолекулярным жирам. Активность липаз повышается в присутствии поверхностно-активных веществ (например, желчных кислот, которые стабилизируют высокую удельную поверхность жиров в эмульсиях) и ионов кальция, которые, очевидно, связывают образующиеся жирные кислоты путем осаждения или образования комплексов. Связывание жирных кислот выводит их из сферы реакции; в противном случае они действуют как ингибиторы.

В аэробных процессах очистки сточных вод, происходящих в природных условиях и применяющихся в методе активного ила, для поддержания необходимых форм жизни нужен постоянный приток достаточного количества кислорода. Поскольку транспорт кислорода через жировые пленки затруднен, то на установках приходится постоянно освобождать поверхность аэрируемых вод от таких пленок. Содержащую большое количество жиров собранную жидкость затем инкубируют с микроорганизмами, способными продуцировать внеклеточные липазы. Образование нефтяных или жировых пленок на больших площадях природных водоемов приводит к резкому снижению концентрации растворенного кислорода и таким образом к гибели всех организмов, не способных существовать в анаэробных условиях.

В мясной промышленности путем обработки отрубов липазными препаратами, вызывающими частичный гидролиз жиров, можно про-

изводить нежирные мясные продукты. В процессе переработки пищевых продуктов или бытовых и промышленных отходов водостоки иногда забиваются смесями нерастворимых веществ, содержащими белки, жиры и углеводы. Для предотвращения или ликвидации таких пробок успешно применяются смеси протеаз, различных карбогидраз и липаз.

Ко второй группе эстераз относят фосфатазы, которые являются неотъемлемыми элементами внутриклеточных биосинтетических путей метаболизма, в которых используется химическая свободная энергия, высвобождающаяся при окислении клеточного питания.

1.1.5 Ферментные смеси, пектиновые ферменты и другие пути использования ферментов

Вместо индивидуальных ферментов часто целесообразнее использовать их смеси. Компоненты смеси могут принадлежать к одному и тому же типу (α - и β -амилазы или трипсин и химотрипсин) или к разным классам ферментов (экстракты поджелудочной железы, представляющие собой смесь трипсина, липазы и амилазы). Так, использование специальных смесей различных амилаз позволяет повысить выход осаждаемого крахмала в производстве спирта, а смесь амилаз с меньшим содержанием β -амилазы, позволяющую понизить вязкость растворов крахмала без существенного осаживания, целесообразнее применять при расшлихтовке текстиля. Экстракты поджелудочной железы животных содержат смесь пищеварительных ферментов, выполняющих многие функции ферментного комплекса панкреатической жидкости человека. Например, препарат, выпускаемый в США в промышленном масштабе в качестве добавки к моющим средствам, содержит смесь бактериальных протеаз и амилаз; сообщалось, что этот препарат эффективнее протеаз при удалении некоторых типов загрязнений.

В ограниченных масштабах применяются и другие гидролитические ферменты; кроме того, разрабатываются новые перспективные процессы с использованием гидролаз (таблица 6).

Таблица 6 – Некоторые области применения гидролаз

Фермент	Процесс
1	2
Пенициллинацилаза	Получение исходного сырья для производства полусинтетических пенициллинов из пенициллина G
Лактаза	Гидролиз лактозы в молоке, сыворотке
Рибонуклеаза	Получение 5'-нуклеотидов из РНК
Декстраназа	Удаление зубных бляшек
Изоамилаза	Производство мальтозы из крахмала

Продолжение таблицы 6

1	2
Кератиназа	Обработка шерсти, щетины, кожи
Танназа	Деструкция дубильных кислот в продуктах

Окисление галактозы до галактуроновой кислоты с последующей поликонденсацией приводит к образованию полигалактуроновых кислот, которые являются основным структурным элементом ряда природных материалов растительного происхождения – *пектинов*. В пектинах карбоксильные группы часто этерифицированы до карбометоксильных. Фермент пектинметилэстераза (пектинэстераза, гидролизующая пектаза) (из фруктов) гидролизует карбометоксильные группы, а полигалактуроназы (пектиназы, пектолазы) (из грибов) расщепляют гликозидные связи в пектинах.

Пектолитические ферменты широко применяются в двух отраслях пищевой промышленности – в производстве соков и виноделии. После первичной переработки фруктов и овощей получают очень вязкие соки, что приемлемо для соков из томатов и цитрусовых, но нежелательно для яблочного и других соков. Путем контролируемого частичного гидролиза пектинов можно получить продукт с необходимой текучестью, достаточно вязкий, чтобы не происходило осаждения нерастворимых веществ. В производстве яблочного сока применяют более глубокий гидролиз пектинов, благодаря чему облегчается фильтрование, обеспечивающее необходимую прозрачность сока. Если соки будут использовать в производстве желеобразных продуктов, то их обрабатывают только пектинэстеразой. Образующиеся полигалактуроновые кислоты затем желатинизируют ионами кальция.

В виноделии добавление смеси пектолитических ферментов к раздавленному винограду приводит к повышению выхода сока, более эффективному экстрагированию красящих веществ из кожуры, а также ускоряет процессы фильтрования и отжима. Обработка пектиновыми ферментами уже перебродившего виноградного сока ускоряет процесс отделения вина от дрожжей и осадка, повышает его прозрачность и стабильность (в основном за счет снижения концентрации суспендированных белков в готовом вине). Как в первой, так и во второй области применения пектолитические ферменты создают необходимую вязкость и фильтруемость полупродуктов, что положительно сказывается на экономичности процессов и на внешнем виде готовой продукции.

Пектолитические ферменты применяют для обработки древесины хвойных пород. Свежесрубленная древесина, например, норвежской ели не поддается пропитке химическими консервантами. Предварительная обработка пектолитическими ферментами повышает проникаемость древесины и эффективность химической пропитки.

1.2 Области применения ферментативных реакций в растворах

Рассмотренные выше сферы применения гидролаз доминировали раньше и преобладают сейчас в биохимической технологии с использованием ферментов. В пищевой, фармацевтической и биохимической отраслях применяются также и другие ферментативные процессы.

1.2.1 Применение ферментов в медицине

В таблице 7 приведен краткий перечень самых распространенных и наиболее перспективных в медицине ферментов.

Таблица 7 – Ферменты, применяемые в медицине

Фермент	Область применения
1	2
Трипсин	Противовоспалительное средство; используется при обработке ран
Глюкозооксидаза	Определение глюкозы в крови и моче
Лизоцим (не гидролизующийся трипсином, химотрипсином и папаином)	Рекомендуется при лечении язв, кори, рассеянного склероза, кожных заболеваний и послеоперационных инфекций (антибактериальное средство)
Гиалуронидаза (из семенников быка)	Гидролизует полигиалуроновую кислоту (в организме человека она препятствует транспорту различных веществ); вводится с другими препаратами (антибиотиками, адреналином, гепарином, анестетиками в хирургии и стоматологии) для облегчения их диффузии
Пищеварительные ферменты (смеси амилаз, липаз, протеаз и целлюлаз)	Способствуют процессу пищеварения
Стрептокиназа	Противовоспалительное средство
Стрептодорназа	Противовоспалительное средство; гидролизует ДНК, снижает вязкость экссудатов из ран
Пенициллиназа	Разрушает аллергенные формы пенициллинов у чувствительных к ним больных

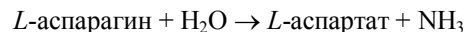
Продолжение таблицы 7

1	2
Урокиназа	Предотвращение и рассасывание тромбов в кровеносных сосудах
Активатор тканевого плазминогена	Растворение тромбов в кровеносных сосудах
Аспарагиназа	Противоопухолевое средство

В защитных жидкостях организма, например в слизи носовой полости и слезах, содержится фермент лизоцим, гидролизующий мукополисахариды клеточных стенок ряда (грамположительных) бактерий. Этот фермент применяется в качестве антибактериального средства и может выполнять также другие каталитические функции.

Начальные стадии ряда заболеваний, а также внутренние травмы сопровождаются понижением или повышением концентраций некоторых ферментов в таких легко поддающихся анализу жидкостях организма, как лимфа, кровь или моча. Наличие данного фермента легко установить с помощью соответствующего субстратного теста. Таким образом, определение ферментативной активности в жидкостях организма можно использовать в качестве средства диагностики. Данные об изменении концентрации тех или иных ферментов в сыворотке крови дают полезную информацию при диагностировании целого ряда заболеваний, связанных с нарушениями функций сердца, поджелудочной железы, патологическими изменениями в мышечных и костных тканях, а также с ростом злокачественных опухолей.

L-аспарагиназа катализирует гидролиз *L-аспарагина*



Для некоторых типов опухолевых клеток *L-аспарагин* является незаменимым питательным веществом; *L-аспарагиназа* разрушает аспарагин и тем самым может тормозить рост таких клеток.

E. coli продуцирует две различные аспарагиназы, из которых только одна проявляет антилимфотическую активность.

Проницаемость клеточных мембран и составляющих их структурных элементов для многих веществ сравнительно низка; в случае клеток высших животных это свойство мембран обусловлено наличием очень вязкой полигиалуроновой кислоты. Эффективность некоторых лекарственных препаратов и местных анестетиков, например в стоматологии, повышается при одновременном введении *гиалуронидазы*, частично разрушающей этот мембранный барьер.

Некоторые одноклеточные организмы продуцируют *пенициллиназу* (или β -лактамазу) и таким образом защищают себя от летальных доз пенициллиновых антибиотиков. Организм человека не вырабатывает пенициллиназу, поэтому аллергическую реакцию на введенный больному пенициллин можно снять путем инъекции раствора пенициллиназы, которая в идеальном варианте превращает этот антибиотик в вещество, не вызывающее аллергии.

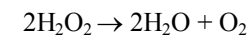
Глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы до глюконовой кислоты



Образующаяся при этом H_2O_2 обнаруживается с помощью индикатора, поэтому глюкозооксидазу можно использовать в качестве чувствительного реагента на глюкозу, определяемую в крови или моче.

1.2.2 Применение негидролитических ферментов в промышленности

Фермент глюкозооксидаза применяется при необходимости деструкции глюкозы или связывания кислорода. Так, сухой яичный порошок при хранении темнеет в результате взаимодействия глюкозы с белками. Добавление глюкозооксидазы предотвращает эту реакцию (*браунинг-реакцию*, или *реакцию Майяра*). Обескислороживание с помощью глюкозооксидазы применяется в производстве и при хранении безалкогольных напитков на основе апельсинового сока, консервированных напитков, порошкообразных сухих пищевых продуктов, майонеза, соусов для салатов и расфасованного сыра, когда в присутствии кислорода образуются продукты окисления, имеющие неприятный запах; для связывания кислорода в упаковку с сыром добавляют не только глюкозооксидазу, но и глюкозу. Ферментные добавки длительно связывают кислород, проникающий через упаковочные материалы, и способствуют увеличению срока годности расфасованных пищевых продуктов, так как при температуре их хранения ферментативная активность сохраняется достаточно долго. Образующийся в процессе катализируемой глюкозооксидазой реакции пероксид водорода обладает бактерицидными свойствами. Если же его наличие по каким-либо причинам нежелательно, то в систему добавляют еще *каталазу*, которая катализирует реакцию



В присутствии каталазы эта реакция протекает очень быстро ($v_{max}/e_0 = 1,2 \cdot 10^7 (\text{с} \cdot \text{М})^{-1}$, $K_m = 10^7 \text{ М}$). Она используется также в некоторых средствах для крашения волос.

В таблице 8 перечислены некоторые другие области применения негидролитических ферментов.

Таблица 8 – Перспективные области применения негидролитических ферментов

Производство	Субстрат
<i>L</i> -яблочной кислоты с помощью фумаразы	Из фумаровой кислоты
<i>L</i> -аспарагиновой кислоты с помощью аспартазы	Из фумаровой кислоты
АТФ с помощью микробных ферментов	Из аденина
NAD с помощью микробных ферментов	Из аденина и никотинамида
Фруктозы с помощью глюкозоизомеразы	Из глюкозы
Фруктозы с помощью сорбитдегидрогеназы	Из сорбита
Разделение <i>DL</i> -аминокислот с помощью иммобилизованной аминоксилазы	Из рацемата
<i>L</i> -тирозина с помощью тирозин-фенол-лиазы	Из <i>L</i> -дигидроксифенилаланина
<i>L</i> -дигидроксифенилаланина с помощью трансминазы	Из α -кетокислоты
<i>L</i> -триптофана с помощью группы ферментов	Из индола, пировиноградной кислоты и аммиака
<i>L</i> -лизина с помощью группы ферментов	Из α -амино- ϵ -капролактама
Полиненасыщенные жирные кислоты с помощью десатуразы жирных кислот	Из насыщенных жирных кислот
Галактонолактозы с помощью глюкозооксидазы и галактозооксидазы	Из сыворотки

Одним из перспективных ферментов, в частности, является глюкозоизомераза, превращающая глюкозу во фруктозу. Ряд приведенных в таблице 8 процессов осуществляются с помощью иммобилизованных ферментов.

1.3 Технологические процессы с участием иммобилизованных ферментов

Под *иммобилизацией* понимают способы трансформации ферментов путем закрепления на нерастворимых носителях, обеспечивающие возможность их использования в непрерывных процессах. Необходимость в иммобилизации может возникнуть по целому ряду причин. Во-первых, иммобилизованные индивидуальные ферменты удерживаются в реакторе, в то время как растворимые ферменты обычно переходят в смесь, содержащую продукт реакции. В результате ценные ферменты необратимо теряются, и в реактор приходится вводить дополнительные количества биологического катализатора; к тому же фермент может оказаться нежелательной примесью и его придется отделять от конечного продукта реакции. Во-вторых, по сравнению с растворимыми биологическими катализаторами иммобилизованные ферменты часто сохраняют активность в течение более длительного периода. В-третьих, иммобилизованные ферменты можно локализовать в соответствии с последовательностью осуществляемых ими каталитических превращений, что будет способствовать повышению эффективности многостадийного процесса.

Указанные характеристики иммобилизованных ферментов свидетельствуют о том, что их применение целесообразно в случае переработки больших количеств субстрата и (или) в случае высокой стоимости фермента. Кроме того, возможность сконцентрировать фермент в определенном объеме и придать ему любую форму позволяет найти новые уникальные сферы применения иммобилизованных биологических катализаторов. Следующий раздел будет посвящен изучению методов иммобилизации ферментов, а затем мы рассмотрим пути применения иммобилизованных ферментов и перспективы их дальнейшего промышленного использования.

1.3.1 Методы иммобилизации ферментов

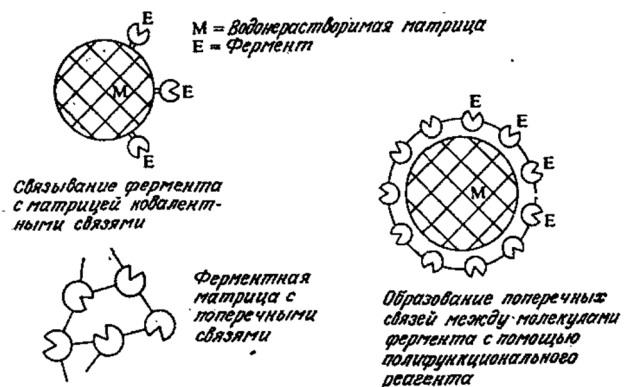
Существует много методов иммобилизации ферментов. От метода иммобилизации зависят свойства полученного биокатализатора.

Таким образом, выбор конкретного способа иммобилизации зависит от целого ряда факторов и параметров каталитического процесса, в том числе от общей каталитической активности, эффективности использования катализатора, его способности подвергаться инактивации и регенерации и, конечно, от его цены. В связи с проблемой захоронения отходов производства, а также в зависимости от предполагаемой области использования получаемых продуктов следует принимать во

внимание и токсичность реагентов, применяемых в реакциях синтеза иммобилизованных ферментов.

Все методы иммобилизации ферментов можно разделить на две группы: химические методы, основанные на создании ковалентных связей между ферментом и носителем, и физические методы, основанные на более слабых взаимодействиях или на включении ферментов в какую-либо оболочку или матрицу (рисунок 6).

а) Химические методы



б) Физические методы

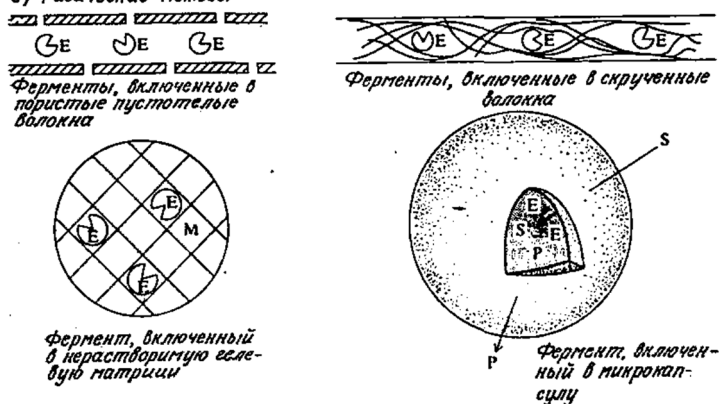


Рисунок 6 – Некоторые методы иммобилизации ферментов: химические (а); физические (б)

Ферменты можно превратить в иммобилизованную форму посредством адсорбции на различных носителях (таблица 9); целесообразность применения этого метода иммобилизации обусловлена тем,

что в ряде случаев катализатор удастся сравнительно просто регенерировать путем десорбции отработанного фермента и адсорбции новой порции активного биокатализатора.

Таблица 9 – Носители для адсорбции ферментов

Взаимодействие	Адсорбенты
Физическая адсорбция	Активированный уголь, силикагель, оксид алюминия, крахмал, глина, стекло
	Модифицированные носители: таннинаминогексилцеллюлоза, конканавалин А – сефароза
Ионное связывание	Катионообменники: карбоксиметилцеллюлоза, амберлит CG-50, дауэкс 50
	Анионообменники: диэтиламиноэтилцеллюлоза, диэтиламиноэтилсефадекс, полиаминополистирол, амберлит IR-45

Свойства иммобилизованного фермента определяются как свойствами фермента, так и характеристиками носителя или матрицы и методикой иммобилизации.

Выбор носителя для химической или адсорбционной иммобилизации фермента зависит, прежде всего, от свойств его поверхности. Способен ли фермент адсорбироваться на этой поверхности? Есть ли у носителя функциональные группы, связывающие фермент? Если поверхность носителя не удовлетворительна в этом отношении, то можно ли химически модифицировать или иным образом трансформировать поверхность носителя, чтобы облегчить связывание фермента? В таблице 10 перечислены некоторые носители, используемые для иммобилизации ферментов путем создания ковалентных связей, и приведены функциональные группы, участвующие в этих связях. В качестве носителей иммобилизованных ферментов применяются также керамические материалы, стекло и оксиды ряда металлов.

Таблица 10 – Носители для ковалентного связывания ферментов

Природные	Синтетические
Целлюлоза (-ОН)	Полиакриламиды и их производные (биогель, энзакрил) (ароматические аминогруппы)
Карбоксиметилцеллюлоза (-COOH)	Полиаминополистирол (-NH ₂)
Агароза (сефароза) (-ОН)	Сополимеры малеинового ангидрида
Декстран (сефадекс) (-ОН)	

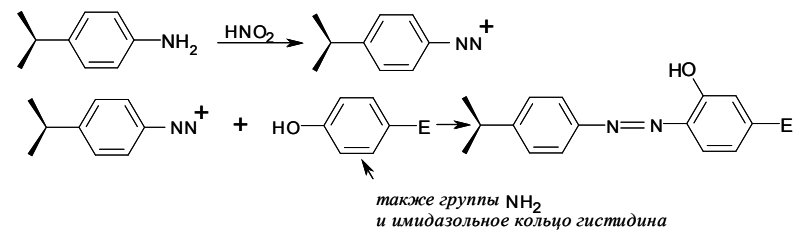
Описание методики ковалентной иммобилизации фермента часто начинается со стадии модификации или активации поверхности носителя. В случае неорганических носителей для этой цели широко применяется силанизация, то есть обработка поверхности кремнийорганическими реагентами (например, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{R}$, где R – чаще всего NH_2). Обработанный таким способом носитель содержит на поверхности аминогруппы, которые (как и аминогруппы других носителей) можно перевести в альдегидные группы конденсацией с глутаровым альдегидом, или в ариламиновые группы с помощью *n*-нитробензоилхлорида, или в карбоксильные группы конденсацией с янтарным ангидридом. Другой способ модификации поверхности носителей основан на введении гибких, сравнительно длинных цепей (например, остатка *n*-пропиламина). Ввиду отсутствия пространственных препятствий последующее присоединение фермента к этим гибким группировкам позволяет в основном сохранить нативную структуру фермента, что в свою очередь способствует сохранению и стабилизации его каталитической активности. С помощью подобных модификаций можно также изменять гидрофобность или гидрофильность поверхности носителя.

На рисунке 7 суммированы типичные реакции иммобилизации ферментов с участием функциональных групп на поверхности носителей, в том числе перечисленных в таблице 9.

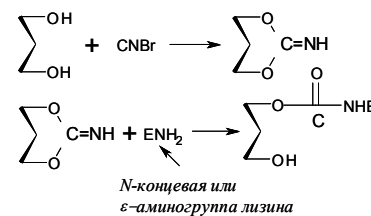
Каждая из указанных реакций протекает только в строго определенных условиях, в частности при заданных величинах pH, ионной силы и концентраций реагентов. Химическая природа функциональных групп на поверхности носителя определяет и функциональные группировки белка, с участием которых он образует ковалентные связи.

Из-за большого числа методов поверхностной модификации носителей иммобилизацию определенного фермента на конкретном носителе можно осуществить несколькими способами. Конденсация фермента с носителем не должна затрагивать аминокислотные остатки, входящие в активный центр фермента или расположенные вблизи него. Решая вопрос о выборе носителя и способе модификации его свойств, учитывают взаимодействие между поверхностью носителя и реакционной смесью, из-за которого непосредственно примыкающие к носителю и к ферменту слои реакционной смеси могут существенно отличаться по своим свойствам от основного объема реакционной смеси. Вокруг частиц носителя с ионизированными группами образуется зона с повышенной концентрацией противоположно заряженных ионов, что приводит к существенному изменению зависимости наблюдаемой каталитической активности от pH жидкой фазы в сравнении с аналогичной зависимостью для ферментативной реакции в растворе (рисунок 8).

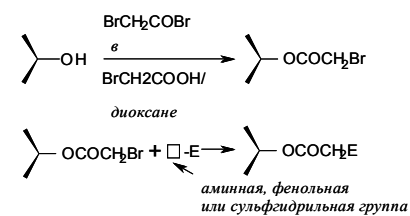
1) Диазо-метод



2) Активация бромцианом



3) Метод алкилирования



4) Карбодимидный метод

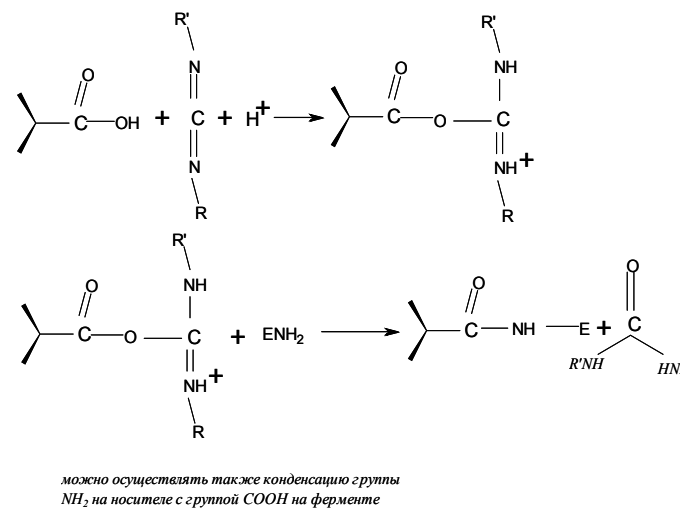


Рисунок 7 – Методы ковалентного связывания ферментов после модификации поверхности носителя

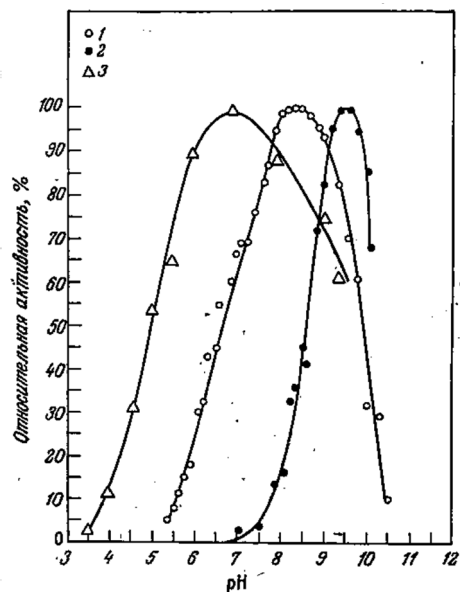


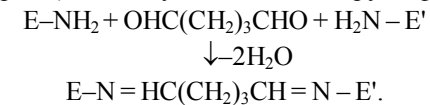
Рисунок 8 – Различные зависимости каталитической активности от pH свободного фермента и фермента, иммобилизованного на ионизированном носителе: субстрат – этиловый эфир ацетил-*L*-тирозина; 1 – химотрипсин (свободный); 2 – *EMA*-химотрипсин (иммобилизованный на отрицательно заряженном носителе – сополимере этилена с метакриловой кислотой); 3 – полиорнитилхимотрипсин (иммобилизованный на положительно заряженном носителе)

Аналогично гидрофобные или гидрофильные свойства носителя влияют на локальные концентрации растворенных веществ и растворителей в соответствии с их гидрофобностью (или гидрофильностью).

Другая важная функция поверхности носителя связана с ее прямым или косвенным влиянием на молекулярное окружение фермента. В какой-то степени фермент всегда взаимодействует с поверхностью носителя на молекулярном уровне и в то же время контактирует с реакционной средой, на которую так же, как только что было показано, влияет носитель. Молекула фермента построена таким образом, что она принимает определенную конформацию и проявляет соответствующую активность только в свойственной ей природной среде. Путем подбора носителя для иммобилизации фермента можно как сохранить

свойственное данному ферменту окружение, так и направленно изменить его с тем, чтобы повлиять на активность, а также на селективность и стабильность фермента. Большое внимание уделяется изучению взаимодействий ферментов с их окружением на молекулярном уровне и выяснению возможности использования таких взаимодействий для углубления наших знаний о поведении ферментов в природных условиях и для оптимизации биокаталитических процессов.

На активность и другие параметры иммобилизованного фермента оказывают влияние также физические и механические свойства носителя. Пористость носителя и распределение пор по размерам определяют количество фермента, которое может быть иммобилизовано на этом носителе, и доступность субстрата для молекул фермента, связанных с внутренними поверхностями. Механическая прочность носителя в существенной степени влияет на возможность его использования в реакторах определенных конструкций. Например, в реакторе с перемешиваемой взвесью твердого катализатора нецелесообразно использовать носители, склонные к механическому истиранию, а легко сжимаемые материалы нельзя применять в насадочных колоннах крупномасштабных производств. Важна и способность носителя к набуханию. Для создания ковалентных связей между молекулами ферментов можно использовать некоторые реагенты, содержащие две (или более) функциональные группы. Из таких реагентов чаще всего применяют глутаровый альдегид, образующий межмолекулярные (и, возможно, внутримолекулярные) связи с участием аминогрупп фермента



В качестве бифункциональных реагентов используют бисдиазобензидин, цианурхлорид и гексаметилендиизоцианат.

Сшитые поперечными связями ферменты обычно представляют собой желатинообразную массу, механические свойства которой не отвечают требованиям большинства процессов. Как показано на рисунке 9, адсорбция фермента на носителе и последующая его сшивка бифункциональными реагентами улучшает механические свойства катализатора и облегчает доступ субстрата к ферменту.

Метод иммобилизации фермента путем его включения выгодно отличается относительной независимостью от природы фермента и возможностью применения одной методики для иммобилизации различных ферментов, а также сравнительно небольшими нарушениями нативной структуры фермента. Методы включения можно разделить на

две группы: к первой группе относят методы, основанные на включении фермента в полимерную матрицу, а ко второй – методы, в которых раствор фермента отделяют мембраной, проницаемой для субстратов и (или) продуктов реакции, но непроницаемой для фермента.

Чаще всего фермент иммобилизуют в трехмерной полимерной решетке полиакриламидного геля путем полимеризации акриламида в присутствии сшивающих мономеров и фермента (Е) (см. рисунок 9). Как указано на рисунке, инициатором полимеризации может быть персульфат калия ($K_2S_2O_8$), а ее ускорителем – β -диметиламинопропионитрил (DMAPN). С помощью этих реагентов можно получать гели иммобилизованных ферментов с диаметром пор от 100 до 400 нм, которые удерживают ферменты, имеющие диаметр молекул от 300 до 2000 нм.

В альтернативном способе иммобилизации раствор фермента отделяют мембраной таким образом, чтобы фермент постоянно находился в объеме, ограниченном этой полупроницаемой мембраной. Биологическим прототипом этого метода иммобилизации являются лизосомы, в которых сконцентрированы гидролитические ферменты, вызывающие при попадании в цитоплазму мгновенную гибель клетки. В одном из вариантов этого способа, называемом *микрокапсулированием*, ферменты заключают в крохотные капсулы диаметром до 300 мкм. Капсулы заключены в сферические мембраны с порами, через которые в любом направлении могут транспортироваться небольшие молекулы субстратов и продуктов реакции и в то же время не могут проникать ферменты и другие высокомолекулярные соединения.

Известны два метода изготовления полупроницаемых микрокапсул. В первом методе формируют постоянную полимерную мембрану. Для этой цели на границе раздела двух фаз – органической и водной, содержащей фермент, проводят реакцию сополимеризации. Если в качестве одного из реагентов взять водонерастворимый мономер, а в качестве другого – мономер, обладающий заметной растворимостью в той и другой фазах, то их сополимеризация будет осуществляться только вблизи границы раздела фаз.

Устойчивые полимерные микрокапсулы можно получить также путем коацервации, то есть выделения из раствора полимера микрокапель новой жидкой фазы, обогащенной полимером. Неустойчивые микрокапсулы получают эмульгированием водного раствора фермента в присутствии ПАВ; при этом образуются капсулы, заключенные в мембрану из ПАВ, которые добавляют к водному раствору субстрата.

Оба метода микрокапсулирования выгодно отличаются высокой удельной поверхностью катализатора и повышением специфичности.

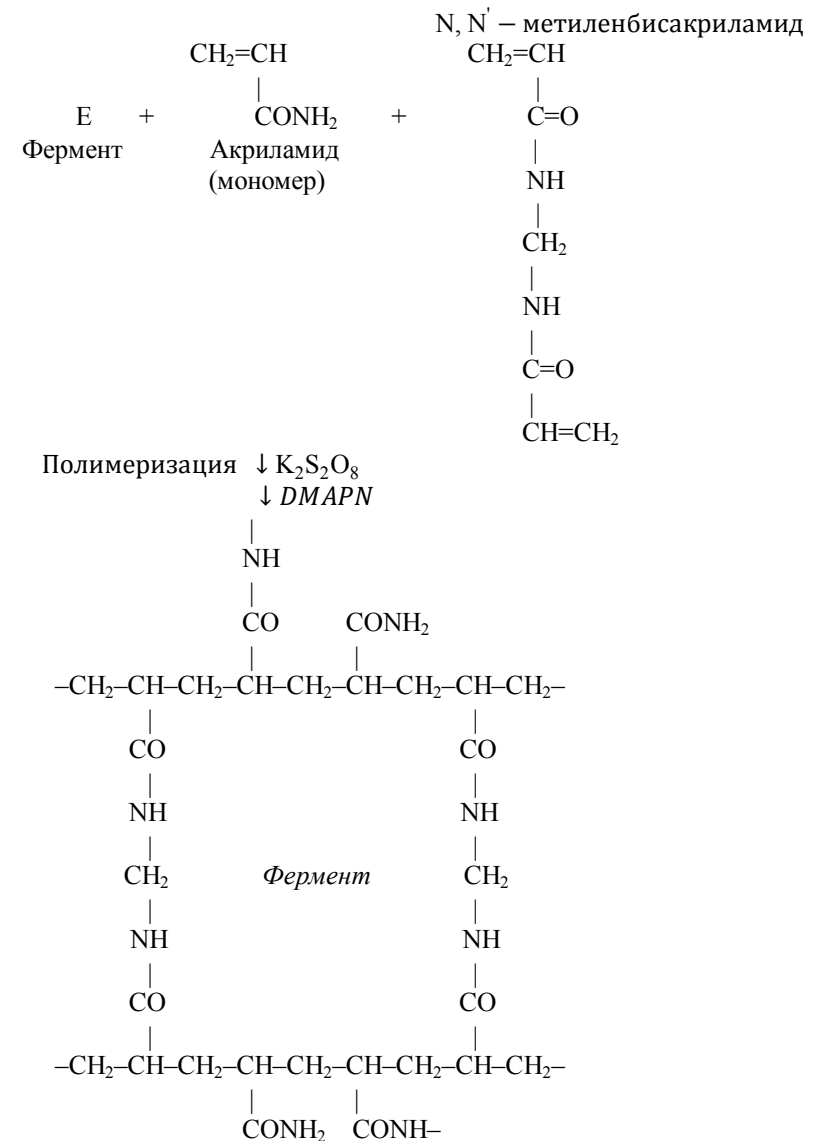


Рисунок 9 – Метод иммобилизации фермента путем его включения в полимер. Полимерная матрица представляет собой полиакриламид, сшитый поперечными связями

Характерная величина составляет 2500 см² на 1 мл суспензии фермента. Изготавливают также мембраны, селективно пропускающие одни субстраты и задерживающие другие. Эти методы применимы к любым ферментам. В то же время мембрана представляет собой препятствие для массопередачи, поэтому «коэффициент эффективности» заключенных в микрокапсулу ферментов может быть очень низким. Кроме того, эти методы вообще неприменимы, если размеры молекулы субстрата сравнимы с размерами молекулы фермента.

Для иммобилизации ферментов можно использовать и устройства, основанные на ультрафильтрации через полупроницаемые мембраны, которые не мешают обмену молекулами небольшого диаметра между раствором фермента и соседним раствором. На рисунке 10 изображена принципиальная схема непрерывной ультрафильтрации.

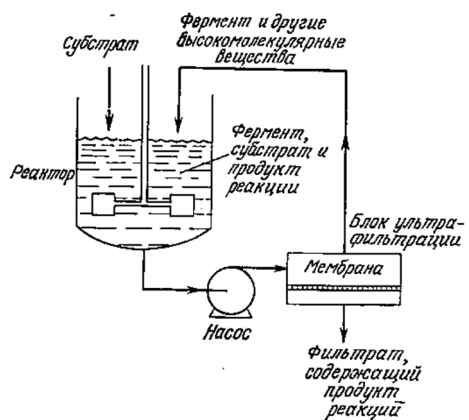


Рисунок 10 – Локализация фермента в масштабе всего реактора.

Полупроницаемая мембрана удерживает фермент и другие высокомолекулярные соединения в реакторе

В то же время, в отличие от метода микрокапсулирования, в этом случае площадь поверхности, разделяющей два раствора, невелика, и к тому же здесь возникает опасность индуцированной потоком денатурации фермента. Скорость массообмена через мембрану довольно низка, что может лимитировать скорость всего процесса. К преимуществам метода иммобилизации ферментов с помощью полупроницаемых мембран можно отнести возможность применения практически любого фермента и смесей любых ферментов, а также высокомолекулярных или нерастворимых субстратов (по отношению к которым

связанные с полимерными носителями ферменты обычно малоэффективны). В реакциях гидролиза полимеров через полупроницаемые мембраны проникают только низкомолекулярные соединения, а все вещества с относительно большой молекулярной массой остаются в растворе фермента. На этом принципе основан метод регулирования молекулярно-массового распределения продуктов реакции на выходе из реактора.

Изучен целый ряд вариантов принципиальной схемы, изображенной на рисунке 10. Так, вместо реактора с перемешиванием можно использовать трубчатый реактор. Блок с одной полупроницаемой мембраной можно заменить на устройство с множеством параллельных пустотелых нитей, в котором один поток направляется во внутреннюю полость нитей, а другой – в омывающий нити объем.

Важнейшие характеристики различных методов иммобилизации ферментов суммированы в таблице 11.

Таблица 11 – Сравнение основных характеристик различных методов иммобилизации ферментов

Характеристики	Метод связывания с носителем				
	Физическая адсорбция	Ионное связывание	Ковалентное связывание	Сшивка бифункциональными реагентами	Методы включения
Методика иммобилизации	Простая	Простая	Сложная	Сложная	Сложная
Ферментативная активность	Низкая	Высокая	Высокая	Умеренная	Высокая
Субстратная специфичность	Не изменяется	Не изменяется	Может изменяться	Может изменяться	Не изменяется
Связывающие силы	Слабые	Умеренные	Сильные	Сильные	Сильные
Регенерация	Возможна	Возможна	Невозможна	Невозможна	Невозможна
Область применения	Узкая	Умеренная	Умеренная	Узкая	Широкая
Стоимость	Низкая	Низкая	Высокая	Умеренная	Низкая

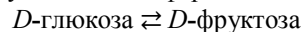
Здесь под «ферментативной активностью» понимается собственная каталитическая активность иммобилизованных ферментов по отношению к активности тех же ферментов в растворе. В общем случае методы химической иммобилизации снижают активность ферментов, поскольку создающиеся в процессе иммобилизации ковалентные связи могут в какой-то мере нарушать третичную структуру, свойственную нативным белкам. С другой стороны, ковалентные связи обеспечивают надежное, прочное связывание фермента, а иногда снижают скорость его инактивации и изменяют специфичность в нужном направлении. Иммобилизация ферментов путем их включения или адсорбции обычно в меньшей степени сопровождается нарушением их структуры, и поэтому свойства иммобилизованных такими методами ферментов мало отличаются от их свойств в растворах. На практике в силу эффектов массопередачи соответствующие параметры иммобилизованного фермента могут иметь совсем другие значения.

Диффузионные эффекты сильнее проявляются в случае сшитых поперечными связями и включенных ферментных катализаторов и в меньшей степени – у ферментов, иммобилизованных на носителях.

1.3.2 Промышленные процессы на иммобилизованных ферментах

Катализаторы на основе иммобилизованных ферментов уже используются в той или иной мере в ряде крупномасштабных промышленных производств. К важным областям применения иммобилизованных ферментов относятся производство сиропа с высоким содержанием фруктозы из кукурузного крахмала и производство *L*-аминокислот путем разделения рацемических смесей (состоящих из *L*- и *D*-изомеров). В производстве полусинтетических пенициллинов применяют иммобилизованную пенициллинацилазу.

Сахар (сахарозу) нельзя заменить *D*-глюкозой, поскольку глюкоза менее сладка. К тому же кристаллизация концентрированных растворов глюкозы может затруднить их последующую переработку и хранение. Эти проблемы могут быть устранены, если глюкозу частично изомеризовать во фруктозу с помощью фермента глюкозоизомеразы



При 50 °С константа равновесия этой реакции близка к единице, и изменение температуры практически не влияет на нее, поскольку теплота реакции изомеризации составляет всего лишь приблизительно 1 ккал/моль. Поэтому продуктом реакции является смесь глюкозы и фруктозы в отношении приблизительно 1:1. Такая смесь значительно более сладка, чем чистая глюкоза, и может заменять сахар в различных

областях, в том числе в производстве безалкогольных напитков, приготовлении различных пищевых продуктов и в хлебопекарной промышленности. Еще более сладкие смеси можно получать путем хроматографического разделения продуктов изомеризации, приводящего к обогащению смеси фруктозой.

Глюкозоизомераза представляет собой внутриклеточный фермент, продуцируемый рядом микроорганизмов, из которых используются главным образом некоторые штаммы *Arthrobacter* и *Streptomyces*. Необходимость дезинтеграции клеток достаточно мягкими методами, не вызывающими необратимую инактивацию фермента, приводит к существенному повышению стоимости глюкозоизомеразы по сравнению, например, с внеклеточными гидролазами. К тому же глюкозоизомераза очень чувствительна к ряду ингибиторов. Оба этих фактора предполагают целесообразность иммобилизации глюкозоизомеразы и ведения процесса в строго контролируемых условиях. Изучены различные методы иммобилизации глюкозоизомеразы, в том числе и метод, основанный на применении содержащих фермент целых клеток, закрепленных в коллагене или с помощью какого-либо другого флокулирующего и связывающего агента. Такой прием может служить примером еще одного подхода к иммобилизации внутриклеточных ферментов, заключающегося в иммобилизации продуцирующих этот фермент клеток (обычно обработанных с целью снижения сопротивления клеточных мембран массообмену) или лизатов таких клеток.

На рисунке 11 приведена схема процесса производства кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы при использовании иммобилизованной глюкозоизомеразы.

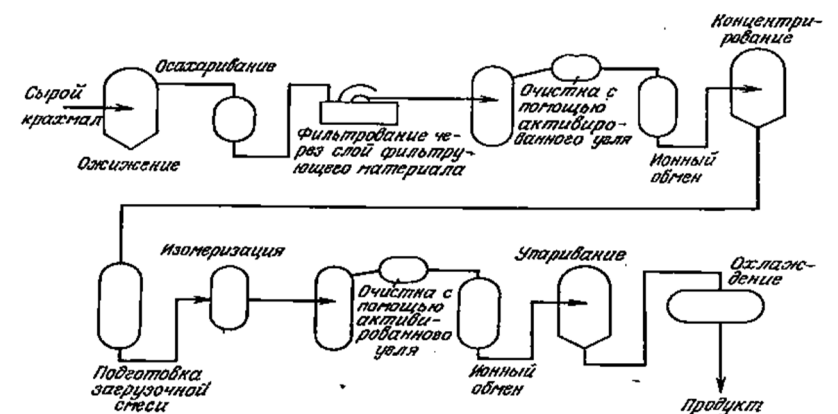


Рисунок 11 – Схема процесса производства кукурузного сиропа

Здесь необходимость множества операций разделения и обработки промежуточных продуктов между стадиями осахаривания и изомеризации диктуется свойствами ферментных систем. Для повышения термической устойчивости α -амилазы, применяемой для гидролиза крахмала при температуре около 105 °С, добавляют ионы кальция, которые ингибируют глюкозоизомеразу, и поэтому их связывают ионообменными смолами прежде, чем декстрозный раствор поступит в реактор изомеризации.

Пример 2. Параметры процесса изомеризации глюкозы в реакторе в присутствии иммобилизованной глюкозоизомеразы. Для выбора типа катализатора, конструкции реактора и условий каталитического процесса в реакторе потребовалось тщательное изучение множества взаимосвязанных параметров. В таблице 12 перечислены некоторые из параметров и критериев, которые учитывались ранее при проектировании реакторов для получения кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы с помощью иммобилизованной глюкозоизомеразы.

Таблица 12 – Параметры, изучавшиеся в ходе проектирования ферментера с иммобилизованной глюкозоизомеразой

Номер	Параметры
1	2
<i>Биохимические параметры</i>	
1	Активность
2	Стабильность фермента в процессе работы ферментера (время жизни катализатора) и зависимость инактивации от времени
3	Производительность в используемом диапазоне времени жизни
4	Оптимальная концентрация субстрата
5	Влияние концентрации олигосахаридов
6	Влияние растворенного кислорода
7	Минимальное и максимальное время контакта с субстратом
8	Образование побочных продуктов реакции
9	Чувствительность к изменению pH и температуры
10	Устойчивость при хранении
11	Вымывание фермента
12	Рост микроорганизмов (если наблюдается)
13	Характеристики потока на выходе из реактора (состав, цвет, запах, содержание белков, pH и т.п.).
<i>Механические параметры</i>	
14	Размер, форма частиц и их распределение по размерам
15	Насыпная масса в сухом и влажном виде

Продолжение таблицы 12

1	2
16	Набухание
17	Сжимаемость
18	Когезия
19	Истирание частиц
	<i>Гидромеханические параметры</i>
20	Перепад давлений
21	Тип потока (восходящий или нисходящий)
22	Уплотнение слоя
23	Осевая дисперсия и каналобразование
24	Распределение времени пребывания
25	Расслаивание
26	Отношение длины к диаметру
27	Минимальная скорость начала псевдооживления

В таблице 13 указаны основные свойства катализатора, выбранного в ходе разработки проекта компанией *H.J. Heinz Company*.

Таблица 13 – Физические и каталитические свойства иммобилазы – катализатора с глюкозоизомеразной активностью (продукт фирмы *ICI*)

Наименование	Состояние
Форма катализатора	Сухие гранулы
Внешний вид	Окрашен в желто-коричневый цвет
Размер частиц, меш	Номинальный размер 12×20 (цилиндрические гранулы диаметром около 1 мм, длиной около 2,5 мм)
Объемная плотность в сухом состоянии, г/см ³	0,64–0,72
Объемная плотность во влажном состоянии, г/см ³	0,2 (±10,0 %)
Характерный размер пор, мкм	0,2
Активность, ед./г	Не менее 0,04
Производительность	В среднем до 907 кг 42,0%-ного обогащенного фруктозой сиропа на 0,45 кг фермента в течение 1000 ч
Объем пустот в слое, %	Около 45,0

Единица активности определяется как количество катализатора, способное превратить 10^{-9} молей субстрата в 1 мин при 60 °С и рН 8,0.

Выбранный размер частиц катализатора удовлетворяет двум взаимоисключающим требованиям: с одной стороны, частицы катализатора достаточно малы, чтобы скорость диффузии не лимитировала скорость всего процесса, а с другой – их размеры достаточно велики, чтобы свести к минимуму перепад давлений на реакторе колонного типа со слоем иммобилизованного фермента.

Оптимальные условия реакции приведены в таблице 14. Необходимо обеспечить высокое содержание глюкозы в поступающей в реактор смеси; присутствие в ней более 10,0 % олигосахаридов существенно снижает активность фермента. Большой диапазон времени контакта катализатора с субстратом объясняется постепенной инактивацией катализатора. С течением времени активность фермента падает и при постоянной скорости потока реагентов степень превращения субстрата постепенно снижается. Для обеспечения качества продукции по мере инактивации фермента время его контакта с субстратом увеличивают путем уменьшения скорости потока.

Таблица 14 – Условия реакции изомеризации глюкозного сиропа в ферментерах колонного типа в слое иммобилизованного фермента

Наименование	Величина
Содержание сухого вещества, %	40–45
Содержание глюкозы в исходной смеси, %	93–96
Требования к исходной смеси	Смесь необходимо очистить фильтрованием, обработкой активированным углем и методом ионного обмена
pH	8,2–8,5
Падение pH	На 0,2–0,4
Температура, °C	60
Активатор	0,0004 М Mg ²⁺
Время контакта фермента с субстратом, ч	0,5–4,0

Размеры реактора колонного типа определяются гидромеханическими свойствами слоя катализатора. При нисходящем потоке реакционной смеси слой иммобилизованного фермента способен сжиматься под давлением, в результате сопротивление потоку возрастает.

На рисунке 12 изображена зависимость перепада давлений на колонне от высоты слоя катализатора при максимальной скорости потока, допустимой в случае свежего катализатора.

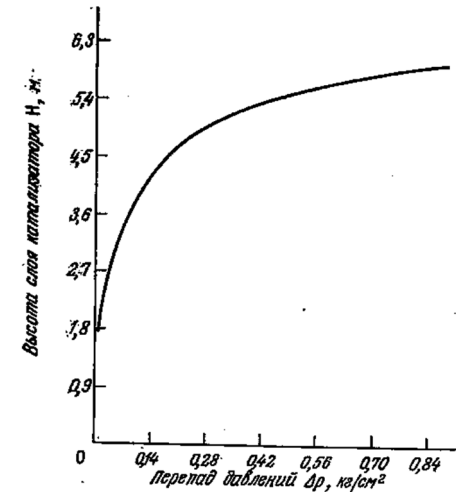


Рисунок 12 – Зависимость перепада давления в колонне от высоты слоя катализатора; колонна с нисходящим потоком раствора заполнена гранулами иммобилизованной глюкозоизомеразы

Если перепад давления на колонне превышает $0,2 \text{ кг/см}^2$, то сопротивление колонны резко возрастает. Отсюда следует, что максимальная высота слоя катализатора должна составлять около 4,6 м. Учитывая известное время контакта катализатора с субстратом и заданную производительность всей установки, можно определить размеры необходимых колонных реакторов и их число. В силу инактивации катализатора устанавливаются несколько колонн, так чтобы они инактивировались (и заменялись) последовательно; это позволит максимальным образом использовать катализатор и обеспечить постоянную высокую производительность установки в целом.

Потребность в *L*-аминокислотах для производства пищевых продуктов и в медицинских целях постоянно возрастает. В связи с этим большое внимание уделяется разработке как микробиологических, так и химических методов получения *L*-аминокислот. Недостатком химических методов является рацемическая смесь синтетических аминокислот. *D*-изомеры не имеют питательной ценности, поэтому желательно получать только физиологически активные *L*-аминокислоты. Процесс разработан фирмой *Tanabe Seiyaku Co., Ltd.* (Осака, Япония), в котором впервые в промышленном масштабе применялись иммобилизованные ферменты, и результаты были опубликованы в печати (рисунок 13).

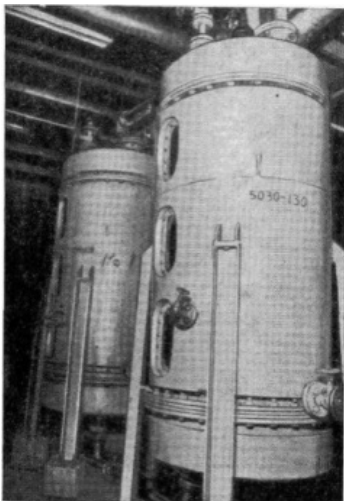


Рисунок 13 – Ферментеры колонного типа с иммобилизованным ферментом, применяющиеся фирмой *Tanabe Seiyaku Co., Ltd.* в производстве *L*-аминокислот

Основой процесса является метод разделения оптических изомеров в соответствии со следующей реакцией, катализируемой ферментом аминоксилазой



Реакцию осуществляют в ферментере колонного типа с иммобилизованной аминоксилазой (см. рисунок 13), затем главный продукт реакции *L*-аминокислоту отделяют от негидролизованной *D*-ациламинокислоты на основе их различной растворимости. Затем *D*-ациламинокислоту рацемизируют до *DL*-ациламинокислоты и ее снова направляют в колонну с аминоксилазой. Схема процесса приведена на рисунке 14.

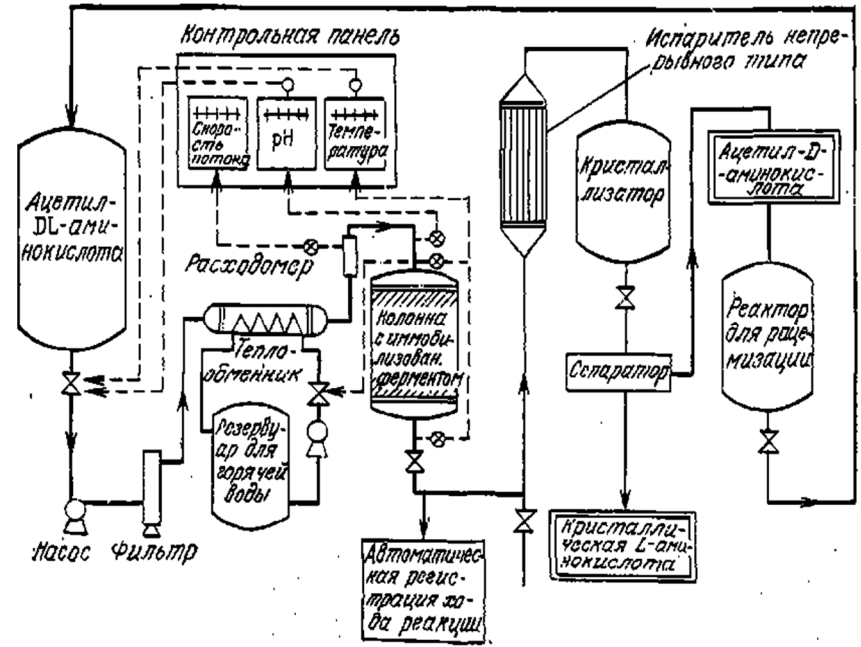


Рисунок 14 – Технологическая схема процесса с применением иммобилизованной аминоксилы фирмы *Tanabe Seiyaku*

В таблице 15 суммированы выводы о свойствах различных форм иммобилизованных ферментов. Эти данные еще раз говорят о том, что при подборе катализатора для промышленного использования помимо начальной активности необходимо учитывать другие факторы.

В итоге была выбрана аминоксилы, иммобилизованная ионными связями на *DEAE*-сефадексе, в силу высокой активности, простоты получения, возможности регенерации и устойчивости катализатора.

В 1978 г. представители компании *Tanabe Seiyaku* сообщили, что этот катализатор используется уже более пяти лет без какого-либо механического разрушения и снижения (связывающей) активности.

В 1983 г. было опубликовано сообщение о первом промышленном процессе с применением ферментов, иммобилизованных полупроницаемыми мембранами, – процессе превращения с помощью ацилазного фермента *N*-ацетил-*DL*-метионина в *L*-метионин.

Таблица 15 – Свойства различных форм аминоксилазы
(субстрат – ацетил-*DL*-метионин)

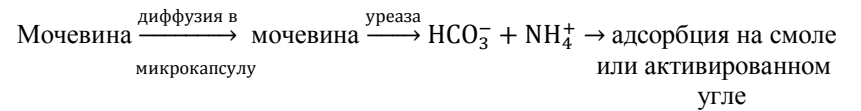
Свойства	Нативная аминоксилаза	Ионное связывание (на <i>DEAE</i> -сефадексе)	Ковалентное связывание (с йодацетилцеллюлозой)	Фермент, включенный в ПААГ
pH_{opt}	7,5–8,0	7,0	7,5–8,5	7,0
T_{opt} , °C	60	72	55	65
$E_{активации}$, ккал/моль	6,9	7,0	3,9	5,3
$[Co^{2+}]_{opt}$, мМ	0,5	0,5	0,5	0,5
K_m , мМ	5,7	8,7	6,7	5,0
v_{max} , мкмоль/ч	1,52	3,33	4,65	2,33
Методика получения		Простая	Сложная	Сложная
Связывающие силы		Слабые	Сильные	Слабые
Возможность регенерации		Возможна	Невозможна	Невозможна

1.3.3 Применение иммобилизованных ферментов в медицине и биохимическом анализе

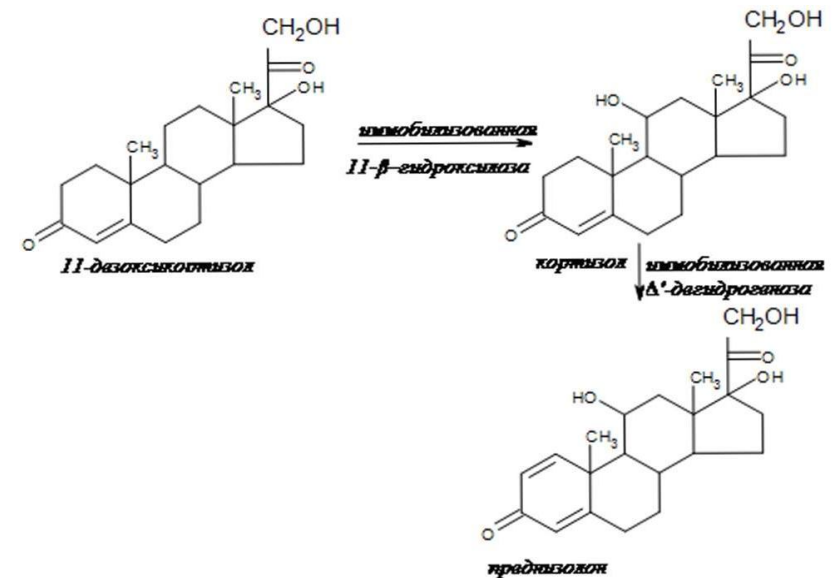
В настоящее время известно более сотни врожденных метаболических заболеваний человека; многие из этих дефектов связаны с отсутствием активности какого-либо одного конкретного фермента, имеющегося в организме здоровых людей. Например, фенилкетонурия (болезнь, приводящая к задержке умственного развития), как полагают, вызывается недостатком фермента, превращающего фенилаланин в тирозин. В настоящее время терапевтический способ лечения фенилкетонурии сводится к специальной диете, не содержащей фенилаланина. Альтернативным способом лечения могло бы быть введение недостающего фермента, однако фермент с такой же активностью, выделенный из животных, вызывает резкую иммунологическую реакцию организма человека. Эту проблему, возможно, удастся решить, заключив фермент в микрокапсулы, волокна или гель. Иммобилизованный таким

образом фермент уже не вызовет защитной реакции иммунной системы, и в то же время небольшие молекулы субстрата смогут контактировать с ферментом, проникая через стенки микрокапсулы, волокна или гель. Защищенные мембранами ферменты не подвергаются действию антител, но в то же время концентрация биокатализаторов на поверхности природных мембран снижает эффективность массообмена, а следовательно, и скорость утилизации субстрата.

Вариант изложенного выше подхода был положен в основу одного из предполагаемых проектов компактной искусственной почки. Согласно этому проекту, уреазу и ионообменную смолу или активированный уголь помещают в одну микрокапсулу; образующийся в процессе разложения мочевины аммиак адсорбируется внутри микрокапсулы



Из попыток применения иммобилизованных ферментов в мелко-масштабном производстве следует отметить их использование для трансформаций стероидов



Так, например, применяемый при лечении артрита кортизол можно получать из дешевого предшественника 11-дезоксикортизола в колонне с иммобилизованной 11- β -гидроксилазой, затем кортизол можно перевести в еще более ценный лекарственный препарат преднизолон в реакторе со слоем иммобилизованной Δ^1 -дегидрогеназы.

подавляющее большинство трансформаций стероидов в промышленном масштабе осуществляют микробиологическим путем.

Иммобилизованные ферменты широко применяются в аналитической биохимии. Одним из примеров – электроды с иммобилизованными ферментами, осуществляющие непрерывный контроль (мониторинг) за низкими концентрациями биохимически важных веществ. В электроде для определения мочевины (рисунок 15) иммобилизованная уреаза разлагает мочевины на ионы, которые могут быть обнаружены обычными электрохимическими методами.

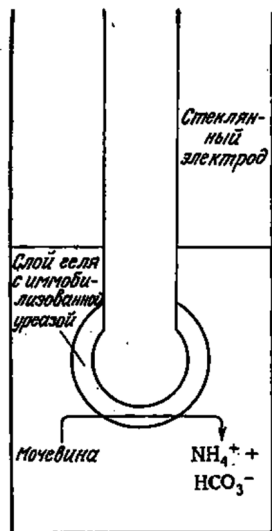


Рисунок 15 – Электрод для определения мочевины: уреаза иммобилизована в геле, нанесенном на поверхность стеклянного электрода

Электроды с иммобилизованными ферментами (рисунок 16) позволяют автоматизировать стандартные биохимические анализы.

Такая автоматизированная система может применяться, например, для определения концентраций глюкозы или лактата с помощью иммобилизованной глюкозооксидазы или лактатдегидрогеназы. На этом принципе основаны конструкции ферментных электродов для определения многих биологически важных соединений (таблица 16).

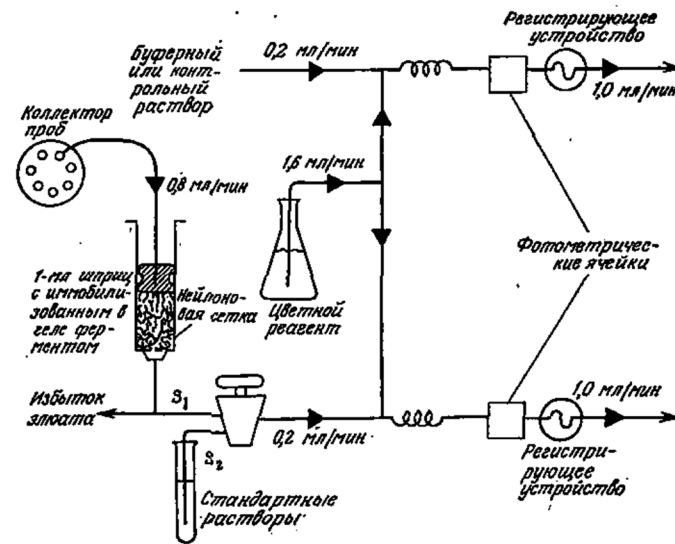


Рисунок 16 – Схема автоматической системы для определения глюкозы (с помощью иммобилизованной глюкозооксидазы) или лактата (с помощью иммобилизованной лактатдегидрогеназы)

Таблица 16 – Применение иммобилизованных ферментов в химических процессах и потенциальные сферы их использования

Тип катализируемой реакции	Иммобилизованный фермент	Область применения
1	2	3
Окисление–восстановление	Оксидаза <i>L</i> -аминокислот	Производство <i>D</i> -аминокислот
	β -Тирозиназа	Производство <i>L</i> -дигидрокси- фенилаланина Производство <i>L</i> -тирозина
	Δ^1 -Гидрогеназа	Производство преднизолона
	Флавопротеин- оксидаза	<i>N</i> -окисление лекар- ственных препаратов с аминными или гидра- зиновыми группами

Продолжение таблицы 16

1	2	3
Миграция групп	Декстрансукраза	Производство декстрана
Миграция групп	Фосфорилаза	Полимеризация глюкоза
	Полинуклеотид-фосфорилаза	Получение полинуклеотидов
	Карбаматкиназа	Регенерация АТФ
Гидролиз	Рибонуклеаза	Синтез тринуклеотидов
	α -Амилаза	Производство глюкозы
	Глюкоамилаза	
	Целлюлаза	
	Инвертаза	Производство инвертного сахара
	Лейцинамино-пептидаза	Разделение <i>DL</i> -аминокислот на оптические изомеры
	Карбокси-пептидаза	Разделение <i>DL</i> -аминокислот на оптические изомеры
	Папаин	Гидролиз казеина
	Пенициллин-амидаза	Производство 6-аминопенициллановой кислоты
		Синтез пенициллинов и цефалоспоринов
Аминоацилаза	Разделение <i>DL</i> -аминокислот на оптические изомеры	
Аденозинмоно-фосфатдеаминаза	Получение 5'-инозиновой кислоты	

Продолжение таблицы 16

1	2	3
Лиазные реакции (асимметрический синтез)	Аспартаза	Производство <i>L</i> -аспарагиновой кислоты
Лиазные реакции (асимметрический синтез)	Триптофаназа	Производство <i>L</i> -триптофана
	<i>D</i> -Оксинитрилаза	Производство нитрила <i>D</i> -миндальной кислоты
Изомеризация	Глюкозо-изомераза	Производство фруктозы

Для изучения ферментативных реакций в мембранах был разработан метод флуориметрии на поверхностях для непосредственного определения концентрации различных ферментов, субстратов и кофакторов.

Использование иммобилизованных биохимических соединений в аффинной хроматографии основано на чрезвычайно высоком сродстве определенных веществ, находящихся в растворе, к иммобилизованному соединению, что позволяет выделять, очищать и анализировать ингибиторы ферментов, кофакторы, антигены, антитела и другие вещества (см. рисунок 16).

1.3.4 Утилизация и регенерация кофакторов

В отсутствие кофакторов только два класса ферментов из шести способны проявлять каталитическую активность.

Для широкомасштабного промышленного использования ферментов четырех других классов необходимо располагать эффективными способами получения, разделения и выделения достаточных количеств органических кофакторов. Более того, для эффективной утилизации и регенерации коферментов *необходимы специальные реакторы* и каталитические установки.

Если фермент и кофермент помещены в полые волокна с полупроницаемыми стенками, через которые могут проникать и субстрат, и продукты реакции, то ферментативную реакцию можно провести без потери фермента и кофермента. На рисунке 17 приведена схема лабораторного реактора, основанного на таком принципе.

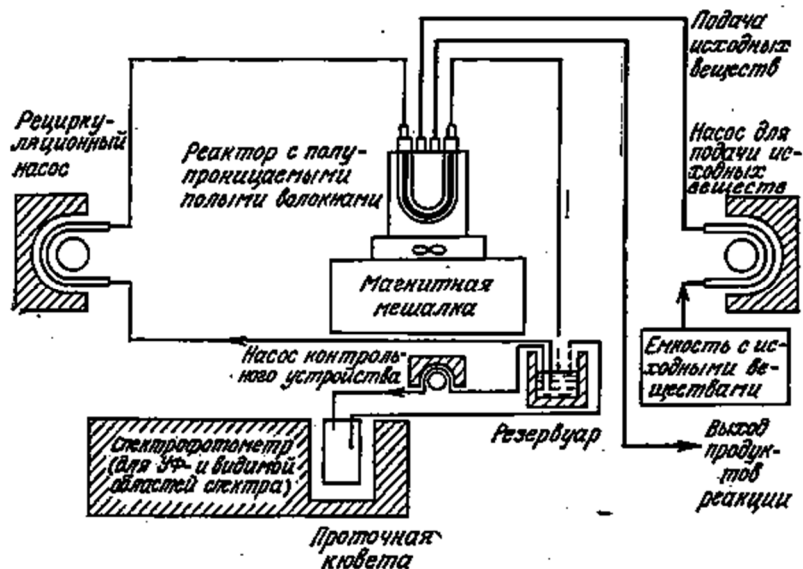
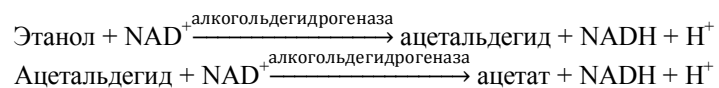


Рисунок 17 – Схема лабораторного реактора с полыми полупроницаемыми волокнами, где осуществляется непрерывный процесс, катализируемый фермент-коферментной системой

В таком реакторе, в частности, изучали протекающую в присутствии NAD двустадийную реакцию окисления этанола.

При достаточной активности и стабильности каталитической системы подобная схема может быть взята за основу и при проектировании более крупномасштабного процесса.



Этот процесс может протекать непрерывно только при условии постоянной регенерации NAD^+ путем окисления NADH; для этой цели в реакционную смесь, находящуюся внутри полых волокон, добавляли фермент диафоразу (из сердца свиньи). Диафораза катализирует окисление NADH кислородом, причем в процессе регенерации кофактора NAD^+ образуется также H_2O_2 . Поскольку пероксид водорода инактивирует многие ферменты, ферментную систему дополняют еще ферментом каталазой. Такой подход может быть распространен и на другие ферментативные реакции. Но если молекулярная масса субстрата близка молекулярной массе кофермента (коферментов) и ферментов, то потребуются некоторая модификация схемы. Если же и молекулы

кофермента относительно невелики, то устранить их потерю за счет ультрафильтрации можно, например, путем ковалентного связывания с растворимым полимером типа полиэтиленгликоля, декстрана или полилизина.

Теперь рассмотрим такие катализируемые фермент-коферментной системой процессы, в которых ферменты и (или) соответствующие коферменты связаны с нерастворимыми носителями. Любой катализатор такого типа должен обеспечивать и физический контакт фермента с коферментом, и возможность регенерации кофактора. Можно наметить три различных подхода к решению такого типа задач.

Можно иммобилизовать кофермент, а фермент и все необходимые для регенерации вещества вводить в растворенном виде. Тогда в реакционной смеси на выходе из реактора будут содержаться все реагенты, за исключением кофермента.

Можно иммобилизовать фермент, а кофермент оставить в растворе, следовательно, он перейдет и в продукты реакции. Другие ферменты и субстраты, необходимые для регенерации кофермента, можно вводить в реактор в виде раствора. В альтернативном варианте процесс регенерации может осуществляться в отдельном реакторе, в котором также могут использоваться иммобилизованные ферменты.

Можно соединить молекулы фермента и кофермента длинной гибкой цепью и затем иммобилизовать этот комплекс фермент-кофермент («кофермент на привязи»).

В промышленном производстве выбор между первым и вторым подходами определяется технологическими и экономическими факторами: легкостью осуществления, эффективностью и стоимостью процессов выделения и повторного использования фермента, кофермента и (или) системы его регенерации. Если повторное использование компонентов реакционной смеси невозможно, то первый подход более целесообразный, поскольку большинство коферментов намного дороже любого другого компонента смеси.

Альтернативный подход заключается в иммобилизации живых клеток и последующем использовании природных систем синтеза и регенерации кофакторов. На практике трудно обеспечить стабильность иммобилизованных клеток и введение необходимых фермент-коферментных систем в легкоиммобилизуемые активные клетки. Проблема решается методами генетической инженерии, внедряя в геном подходящей клетки ген, синтезирующий необходимый фермент; тогда клетка будет функцией хранилища кофактора и системы его регенерации. Другая проблема связана с регуляцией транспорта через оболочку клетки: живая клетка должна пропускать внутрь клетки субстраты, выделять во внеклеточную среду продукты реакции и в то же время не должна терять свои ферменты, кофакторы и другие вещества.

2 ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1 Ферментативные реакции в гетерогенных системах

Некоторые клеточные ферменты связаны с мембранами клетки. Аналогичные структуры имеются и в эукариотах; в митохондриях, например, со сложной системой внутренних мембран связаны ферменты, отвечающие за сложную последовательность реакций. На рисунке 18 показано, что в природе и в биотехнологии возможны многие другие сочетания различных физических состояний фермента и субстрата. Здесь мы рассмотрим кинетику ферментативных реакций между растворами ферментов и нерастворимыми субстратами, а затем изучим реакции растворимых субстратов, катализируемые связанными с носителями ферментами.

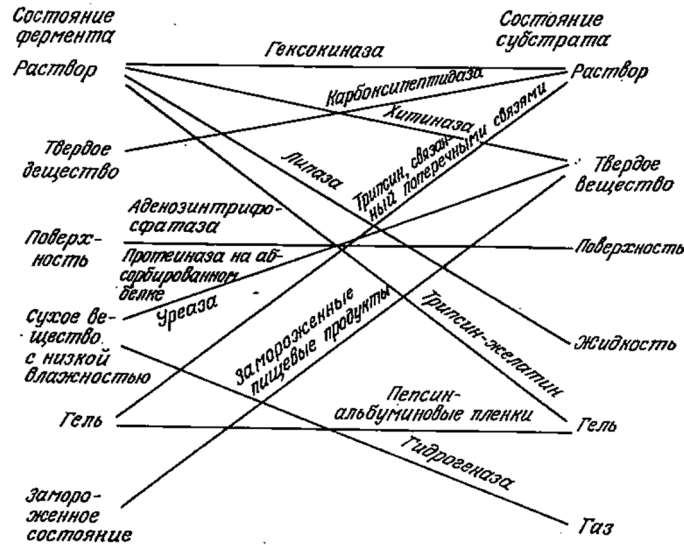


Рисунок 18 – Находящиеся в различных физических состояниях ферменты катализируют превращения различных форм субстратов

Если субстрат одновременно может существовать в нескольких фазах, то иногда ферментативной реакции подвергается только та его часть, которая находится в растворе. Примером могут служить данные, приведенные на рисунке 19.

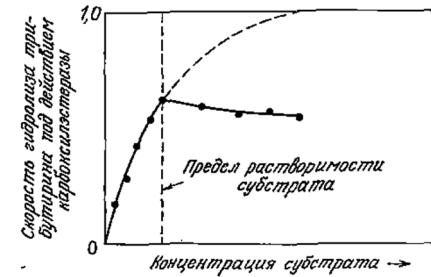


Рисунок 19 – Ферментативная реакция осуществляется только с растворенной формой субстрата

Поскольку все вещества в той или иной степени растворимы в воде, то небольшое количество субстрата всегда будет находиться в растворе и, следовательно, подвергаться действию фермента. В то же время скорость этого процесса может быть настолько мала, что не имеет практической ценности.

Другим примером (рисунок 20) является реакция гидролиза метилбутирата под действием панкреатической липазы – фермента в пищеварительном тракте человека и способного расщеплять жиры.

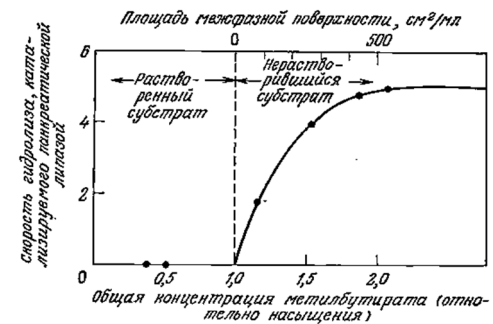


Рисунок 20 – Реакция на поверхности раздела двух жидких фаз

Здесь реакция не идет до тех пор, пока в реакционной смеси не сформируется нерастворимая форма субстрата в виде небольших капель. Этот фермент способен проявлять свою активность только на границе раздела двух жидких фаз. Учитывая возможность денатурации фермента за счет поверхностного натяжения, как и в случае упомянувшегося выше метода пенного фракционирования в присутствии

детергентов, поверхностное натяжение на жировых каплях может существенно снизиться вследствие адсорбции желчных кислот – природных ПАВ, выделяемых в пищеварительный тракт.

Другие ферменты активны в отношении как растворимой, так и нерастворимой форм субстрата (рисунок 21).

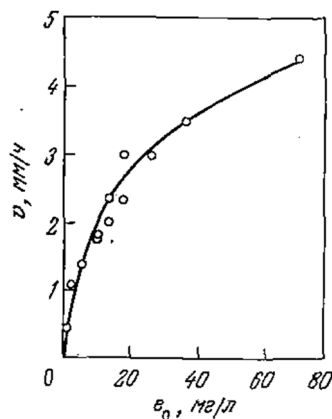


Рисунок 21 – Зависимость скорости разрушения твердого субстрата (тиогеля) от концентрации e_0 фермента в растворе

Например, протеолитический фермент трипсин способен расщеплять как свободный лизоцим, так и лизоцим, адсорбированный на поверхности носителя. Сам лизоцим также может взаимодействовать с растворимыми и «нерастворимыми» субстратами. Лизоцим активно разрушает стенки бактериальных клеток, в то же время он способен катализировать и расщепление растворимых олигомеров, образующихся из полимеров клеточной стенки.

Взаимодействие растворенного фермента с нерастворимым субстратом путем адсорбции на его поверхности может быть описано с помощью особого варианта рассмотренных ранее кинетических уравнений [1]. В отличие от предыдущих случаев, когда скорость реакции возрастала пропорционально общей концентрации фермента, здесь при повышении концентрации фермента скорость реакции сначала возрастает, а затем приближается к некоторой предельной величине. Такое поведение фермент-субстратной системы наглядно иллюстрируется приведенными на рисунке 21 данными, отражающими кинетику гидролиза твердого блока белка (в данном случае тиогеля – шитого поперечными связями желатина) под действием трипсина.

Разработку достаточно обоснованной модели для *кинетики гетерогенной реакции* начнем с допущения, обратного тому, которое было положено в основу анализа скоростей ферментативных реакций в растворе – теперь мы будем считать, что фермент адсорбируется на субстрате. Обозначив символом A вакантные центры на поверхности субстрата, можно написать следующее уравнение



Если общее число молей центров адсорбции на поверхности субстрата в расчете на единицу объема реакционной смеси принять равным a_0 , то

$$a_0 = a + (ea), \quad (13)$$

Из уравнения (13) и уравнения равновесной адсорбции фермента (12) следует, что

$$(ea) = \frac{a_0 e}{K_a + e}, \quad (14)$$

где $K_a = \frac{k_{des}}{k_{ads}}$.

Теперь допустим, что реакция завершается необратимым расщеплением комплекса EA



Следовательно,

$$v = k(ea) = \frac{ka_0 e}{K_a + e}. \quad (16)$$

По условиям модели e обозначает концентрацию свободного фермента, которая в начале эксперимента связана с общей концентрацией фермента e_0 соотношением

$$e_0 = e + (ea). \quad (17)$$

Если начальная концентрация фермента значительно превышает начальную концентрацию субстрата ($e_0 \gg a_0$), то с хорошей степенью приближения можно считать, что

$$e_0 \approx e, \quad (18)$$

поэтому

$$v = \frac{ka_0 e_0}{K_a + e_0}. \quad (19)$$

Для реакций с твердыми субстратами ситуации, когда $e_0 \gg a_0$, не являются исключением. Например, результаты, приведенные на рисунке 21, были получены в эксперименте, в котором отношение $e_0:a_0$ составляло около 4000. Этим гетерогенные реакции резко отличаются от реакций в растворах, когда s_0 обычно значительно больше, чем e_0 .

Из уравнения (19) следует, что график зависимости $1/v$ от $1/e_0$ (в двойных обратных координатах Лайнуивера–Бэрка) должен представлять собой прямую линию, как и показано на рисунке 22.

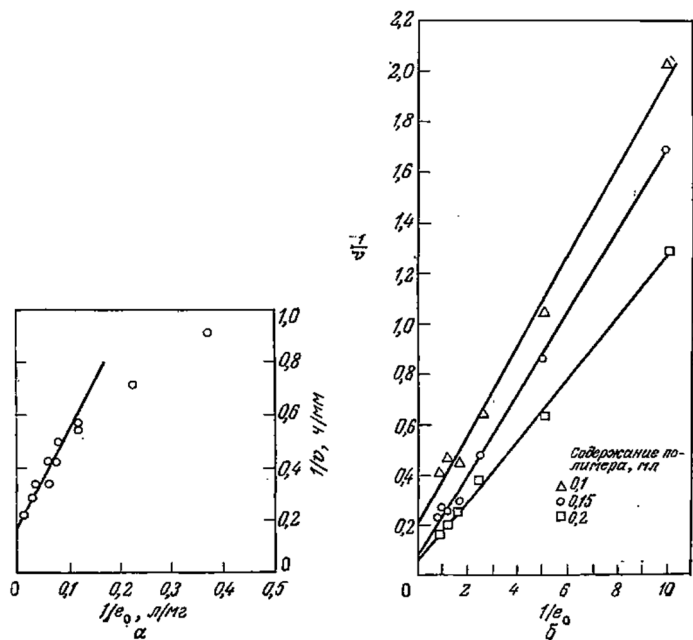


Рисунок 22 – а – зависимость скорости деструкции твердого субстрата (тиогеля) ($1/v$) от концентрации трипсина ($1/e_0$) в растворе в координатах Лайнуивера–Бэрка; б – зависимость скорости деструкции нерастворимого субстрата (частиц поли- β -гидроксибутирата) раствором фермента (деполимеразы из *P. lemoignei*)

Здесь прямая на рисунке 22а выражает в другой форме те же данные, которые были приведены на рисунке 21а, на рисунке 22б отражены аналогичные результаты, полученные для другой системы растворимый фермент – нерастворимый субстрат.

Многие источники питательных веществ для микроорганизмов представляют собой твердые частицы (в потоках сточных вод, озерах, хранилищах компоста и т.д.). Очевидно, что адсорбции и транспорту

растворенных питательных веществ через клеточные мембраны должен предшествовать гидролиз этих частиц внеклеточными ферментами. Точно так же гидролиз целлюлозы ферментами типа целлюлаз требует предварительного расщепления нерастворимых частиц, поэтому надо полагать, что рассмотренная в этом разделе кинетика гетерогенных ферментативных реакций окажется пригодной для расчетов реакторов с такого типа субстратами.

В заключение следует подчеркнуть, что область применения рассмотренной кинетической модели не ограничивается твердыми субстратами; она использовалась и для описания нерастворимых жидких субстратов, диспергированных в растворе фермента (например, системы, кинетика которой изображена на рисунке 20). Кроме того, здесь мы не принимали во внимание различий в концентрациях реагентов в основной массе жидкой фазы и на границе раздела фаз. Последнюю систему рассмотрим детально ниже.

Задача 3. Нерастворимые субстраты. В результате смешения водной суспензии однородных по размерам частиц желатина (полиглицина) и порошкообразного протеолитического фермента получена смесь, содержащая a объемных частей желатина и e молей фермента в литре суспензии.

А. Приняв, что первоначальный размер частиц равен d_0 и что единственным продуктом реакции является глицин, найдите выражения, описывающие зависимость скорости образования глицина и изменения размера частиц от времени. Примите также, что скорость реакции при $s_0 \ll e_0$ выражается уравнением Михаэлиса–Ментен, то есть

$$\frac{\text{скорость}}{\text{объем}} = \frac{ke_0s_a}{e_0 + K_E}$$

где s_a – площадь поверхности субстрата на единицу объема реакционной смеси.

Б. Из проявленной фотопленки необходимо выделить серебро путем ферментативного гидролиза связывающего серебро желатина. Определите минимальное время контакта фотопленки с раствором фермента, за которое гидролизуется весь желатин.

Задача 4. Ферментативные реакции с несколькими субстратами. В промышленных ферментных реакторах в реакционной смеси часто присутствует несколько субстратов одновременно.

А. Покажите, что в системе с двумя субстратами скорость превращения S_1 и S_2 выражается уравнением и что таким образом каждый субстрат является конкурентным ингибитором другого субстрата.

$$v_j = \frac{v_{max,j}}{1 + \frac{s_j}{K_j} (1 + \frac{s_i}{K_i})} (j, i) = (1, 2), (2, 1)$$

Б. Найдите общее выражение, описывающее общую скорость реакции одного фермента с m субстратами одновременно.

2.2 Кинетика реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами

Для проектирования реакторов с иммобилизованными ферментными катализаторами необходимо хорошо знать кинетические свойства иммобилизованных ферментов. Наблюдаемые каталитические свойства отдельной частицы катализатора на основе иммобилизованного фермента или реактора, в котором ферменты удерживаются полупроницаемой мембраной, определяются взаимосвязанным сочетанием двух процессов – транспорта субстрата и каталитической ферментативной реакции. В этом подразделе основное внимание будет уделено изучению взаимосвязи между массопередачей и каталитической реакцией и ее влияния на каталитическую активность отдельной частицы иммобилизованного фермента.

Изучение путей взаимодействия массопередачи и биохимических процессов, определяющего общую активность, инактивацию и другие параметры иммобилизованного ферментного катализатора, начнем со схемы, приведенной на рисунке 23.

На этой схеме изображено поперечное сечение тонкого слоя иммобилизованного фермента, контактирующего с обеих сторон с раствором субстрата. Вдали от катализатора концентрация субстрата и другие параметры, например pH, имеют те же значения, что и во всей реакционной среде. Эти параметры определяют методами аналитической химии. Поскольку субстрат трансформируется внутри иммобилизованного фермента и здесь же образуется продукт реакции, между раствором вдали от катализатора и активными центрами иммобилизованного фермента возникают градиенты концентраций. В частности, субстрат должен транспортироваться из раствора к наружной поверхности катализатора.

В отсутствие перемешивания этот процесс осуществляется за счет молекулярной диффузии. Обычно скорость транспорта субстрата к поверхности катализатора повышают путем перемешивания или создания потока его раствора.

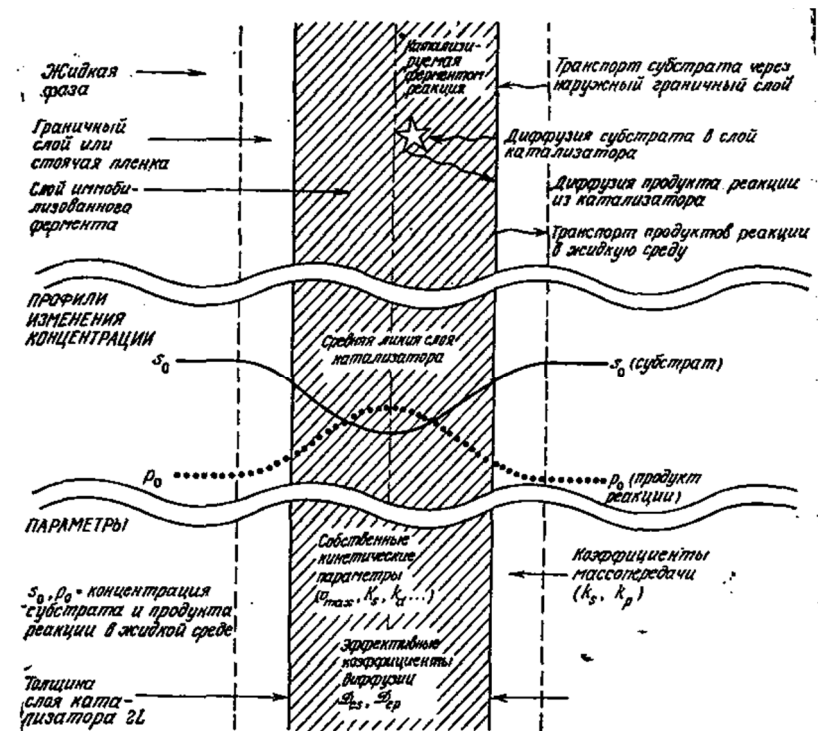


Рисунок 23 – Схема массопередачи и биохимических превращений в двустороннем слое иммобилизованного фермента: в верхней части показаны явления, которые обуславливают специфические профили изменения концентраций субстрата и продукта реакции, изображенные в средней части, которые описываются количественно с помощью параметров, перечисленных в нижней части схемы

Если активный фермент находится только на поверхности иммобилизованного фермента или если субстрат не может проникнуть внутрь частицы катализатора, то следует учитывать только эту внешнюю массопередачу. Часто, однако, фермент равномерно распределен по всему объему проницаемой для субстрата матрицы. В таком случае каталитическая активность большей частью сосредоточена и распределена внутри гранулы катализатора, и субстрат, очевидно, должен диффундировать в гранулу до некоторого активного центра, где и осуществляется реакция. Тот же путь в обратном направлении, должны

проходить и продукты реакции. В таких случаях необходимо учитывать как внешнюю массопередачу, так и процессы диффузии внутри частицы катализатора.

Как показано на рисунке 23, реакция в слое иммобилизованного фермента протекает со скоростью, определяемой концентрациями внутри этого слоя. В силу градиентов концентрации локальные скорости реакции изменяются в зависимости от положения центра реакции, а общая скорость превращения субстрата представляет собой сумму всех локальных скоростей трансформации субстрата внутри проницаемого катализатора. В стационарном состоянии эта общая скорость равна скорости транспорта субстрата к катализатору. В общем случае скорость всего процесса зависит как от скорости транспорта, так и от собственной скорости каталитической реакции.

Эти взаимосвязанные процессы играют большую роль в реакциях, катализируемых иммобилизованными ферментами и иммобилизованными клетками. В то же время их роль часто не учитывалась как в теоретических исследованиях, так и в разработке путей практического применения иммобилизованных биокатализаторов. Поэтому здесь подробно будут рассмотрены основные принципы и методы математического моделирования процессов на иммобилизованных ферментах, а также его результаты.

2.2.1 Влияние внешнего сопротивления массопередаче

Чтобы было легче усвоить некоторые основные понятия и специфическую терминологию, начнем с самого простого варианта. Предположим, что фермент иммобилизован только на наружных поверхностях носителя, имеющего форму пластины. В этом случае мы должны рассматривать только массопередачу из раствора к поверхности носителя и реакцию на этом носителе.

Одна из традиционных моделей, которую биохимики называют *диффузионным слоем Нернста*, а технологи – *стоячей пленкой*, или *граничным слоем*, приводит к выражению для потока субстрата из жидкой фазы, выраженному в молях в единицу времени: на единицу поверхности к границе раздела фаз (в биохимии называют *пулом*)

$$N_s = k_s(s_0 - s), \quad (20)$$

где s – концентрация субстрата на границе раздела фаз, s_0 – концентрация субстрата в жидкой фазе, k_s – коэффициент массопередачи, который зависит от физических свойств среды, а также от гидродинамических условий вблизи границы раздела фаз и возрастает при повышении скорости потока через реактор колонного типа с насадкой иммобилизованного фермента. Его определяют по известным корреляциям.

В стационарном состоянии субстрат не может накапливаться на поверхности катализатора, поэтому скорость поступления субстрата за счет массопередачи должна быть равна скорости его расхода в реакции на поверхности катализатора. Если допустить, что скорость у ферментативной реакции на поверхности (выраженная в молях в единицу времени на единице поверхности) подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен, то получим

$$k_s(s_0 - s) = \bar{v} = \frac{v_{max}s}{K_m + s}. \quad (21)$$

Число необходимых для описания системы параметров (k_s, s_0, v_{max}, K_m) можно уменьшить до двух (Da и κ) путем введения следующих безразмерных переменных

$$x = \frac{s}{s_0}, \quad Da = \frac{v_{max}}{k_s s_0}, \quad \kappa = \frac{v_{max}}{s_0}. \quad (22)$$

С учетом этих параметров уравнение материального баланса по субстрату примет вид

$$\frac{1-x}{Da} = \frac{x}{\kappa + x}, \quad \text{где } 0 \leq x \leq 1, 0. \quad (23)$$

Здесь необходимо подчеркнуть физический смысл параметра Da , числа Дамкелера

$$Da = \frac{v_{max}}{k_s s_0} = \frac{\text{максимальная скорость реакции}}{\text{максимальная скорость массопередачи}}. \quad (24)$$

Так, если $Da \ll 1$, то максимальная скорость массопередачи намного превышает максимальную скорость реакции (низкое сопротивление массопередаче, *лимитируемый реакцией режим*). Если же сопротивление массопередаче велико, то этот фактор ограничивает скорость всего процесса, а $Da \gg 1$ (*лимитируемый диффузией режим*).

Алгебраическим преобразованием уравнения (23) получим квадратное уравнение, из которого определим x аналитическим путем

$$x = \frac{\beta}{2} \left(\pm \sqrt{1 + \frac{4\kappa}{\beta^2}} - 1 \right), \quad (25)$$

где $\beta \equiv Da + \kappa - 1$.

В уравнении (25) знаки «+» и «-» применяются при $\beta > 0$ и $\beta < 0$ соответственно. Если $\beta = 0$, то $x = \sqrt{\kappa}$. Используя это выражение для $\frac{s}{s_0}$, можно с помощью правой или левой части уравнения (25) оценить безразмерную *наблюдаемую* скорость реакции $\frac{\bar{v}}{v_{max}}$.

Следует помнить, что в общем случае зависимость \bar{v} от s_0 не выражается уравнением Михаэлиса–Ментен. Кроме того, K_m уже нельзя считать равным $s_{1/2}$, когда \bar{v} ровно в два раза меньше наблюдаемой максимальной скорости реакции \bar{v}_{max}^{app} , поскольку величина $s_{1/2}$ зависит от Da.

Тем не менее параметр $s_{1/2}$ часто называют кажущейся константой Михаэлиса K_m^{app} и используют для оценки влияния массопередачи. Если перед исследователем стоит только задача определения, $s_{1/2}$ такое упрощение может оказаться удобным, но в общем случае оно может привести к серьезным ошибкам. Например, можно прийти к выводу, что наблюдаемой скорости реакции соответствует следующее некорректное уравнение

$$\bar{v}_{obs} = \frac{v_{max}^{app} s_0}{K_m^{app} + s_0}. \quad (26)$$

В конкретном случае это уравнение может даже удовлетворительно описывать наблюдаемую кинетику процесса, но в целом оно неверно, поскольку в нем не учтена зависимость K_m^{app} от свойств жидкой среды и гидродинамических свойств слоя вблизи границы раздела фаз. Как показывают экспериментальные данные, такая зависимость может резко изменять кинетику процесса (рисунок 24).

В химической технологии влияние массопередачи на общую скорость реакции традиционно выражают через коэффициент эффективности η , физический смысл которого определяется следующим образом

$$\eta = \frac{\text{наблюдаемая скорость реакции}}{\text{наблюдаемая скорость в отсутствие сопротивления массопередаче (при } s = s_0)} = \frac{x/(k+x)}{1/(k+1)}. \quad (27)$$

Поэтому $\eta \leq 1$, и, таким образом, в общем случае повышение сопротивления массопередаче будет сопровождаться снижением наблюдаемой активности катализатора.

Если бы кинетика процесса подчинялась уравнению Михаэлиса–Ментен, то при потоке идеального вытеснения наклон всех кривых на рисунке 24 был бы одинаков и равен K_m .

Изменение наклона с изменением скорости потока свидетельствует о значительном влиянии массопередачи на кинетику процесса в целом.

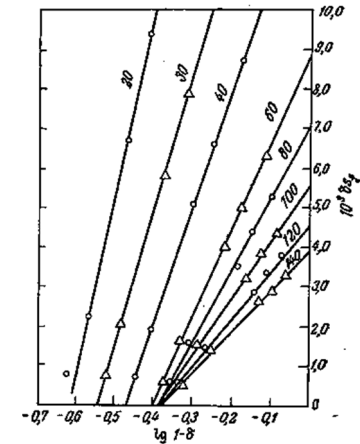


Рисунок 24 – Экспериментальное обнаружение взаимосвязи между скоростью трансформации субстрата δ ($\delta = \frac{s_f - s_e}{s_f}$, где s_f и s_e – концентрации субстрата в исходной смеси и в продуктах реакции соответственно) и скоростью потока (указана цифрами на кривых (мл/ч)) в реакторе со слоем иммобилизованного фермента (изучалась реакция гидролиза этилового эфира бензоил-*L*-аргинина фицином на карбоксиметилцеллюлозе)

На рисунке 25 приведены результаты эксперимента, подтверждающие такую зависимость.

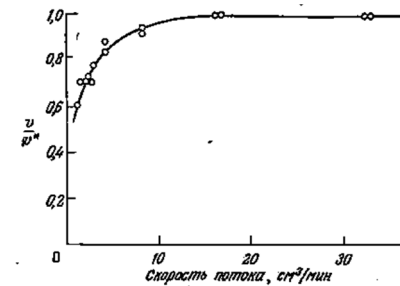


Рисунок 25 – Экспериментальный метод обнаружения эффектов внешней диффузии; здесь v^* – скорость реакции при высоких скоростях потока через насадочную колонну (изучалась реакция гидролиза $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*DL*-аргинина иммобилизованным трипсином при pH 8 и 25 °C)

Если параметр Da близок нулю (очень медленная по сравнению с максимальной скоростью массопередачи реакция), то, согласно уравнению (23), x приближается к единице, и, следовательно, для лимитируемого реакцией режима ($Da \rightarrow 0$)

$$\eta = 1, \quad \bar{v} = \frac{v_{max} s_0}{K_m + s_0}. \quad (28)$$

В этом случае кинетика процесса не отличается от истинной, проводится в условиях, когда $Da \ll 1$; только тогда будут устранены маскирующие диффузионные эффекты.

Сведения о собственной кинетике ферментативной реакции необходимы также при разработке и проектировании реакторов с иммобилизованными ферментами, поскольку только таким путем можно достаточно надежно учесть влияние свойств жидкой среды, формы носителя фермента и характеристик смешения. Разработано много типов экспериментальных реакторов, предназначенных для изучения реакций обычного гетерогенного катализа в лимитируемом реакцией режиме. Такие реакторы применяли и для исследования кинетики реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами (рисунок 26).

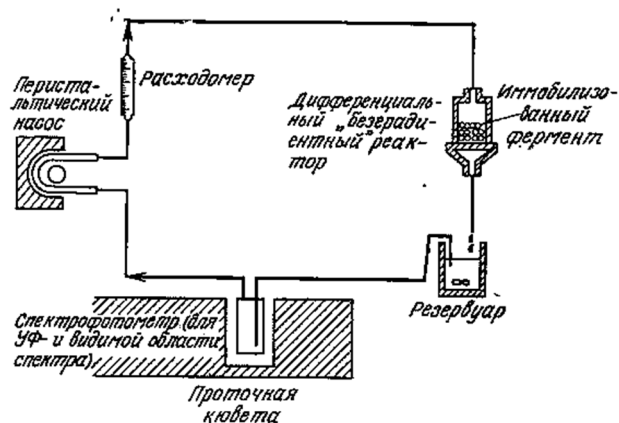


Рисунок 26 – Реактор с рециркуляцией для изучения влияния внешней массопередачи на кинетику реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами

В целях минимизации сопротивления массопередаче во всех этих реакторах вблизи катализатора создавались высокие скорости потока (большие k_s , малые Da). Что касается иммобилизованных ферментов, то такой подход имеет несколько недостатков. Во-первых, гидродинамическое воздействие может вызвать частичную или даже полную де-

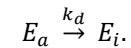
натурацию ферментов, связанных с носителем. Во-вторых, механическое перемещение одних частиц катализатора относительно других может приводить к потере фермента за счет истирания.

В системах, в которых скорость процесса зависит как от биохимической реакции, так и от массопередачи, лимитируемый диффузией режим возникает тогда, когда v_{max} значительно больше $k_s s_0$, то есть при $Da \gg 1$. Для лимитируемого диффузией режима ($Da \rightarrow \infty$, κ ограничен) путем ряда преобразований уравнения (25), включая разложение в ряд квадратного корня, можно получить следующие выражения

$$\eta = \frac{1 + \kappa}{Da}, \quad \bar{v} = k_s s_0. \quad (29)$$

Таким образом, при очень больших значениях Da реакция имеет первый порядок по общей концентрации субстрата и ее скорость \bar{v} совершенно не зависит от собственных параметров катализатора v_{max} и K_m . В такой ситуации собственные кинетические параметры иммобилизованных ферментов вообще не проявляются. В лимитируемом диффузией режиме, например, при заданном s_0 наблюдаемая активность постоянна, даже если ферменты на границе раздела фаз на самом деле теряют активность, в частности за счет изменения в неблагоприятную сторону температуры, pH или других условий процесса. Поэтому изучение скорости денатурации иммобилизованного фермента должно проводиться только в условиях, максимально приближенных к лимитируемому реакцией режиму.

Задача 5. Маскирование инактивации иммобилизованного фермента массопередачей. Рассмотрим иммобилизованный фермент, необратимо теряющий свою активность в соответствии с уравнением. В простейшей модели инактивации молекулы активного фермента (E_a) претерпевают необратимые структурные или химические изменения, приводящие к неактивной форме (E_i)



Скорость этой реакции пропорциональна концентрации активной формы фермента

$$r_d = -k_d e_a.$$

Примем, что в реакционной смеси нет ни субстрата, ни продукта реакции, ни ингибитора, ни иного эффектора. Тогда в закрытой системе при эффективном перемешивании изменение концентрации активной формы фермента во времени будет описываться уравнением

$$\frac{de_a}{dt} = -k_d e_a.$$

Решив это дифференциальное уравнение, получим

$$\ln \frac{e_a(t)}{e_a(0)} = -k_d t.$$

Примем, что превращение субстрата является реакцией приблизительно первого порядка.

А. Предположим, что фермент иммобилизован на наружной поверхности непроницаемого для субстрата твердого носителя и что при $t = 0$ число Дамкелера Da велико. Начертите графики зависимости коэффициента эффективности и скорости реакции от времени. Какие ошибочные выводы относительно влияния иммобилизации на стабильность фермента можно сделать, если не ввести соответствующие поправки на эффекты массопередачи?

Б. Ответьте на тот же вопрос в другой ситуации, когда фермент иммобилизован внутри проницаемой для субстрата пластины. Примите, что внешнее сопротивление массопередаче относительно невелико.

2.2.2 Моделирование диффузии и реакций внутри частицы катализатора

Ферменты также иммобилизуют путем связывания с внутренними поверхностями пористых носителей или путем включения в матрицы, через которые может диффундировать субстрат. В таких системах для расчета наблюдаемой скорости трансформации субстрата необходимо знать профиль изменения его концентрации в частице катализатора. Для этого сначала надо найти уравнение материального баланса в стационарном состоянии для тонкого слоя проницаемого катализатора.

Предположим, что фермент иммобилизован в грануле, форму которой можно считать сферической. Тогда необходимый тонкий слой будет заключен между двумя концентрическими сферами радиусов r и $r + dr$ соответственно (рисунок 27). Толщина этого слоя настолько мала, что все условия внутри него можно считать постоянными независимо от положения.

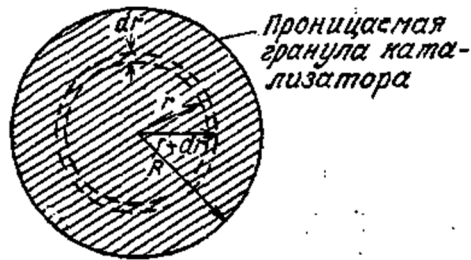


Рисунок 27 – Схема сферической проницаемой гранулы иммобилизованного фермента

Символами \mathcal{D}_{es} и v обозначают эффективный коэффициент диффузии субстрата и локальную скорость его трансформации соответственно. Оба этих параметра принципиально отличаются от аналогичных параметров для процессов в растворе, существенна и количественная разница между ними.

Рассмотрим сначала эффективный коэффициент диффузии, учитывая, что скорость диффузии любых веществ через носитель зависит от следующих факторов:

1. Часть поперечного сечения частицы катализатора занята молекулами твердого носителя и поэтому не может использоваться для диффузионного транспорта субстратов (соответствующий параметр – пористость частицы ε_p).

2. Сеть пор переплетена очень сложным образом, поэтому диффузия может происходить только в разрешенных, часто меняющихся направлениях (соответствующий параметр – коэффициент извилистости τ).

3. Поры могут иметь очень небольшой диаметр, сравнимый с размерами молекул субстрата (ограниченная диффузия; соответствующий параметр $\frac{K_p}{K_r}$).

Эффективный коэффициент диффузии можно выразить через эти параметры

$$\mathcal{D}_{es} = \mathcal{D}_{s0} \frac{\varepsilon_p}{\tau} \frac{K_p}{K_r}. \quad (30)$$

Здесь \mathcal{D}_{s0} – коэффициент диффузии субстрата в жидкой реакционной среде. Параметр пористости ε_p необходимо определять экспериментально для каждого конкретного носителя. Для коэффициента извилистости τ обычно принимают значения, расположенные в диапазоне от 1,4 до 7,0. Что касается ограниченной диффузии, то соответствующий параметр $\frac{K_p}{K_r}$ в первом приближении можно оценить, воспользовавшись следующим уравнением

$$\frac{K_p}{K_r} \approx \left(1 - \frac{r_s}{r_p}\right)^4, \quad (31)$$

где r_s и r_p – (эквивалентный) радиус молекул субстрата и характеристический радиус поры соответственно. Неопределенность всех параметров в правой части уравнения (30) является причиной того, что найти достоверное значение \mathcal{D}_{es} расчетным путем очень трудно.

Поэтому предпочтительнее оценивать \mathcal{D}_{es} на основе экспериментального изучения общей кинетики процесса. Этот метод мы рассмотрим позднее, после анализа взаимного влияния диффузионных и химических процессов внутри частицы иммобилизованного фермента.

Следует отметить также, что массопередача внутри частицы может зависеть от химии ее внутренних поверхностей и от наличия ионизированных групп. Более того, если в реакции участвуют или образуются ионизированные соединения, то внутри частицы катализатора могут создаваться градиенты электрического потенциала, которые будут изменять скорости транспорта заряженных веществ.

Если допустить, что собственная кинетика локальной ферментативной реакции с участием иммобилизованного фермента подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен

$$v = \frac{v_{max} s}{K_m + s}, \quad (32)$$

то параметр максимальной скорости в данном случае можно определить по формуле

$$v_{max} = e_{imm} \rho_p q_{E,imm}, \quad (33)$$

где e_{imm} – нагрузка носителя ферментом (количество микромолей фермента в 1 г носителя); $q_{E,imm}$ – удельная активность иммобилизованного фермента (число микромолей субстрата, превращаемых в 1 с 1 мкмоль фермента); ρ_p – плотность частиц (количество граммов носителя в единице его объема).

Иммобилизация может изменять структуру фермента и (или) его молекулярное окружение, и, следовательно, величины $q_{E,imm}$ и K_m для иммобилизованного фермента могут отличаться от соответствующих величин для фермента в растворе.

Уравнение материального баланса для стационарного состояния в тонком слое, ограниченном радиусами r и $r + dr$, можно записать в следующем виде

$$\left(-\mathcal{D}_{es} \frac{ds}{dr} 4\pi r^2\right)|_r - \left(\mathcal{D}_{es} \frac{ds}{dr} 4\pi r^2\right)|_{r+dr} = v(s) 4\pi r^2 dr, \quad (34)$$

при $\mathcal{D}_{es} = \text{const}$, разделив на $4\pi dr$, получим

$$\frac{\mathcal{D}_{es} \left(r^2 \frac{ds}{dr}|_{r+dr} - r^2 \frac{ds}{dr}|_r\right)}{dr} = r^2 v(s), \quad (35)$$

в пределе при $dr \rightarrow 0$

$$\mathcal{D}_{es} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{ds}{dr}\right) = r^2 v(s), \quad (36)$$

или

$$\mathcal{D}_{es} \left(\frac{d^2 s}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{ds}{dr}\right) = v(s), \quad (37)$$

таким образом, главное уравнение (37) для расчета скорости является дифференциальным уравнением второго порядка, к которому необхо-

димо добавить граничные условия. Профиль изменения концентрации в частице катализатора симметричен относительно центра сферы

$$\frac{ds}{dr}\Big|_{r=0} = 0. \quad (38)$$

Допускаем, что концентрация субстрата на наружной поверхности гранулы равна концентрации субстрата s_0 в жидкой среде, омывающей гранулу, тогда

$$s|_{r=R} = s_0. \quad (39)$$

Наблюдаемая общая скорость v_0 утилизации субстрата частицей катализатора равна поступлению субстрата в гранулу за счет диффузии. Величина v_0 , выраженная в молях на единицу объема гранулы в единицу времени, составляет

$$v_0 = \frac{A_p}{V_p} \left(\mathcal{D}_{es} \frac{ds}{dr} \Big|_{r=R} \right). \quad (40)$$

Здесь символами V_p и A_p обозначены объем частицы и площадь ее наружной поверхности соответственно.

Как и в предыдущем разделе, такие скорости мы будем выражать в виде безразмерного параметра, определяющего влияние диффузионных эффектов. Коэффициент эффективности η определяется

$$\eta = \frac{v_0}{v(s_0)} = \frac{\text{наблюдаемая скорость}}{\text{наблюдаемая скорость при отсутствии градиентов концентраций в грануле}}. \quad (41)$$

Если в соответствии с уравнением (32) v изменяется нелинейно, то определить коэффициент эффективности аналитическим путем непросто. Для этого необходимо решить в цифровой форме задачу о граничном значении (37)–(39) и затем по уравнению (40) найти v_0 . Такие вычисления сложны и трудоемки, поэтому выразим результаты в наиболее простой и общей форме. Для этого преобразуем уравнения в эквивалентные безразмерные выражения.

Введем параметры $\bar{s} = \frac{s}{s_0}$ и $\bar{r} = \frac{r}{R}$, тогда уравнение (37) можно записать в следующей форме

$$\frac{d^2\bar{s}}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}} \frac{d\bar{s}}{d\bar{r}} = \frac{vR^2}{\mathcal{D}_{es}s_0} = 9\phi^2 \frac{\bar{s}}{1 + \beta\bar{s}}. \quad (42)$$

Здесь безразмерные параметры ϕ и β определяются как

$$\phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{v_{max}/K_m}{\mathcal{D}_{es}}}, \quad \beta = \frac{s_0}{K_m}. \quad (43)$$

Соответствующие уравнению (42) безразмерные граничные условия равны

$$\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}}\Big|_{\bar{r}=0} = 0, \quad \bar{s}|_{\bar{r}=1} = 1. \quad (44)$$

Физический смысл параметра ϕ , называемого модулем Тила, заключается в том, что квадрат модуля Тила представляет собой частное от деления скорости реакции первого порядка $R^3 \frac{v_{max}}{K_m} s_0$ на скорость диффузии $R D_{es} s_0$. Параметр насыщения β является мерой отклонения локальных скоростей от кинетики первого порядка, причем большие значения β свидетельствуют о том, что порядок реакции приближается к нулевому.

Выразим через эти безразмерные переменные коэффициент эффективности

$$\eta = \frac{\left(\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}}\right)_{\bar{r}=1}}{3\phi^2 \left[\frac{1}{(1+\beta)}\right]}. \quad (45)$$

Согласно уравнениям (42) и (44), \bar{s} является функцией только \bar{r} , ϕ и β , и поэтому $\left(\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}}\right)_{\bar{r}=1}$ зависит только от β и ϕ . Учитывая уравнение (45), отсюда следует, что

$$\eta = f(\phi, \beta). \quad (46)$$

При использовании выражения (46) для оценки коэффициента эффективности возникает проблема, связанная с тем, что собственные параметры кинетики каталитической реакции v_{max} и K_m часто неизвестны. С помощью простых преобразований можно показать, однако, что при определении η можно обойтись и без первого параметра v_{max} . Действительно, из уравнений (45) и (40) следует, что

$$\phi = \left[\frac{R^2 v_0}{9\eta D_{es} s_0} (1 + \beta) \right]^{1/2}. \quad (47)$$

Подстановка этого выражения в правую часть уравнения (46) приводит к уравнению (49), отражающему неявную зависимость

$$\eta = g(\Phi, \beta). \quad (48)$$

Новый безразмерный наблюдаемый модуль Φ определяется следующим образом

$$\Phi = \frac{v_0}{D_{es} s_0} \left(\frac{V_p}{A_p}\right)^2. \quad (49)$$

Φ зависит только от наблюдаемой общей скорости и не зависит от собственных кинетических параметров каталитической реакции.

На рисунке 28 приведены графики зависимости η от Φ , выражаемые уравнением (48) при $\beta \rightarrow 0$ и $\beta \rightarrow \infty$. Поскольку коэффициенты эффективности для промежуточных значений $\frac{K_m}{s_0}$ располагаются между кривыми для этих двух предельных случаев, нетрудно видеть, что коэффициент η сравнительно не чувствителен к последнему собственному параметру $\frac{K_m}{s_0}$.

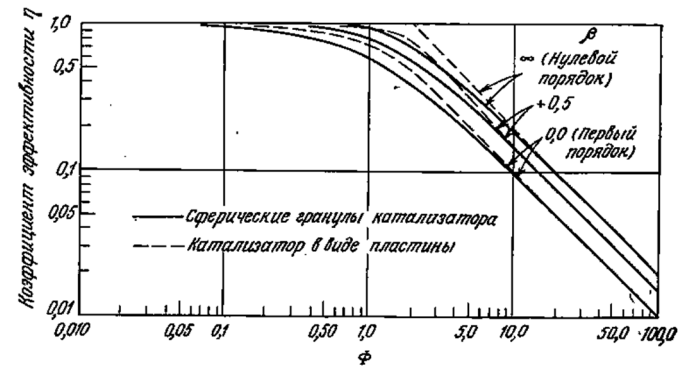


Рисунок 28 – Коэффициенты эффективности иммобилизованных ферментных катализаторов с собственной кинетикой, описываемой уравнением Михаэлиса–Ментен ($\beta = \frac{s_0}{K_m}$). Определение безразмерного наблюдаемого модуля Φ дано в уравнении (49)

Прежде чем перейти к изучению аналитических решений, основанных на приближенной оценке кинетики процессов, нам нужно найти выражение для η , применимое при больших значениях Φ (или ϕ) и кинетике, выражаемой уравнением Михаэлиса–Ментен. Если модуль Φ достаточно велик ($\Phi \geq 3$; см. таблицу 17), то субстрат быстрее утилизируется ферментом, чем диффундирует внутрь гранулы катализатора.

Таблица 17 – Критерий для оценки влияния эффектов массопередачи на кинетику всего процесса

Критерий	η	Лимитирующая стадия, определяющая скорость процесса	Влияние эффектов массопередачи
$\Phi < 0,3$	~ 1	Биохимическая реакция	Незначительное
$\Phi > 0,3$	$\propto \Phi^{-1}$	Диффузия	Большое

В такой ситуации, когда скорость всего процесса определяется скоростью диффузии, можно допустить, что весь субстрат трансформируется в граничащем с наружной поверхностью тонком слое гранулы катализатора, поэтому эффектом кривизны ($\frac{2}{r} \frac{ds}{dr}$) в уравнении (37) можно пренебречь. Отсюда следует, что

$$D_{es} \frac{d^2 s}{dr^2} = v(s), \quad (50)$$

Если в уравнение (50) вместо $\frac{d^2s}{dr^2}$ подставить правую часть уравнения (51)

$$\frac{d^2s}{dr^2} = \frac{1}{2} \frac{d}{ds} \left(\frac{ds}{dr} \right)^2, \quad (51)$$

и затем интегрировать по s , то получим

$$\frac{ds}{dr} \Big|_{r=R} = \left[\frac{2}{D_{es}} \int_{s_c}^{s_0} v(s) ds \right]^{1/2}, \quad (52)$$

здесь s_c и s_0 – концентрации субстрата в центре частицы ($r = 0$) и на ее поверхности ($r = R$) соответственно.

В случае лимитируемой диффузией реакции $s_c \approx 0$, что позволяет вычислить интеграл в уравнении (52). Совместное решение уравнений (40), (41) и (52) приводит к следующему выражению для коэффициента эффективности, справедливому при достаточно больших значениях Φ или ϕ (общая скорость процесса определяется диффузией):

$$\eta|_{\text{большие } \Phi, \phi} = \frac{3D_{es} \left[\frac{2}{D_{es}} \int_0^{s_0} v(s) ds \right]^{1/2}}{R v(s_0)}. \quad (53)$$

Преобразование этого уравнения для частного случая кинетики, выражаемой уравнением Михаэлиса–Ментен (32), дает

$$\eta|_{\phi \gg 1} = \frac{1 + \beta}{\beta} \sqrt{2[\beta - \ln(1 + \beta)]}^{1/2}. \quad (54)$$

Продолжая изучение кинетики, выражаемой уравнением Михаэлиса–Ментен, отметим, что если допустить первый порядок реакции (это справедливо при $s \ll K_m$), то согласно данным, приведенным на рисунке 28,

$$v = ks, \quad (55)$$

где $k = \frac{v_{max}}{K_m}$ и η принимает консервативное (низкое) значение, достаточно близко приближающееся к истинному значению. Воспользовавшись линейной зависимостью (55), мы можем решить аналитическим путем уравнения модели лимитируемого диффузией процесса; таким образом получим

$$\eta = \frac{1}{\phi} \left(\frac{1}{tg3\phi} - \frac{1}{3\phi} \right), \quad (56)$$

где

$$\phi = \frac{V_p}{A_p} \sqrt{\frac{k}{D_{es}}}. \quad (57)$$

С помощью уравнения (57) можно получить изображенную на рисунке 28 кривую, отвечающую реакции первого порядка, если использовать справедливую в такой ситуации зависимость

$$\Phi = \eta\phi^2. \quad (58)$$

Другой предельный случай кинетики Михаэлиса–Ментен характерен для реакций, порядок которых приближается к нулевому ($s \gg K_m$); такую ситуацию можно определить следующим образом ($k_0 = v_{max}$)

$$v = \begin{cases} k_0 = const & \text{при } s > 0 \\ 0 & \text{при } s = 0 \end{cases} \quad (59)$$

Совместное решение задачи о граничном значении (37)–(39) и функции утилизации фермента показывает, что концентрация субстрата s зависит от радиуса r

$$s = s_0 - \frac{k_0}{6\mathcal{D}_{es}}(R^2 - r^2). \quad (60)$$

Это выражение справедливо при всех неотрицательных значениях s , то есть в интервале от некоторого критического радиуса $r = R$ до некоторого критического радиуса $r = R_c$, определяемого путем решения уравнения (37) совместно с уравнением (39) при граничных условиях

$$s = 0 \text{ и } \frac{ds}{dr} = 0 \text{ при } r = R_c. \quad (61)$$

Это решение приводит к кубическому уравнению относительно R_c

$$\left(\frac{R_c}{R}\right)^3 - \frac{3}{2}\left(\frac{R_c}{R}\right)^2 + \frac{1}{2} = \frac{3\mathcal{D}_{es}s_0}{k_0R^2}. \quad (62)$$

Таким образом, если уравнение (62) имеет положительный корень $\left(\frac{R_c}{R}\right)$, величина которого меньше единицы, то внутри гранулы катализатора существует некоторая область (от $r = 0$ до $r = R_c$), в которой $s = 0$ и $v = 0$. В таких случаях реакция протекает только во внешнем слое частицы ($R_c < r \leq R$), так что

$$\eta = \frac{\frac{4}{3}\pi(R^3 - R_c^3)k_0}{\frac{4}{3}\pi R^3 k_0} = 1 - \left(\frac{R_c}{R}\right)^3. \quad (63)$$

Если не существует имеющего физического смысла решения уравнения (62), то $\eta = 1$ и скорость трансформации субстрата во всем объеме гранулы катализатора одинакова.

Другим важным следствием изображенных на рисунке 28 зависимостей является малое влияние геометрии частицы катализатора на взаимозависимость η и ϕ . Например, коэффициент эффективности реакции первого порядка в пластине определяется выражением

$$\eta = \frac{\text{tg } \phi}{\phi}, \quad (64)$$

где ϕ определяется по уравнению (57) при $\frac{V_p}{A_p}$, равном половине толщины пластины. Эта функция во всем диапазоне значений ϕ отличается от функции в уравнении (56) не более, чем на 10 %. Наибольшие отличия наблюдаются при ϕ , близком к единице; с возрастанием или убыванием ϕ эта разница быстро уменьшается. Незначительное влияние геометрии частиц катализатора на функцию $\eta = f(\phi)$ часто позволяет использовать следующие эмпирические корреляции для коэффициента эффективности пластины иммобилизованного фермента с собственной кинетикой, описываемой уравнением Михаэлиса–Ментен

$$\eta = \begin{cases} 1 - \frac{\text{tg } \phi}{\phi} \left(\frac{\eta_d}{\text{tg} \eta_d} - 1 \right) & \text{при } \eta_d \leq 1 \\ \eta_d - \frac{\text{tg } \phi}{\phi} \left(\frac{1}{\text{tg} \eta_d} - 1 \right) & \text{при } \eta_d \geq 1 \end{cases}, \quad (65)$$

здесь η_d – асимптотическое значение коэффициента эффективности, определяемое по уравнению (54). Эти корреляции, первоначально разработанные для катализаторов с частицами, имеющими форму пластин, можно применять и к другим симметричным геометриям частиц, используя в формулировке модуля Тила в качестве параметра характеристической длины частное от деления объема частицы на ее наружную поверхность.

Малая чувствительность функции η к изменениям порядка реакции и геометрии частиц катализатора явилась основой удобного общего критерия, позволяющего различать лимитируемые реакцией и лимитируемые диффузией процессы. Этот критерий (таблица 17) сводится к единственному параметру Φ , который зависит только от наблюдаемых переменных. В небиологическом катализе параметр η обычно рассматривают как меру эффективности использования катализатора. Если η существенно отличается от единицы, то общая скорость процесса может быть повышена путем измельчения катализатора; при этом Φ уменьшается и, следовательно, возрастает η . Такой подход применяется и в биологическом катализе, он указывает на наличие связи между размером частиц иммобилизованного фермента и максимальной эффективностью процесса.

Непосредственное изучение собственной кинетики также возможно только в тех случаях, когда фактор эффективности близок к единице. На катализаторе с достаточно малыми размерами частиц

(см. задачу 6) можно экспериментально определить характер изменения скорости катализируемой иммобилизованным ферментом реакции и найти значения соответствующих кинетических параметров. Эта информация необходима для расчета наблюдаемой общей кинетики реакции на более крупных частицах катализатора. Поскольку в водных растворах эффективные коэффициенты диффузии субстрата и (или) общие концентрации субстрата обычно невелики, то лимитируемый диффузией режим, как правило, обуславливается сравнительно большими размерами частиц катализатора, что может быть необходимым или для снижения перепада давлений и сопротивления потоку в реакторах

с неподвижным слоем катализатора, или для предотвращения разрушения частиц катализатора в реакторах с псевдооживленным слоем и со взвесями катализатора. Иногда лимитируемый реакцией режим трудно воспроизвести даже в лабораторных условиях. В таких случаях данные о собственных кинетических параметрах иммобилизованного фермента приходится получать описанным выше аналитическим путем на основе экспериментальных данных, усложненных диффузионными эффектами. Как это показано в *примере 3* и *задаче 7*, экспериментальное изучение кинетики реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами, позволяет оценить и эффективный коэффициент диффузии субстрата.

Пример 3. Определение эффективного коэффициента диффузии субстрата и собственных кинетических параметров катализатора на основе иммобилизованного фермента. В качестве исходного положения примем, что собственная кинетика каталитической реакции подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен. Характерные для данного катализатора собственные кинетические параметры v_{max} и K_m , а также эффективный коэффициент диффузии субстрата D_{es} можно определить по результатам двух серий кинетических экспериментов, в одной из которых используется катализатор со сравнительно большими частицами (обеспечивающими большие значения ϕ и, следовательно, лимитируемые диффузией условия), а во второй – катализатор с гораздо более мелкими частицами (достаточно малыми, чтобы скорость трансформации субстрата определялась скоростью реакции). В каждой серии экспериментов необходимо определить значения v_0 , отвечающие различным s_0 , и затем выразить эти зависимости в графической форме в координатах Эди–Хофсти (зависимость $\frac{v_0}{s_0}$ от v_0). При достаточно больших значениях s_0 реакция имеет нулевой порядок во всем объеме частиц катализатора и, следовательно, коэффициент эффективности

равен единице, а кривые для больших и малых частиц катализатора совпадают (это говорит о том, что в случае катализатора с большими частицами условие (62) не выполняется и что ограниченная растворимость субстрата не лимитирует эксперименты в диапазоне $s_0 \gg K_m$). Таким образом, независимо от размера частиц кривые будут отсекают на оси абсцисс отрезок, равный v_{max} .

С другой стороны, если внешняя концентрация субстрата и общая скорость реакции невелики, то собственный порядок каталитических реакций будет приближаться к единице. Тогда для частиц малого размера (лимитируемый реакцией режим) $\frac{v_0}{s_0}$ равно $\frac{v_{max}}{K_m}$, а для больших размеров частиц иммобилизованного фермента, то есть для лимитируемого диффузией режима

$$\frac{v_0}{s_0} \Big|_{\substack{s_0 \ll K_m \\ \phi \gg 1}} = \eta \Big|_{\substack{\text{первый порядок} \\ \phi \gg 1}} \frac{v_{max}}{K_m} = \frac{3}{R} \sqrt{\frac{v_{max} \mathcal{D}_{es}}{K_m}}. \quad (66)$$

Следовательно, кривая зависимости $\frac{v_0}{s_0}$ от v_0 будет отсекают на оси ординат в случае мелких частиц отрезок, равный $\frac{v_{max}}{K_m}$, а в случае больших частиц – отрезок, определяемый уравнением (66). Таким образом, зная размер больших частиц катализатора и величины трех отрезков, отсекаемых на осях координат кривыми зависимости $\frac{v_0}{s_0}$ от v_0 , можно определить v_{max} , K_m и \mathcal{D}_{es} .

На рисунке 29 представлены результаты применения описанной методики к α -химотрипсину, иммобилизованному на активированной бромцианом сефарозе 4В. Определенные таким образом удельная активность иммобилизованного фермента q_E (q_E – частное от деления v_{max} на число молей иммобилизованного активного фермента в единице объема катализатора) и K_m составляют 213 мкмоль субстрата (АТЭЕ, этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина) на 1 мкмоль активного фермента в секунду и 2,6 мМ соответственно. Эти значения существенно отличаются от соответствующих параметров того же фермента в растворе, составляющих 311 мкмоль АТЭЕ на 1 мкмоль активного фермента в секунду (удельная активность) и 0,73 мМ (K_m); отсюда следует, что иммобилизация заметно изменяет каталитические свойства фермента. Оценка эффективного коэффициента диффузии АТЭЕ в этом катализаторе приводит к величине $3,8 \cdot 10^{-6}$ см²/с. Столь малое значение \mathcal{D}_{es} и высокая активность иммобилизованного фермента предполагают существенные диффузионные ограничения даже в слу-

чае катализатора с частицами радиусом 60 мкм. Определение модуля Φ этого катализатора дает величину 2,6.

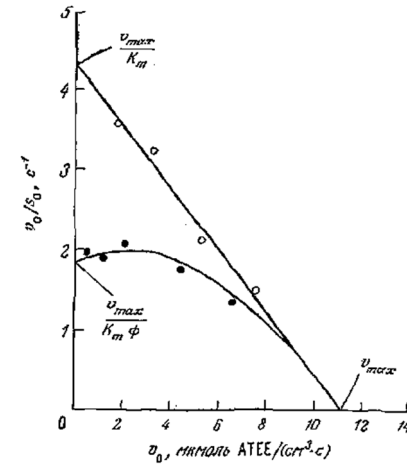


Рисунок 29 – Зависимость $\frac{v_0}{s_0}$ от v_0 для α -химотрипсина, иммобилизованного на больших ($R = 60$ мкм; \bullet) и маленьких ($R = 10$ мкм; \circ) гранулах активированной BrCN сефарозы 4В

При создании катализаторов на основе дорогих и высокоактивных металлов на носителях обычно стремятся локализовать сам катализатор в тонком наружном слое частиц носителя. Такой же подход применим и при разработке катализаторов на основе иммобилизованных ферментов: используя максимально допустимые для данного процесса размеры частиц носителя, можно обходиться минимальным количеством фермента. Существует несколько методов, пригодных для получения таких катализаторов. Было показано, что в катализаторах, полученных путем импрегнирования пористого носителя раствором фермента, распределение биокатализатора внутри частицы носителя может быть очень неравномерным. Из задачи 8 видно, что неравномерное распределение фермента влияет на кажущуюся активность и характер инактивации иммобилизованного фермента. В случае обратимой реакции минимальная концентрация субстрата внутри частицы катализатора равна его равновесной концентрации. Следовательно, при вычислении асимптотического коэффициента эффективности, например по уравнению (63), нижний предел интегрирования должен быть равен равновесному значению. Из-за различных коэффициентов диффузии разных веществ стехиометрические соотношения внутри части-

цы катализатора могут отличаться от стехиометрии такого же процесса в растворе. Это явление рассмотрено в задаче 9.

В системах, в которых скорость процесса определяется как диффузией, так и самой реакцией, пусть субстрат является ингибитором собственной реакции иммобилизованного фермента. Если внешняя концентрация субстрата s_0 превышает концентрацию субстрата, соответствующую максимальной скорости, то внутри частицы катализатора снижение концентрации субстрата вызовет увеличение локальной скорости реакции до значений, превышающих скорость реакции на внешней поверхности частицы. В этой ситуации при определенных условиях можно наблюдать коэффициенты эффективности, превышающие единицу. Такое поведение возможно для любой автокаталитической реакции, то есть такой системы, в которой скорость реакции возрастает.

Задача 6. Подбор биокатализатора для лимитируемого реакцией режима. Этиловый эфир ацетил-L-тирозина (АТЭЕ) гидролизуетея иммобилизованным α -химотрипсином с удельной объемной скоростью 18,4 мкмоль АТЭЕ в 1 см³ за 1 с. Найдено, что эффективный коэффициент диффузии АТЭЕ равен приблизительно $3,8 \cdot 10^{-6}$ см²/с. Биокатализатор с каким радиусом сфер надо выбрать для изучения кинетических свойств иммобилизованного фермента в лимитируемом реакцией режиме?

Задача 7. Обратимая изомеризация глюкозы в насадочной колонне. Промышленно важный процесс изомеризации глюкозы во фруктозу осуществляют в реакторе колонного типа с неподвижным слоем иммобилизованной глюкозоизомеразы; кинетика катализируемой этим ферментом реакции описывается уравнением Михаэлиса–Ментен для обратимых реакций [1].

А. Покажите, что подстановка $\bar{s} = s - s_e$ (s_e – равновесная концентрация) в указанное уравнение приводит к простому уравнению Михаэлиса–Ментен (относительно \bar{s}). Как в этом уравнении будут выражены кажущиеся константа Михаэлиса (K_m^{app}) и максимальная скорость (v_{max}^{app})?

Б. Изменение \bar{s} в зависимости от положения в одномерном неподвижном слое катализатора с пористостью ε и при средней скорости потока u_z может быть описано уравнением

$$\varepsilon u_z \left(\frac{d\bar{s}}{dz} \right) = - (1 - \varepsilon) v,$$

с одним краевым условием $\bar{s} = s_0 - s_e$ при $z = 0$.

Путем интегрирования этого выражения найдите другое уравнение, определяющее параметры работы реактора через объемную производительность (τ), определяемую как $\tau = L(1-\varepsilon)/\varepsilon u_z$ (частное от

деления объема реактора (катализатора) на объемную скорость потока).

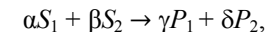
В. Рассмотрим медленно инактивирующийся иммобилизованный фермент, находящийся в реакторе с неподвижным слоем катализатора, описанным в части Б настоящей задачи. Если процесс инактивации подчиняется закону $e_{активн} = e(t=0)exp(-k_d t)$, найдите по измененным соответствующим образом данным предыдущей задачи функцию $f(s_0, v_{max}^{app}, s(L))$, график зависимости которой от времени t позволил бы определить как τ , так и k_d .

Задача 8. Иммобилизованный ферментный катализатор с неравномерным распределением фермента. Приняв, что катализируемая реакция имеет первый порядок, сравните общие скорости и коэффициенты эффективности, когда иммобилизованный в пористой пластине фермент, имеющий одно и то же число единиц ферментативной активности:

А. Распределен равномерно по всему объёму пластины.

Б. Сконцентрирован и равномерно распределен во внешнем слое пластины вблизи наружной поверхности катализатора, причем во внутренней области, толщина которой равна половине толщины пластины, фермент совершенно отсутствует.

Задача 9. Стехиометрия реакций внутри частицы катализатора. Внутри пористой частицы иммобилизованного фермента осуществляется катализируемая ферментом реакция



где α , β , γ и δ – стехиометрические коэффициенты.

А. Используя уравнения материального баланса для субстратов и продуктов реакции, найдите выражения, определяющие концентрации всех веществ внутри частицы катализатора через концентрацию S_1 (в той же точке частицы), концентрации на наружной поверхности частицы, а также эффективные коэффициенты диффузии субстратов и продуктов реакции.

Б. Покажите, что реагент, ограниченно растворимый в реакционной среде, будет лимитировать скорости реакций внутри частицы иммобилизованного фермента.

2.2.3 Одновременное сопротивление массопередаче в граничном слое и внутри частицы катализатора

В двух предыдущих разделах мы рассматривали особые случаи взаимного влияния массопередачи и биохимической реакции, схематически изображенные на рисунке 23. В общем случае, однако, субстрат должен сначала пройти через граничный слой или стоячую пленку,

а затем диффундировать в частицу катализатора, где и происходит его превращение. Одна из целей анализа этой наиболее общей ситуации будет заключаться в изыскании путей использования рассмотренных выше упрощенных моделей. Нужно знать, когда доминирует внутреннее сопротивление массопередаче, когда – внешнее сопротивление и когда нужно учитывать оба типа сопротивления.

Решение поставленных задач целесообразно начать с изучения простой модели иммобилизованного ферментного катализатора с геометрией пластины и кинетикой собственной реакции первого порядка. Тогда уравнение материального баланса для субстрата внутри частицы в стационарном состоянии можно записать как

$$\mathcal{D}_{es} \frac{d^2 s}{dx^2} - ks = 0 \quad (67)$$

с условием симметрии для средней линии

$$\left. \frac{ds}{dx} \right|_{x=0} = 0. \quad (68)$$

На внешней поверхности пластины ($x = L$) субстрат не аккумулируется. Транспорт через эту поверхность внутрь частицы катализатора путем диффузии равен транспорту в обратном направлении через граничный слой; следовательно, граничное условие выражается следующим уравнением

$$\mathcal{D}_{es} \left. \frac{ds}{dx} \right|_{x=L} = k_s [s(L) - s_0]. \quad (69)$$

Совместное решение уравнений (67)–(69) позволит определить коэффициент эффективности, который может быть записан

$$\eta_s = \frac{\text{tg } \phi}{\phi \left(1 + \frac{\phi \text{ tg } \phi}{\text{Bi}} \right)}. \quad (70)$$

В этом выражении модуль Тила ϕ имеет тот же физический смысл, что и ранее ((57) для геометрии пластины $\frac{V_p}{A_p} = L$). Здесь мы ввели новый важный параметр Bi – *число Био* и определяемый

$$\text{Bi} = \frac{k_s L}{\mathcal{D}_{es}} = \frac{\text{удельная скорость транспорта через граничный слой}}{\text{удельная скорость диффузии в частице катализатора}}. \quad (71)$$

Уравнение (70) удобнее преобразовать в другую форму

$$\frac{1}{\eta_s} = \frac{1}{\eta} + \frac{\phi^2}{\text{Bi}}, \quad (72)$$

где η ($\eta = \text{tg } \phi / \phi$) – коэффициент эффективности катализатора в отсутствие сопротивления транспорту в граничном слое. Величину, обрат-

ную коэффициенту эффективности, можно рассматривать как меру сопротивления превращению субстрата, обусловленного требованиями к транспорту последнего. Таким образом, уравнение (72) отражает известное правило, по которому общее сопротивление равно сумме отдельных сопротивлений.

Уравнение (72) позволяет ответить на вопрос, при каких условиях можно пренебречь одним из сопротивлений. Если

$$\frac{\eta\phi^2}{Bi} = \frac{\Phi}{Bi} = \frac{kL}{k_s} \ll 1, \quad (73)$$

то можно пренебречь сопротивлением внешнего граничного слоя. Если же $\frac{kL}{k_s} \gg 1$, то можно не принимать во внимание внутреннее сопротивление частицы катализатора. Во всех промежуточных случаях учитывают оба сопротивления. При больших значениях ϕ наблюдается обратная пропорциональная зависимость η_s от ϕ^2 . Альтернативный критерий, не требующий знания собственной константы скорости, основан на построении графиков зависимости η_s от Φ для различных Bi ; при $Bi \geq 100$ влияние внешнего сопротивления незначительно.

Оценка типов массопередачи, оказывающих большое влияние на скорость всего процесса, всегда базируется на сравнительном изучении собственной скорости реакции, диффузионных эффектов в частице катализатора и внешней массопередачи.

Задача 10. Одновременная оценка параметров кинетики реакции и массопередачи. Фермент иммобилизован на поверхности непористого твердого тела. Приняв, что внешним сопротивлением массопередаче нельзя пренебречь и что собственная кинетика ферментативной реакции описывается уравнением Михаэлиса–Ментен.

А. Найдите выражение, четко определяющее коэффициенты в координатах Лайнуивера – Бэрка; с помощью этого уравнения выразите кажущиеся максимальную скорость (v_{max}^{app}) и константу Михаэлиса (K_m^{app}) через реальные переменные v_{max} , K_m , k_s (коэффициент массопередачи).

Б. Покажите, как можно графическим путем определить параметры v_{max} , K_m , k_s , если имеются данные для достаточно большого диапазона концентраций субстратов.

2.2.4 Влияние ингибиторов, температуры и pH на каталитическую активность и инактивацию иммобилизованных ферментов

В литературе [1] были рассмотрены математические выражения, описывающие процессы инактивации ферментов и влияние различных

параметров (концентраций ингибиторов и активаторов, температуры, рН, ионной силы и т.д.) на ферментативную активность в растворах. В общем случае можно ожидать, что эти выражения будут пригодны и для описания зависимости собственной активности иммобилизованного фермента от различных параметров. В то же время, иммобилизация может сопровождаться изменением собственных свойств фермента. Так, иммобилизованные ферменты могут иметь другие константы скорости реакций; более того, иммобилизация может даже потребовать изменения формы уравнений, описывающих влияние параметров реакции на собственную активность фермента. Для определения отклика собственной каталитической активности иммобилизованного фермента на изменения параметров реакции необходимо тщательное изучение кинетики реакции с применением описанных в литературе [1] методов, позволяющих изучать только кинетическое поведение системы, а не сочетание скоростей массопередачи и каталитических реакций.

Процессы массопередачи могут оказывать влияние на взаимосвязь между кажущейся общей каталитической активностью иммобилизованного фермента и условиями среды. Все необходимые данные могут быть получены путем изучения кинетики реакций первого порядка. Прежде всего следует запомнить, что наблюдаемая общая кинетика реакций с участием иммобилизованного фермента, функционирующего в лимитируемом реакцией режиме, не отличается от собственной локальной кинетики этой ферментативной реакции. Следовательно, изучаемая в этом режиме реакция будет иметь первый порядок, а константа скорости процесса будет равна собственной константе скорости ферментативной реакции. В случае же иммобилизованного ферментного катализатора, функционирующего в лимитируемом диффузией режиме, кажущийся порядок реакции также будет первым, но кажущаяся константа скорости будет равна квадратному корню из собственной константы скорости ферментативной реакции (в общем случае если реакция протекает по n -му порядку, то кажущийся порядок этой реакции в лимитируемых диффузией условиях будет равен $(n + 1)/2$). Таким образом, кажущаяся энергия активации составит лишь половину истинной энергии активации. Точно так же и влияние изменения любых параметров реакции на наблюдаемую общую кинетику процесса будет меньшим, чем действительный эффект изменения этих же параметров на локальную, собственную кинетику ферментативной реакции. Например, если процессы инактивации, введение ингибитора или изменение рН уменьшают константу скорости собственно ферментативной реакции в 4 раза, то в лимитируемых диффузией условиях наблюдаемая общая скорость процесса уменьшится только в 2 раза. Из всего сказанного следует, что при изучении влияния пара-

метров реакции на кинетику катализируемых иммобилизованными ферментами реакций следует быть предельно внимательным. Если не соблюдены лимитируемые реакцией условия или если экспериментальные данные, полученные в условиях, когда диффузия вносит определенный вклад в течение процесса, не переработаны с целью получения сведений о собственной кинетике ферментативной реакции, то любые выводы о зависимости активности иммобилизованного фермента от условий процесса будут иметь ценность только для данной партии катализатора, только в данных условиях реакции и никоим образом не будут описывать собственное поведение иммобилизованного фермента. В таком случае любые изменения скорости потока раствора субстрата через слой катализатора, размера его частиц, структуры пор, содержания или распределения фермента в частице катализатора будут сопровождаться изменениями найденных ранее зависимостей активности катализатора от параметров процесса. Это подчеркивает важность и необходимость четкого разграничения собственных свойств иммобилизованного фермента от тех его характеристик, которые обусловлены эффектами массопередачи.

Поскольку в большинстве случаев иммобилизованные ферменты функционируют в условиях, когда диффузионные эффекты в заметной степени влияют на скорость процесса или даже определяют ее, то многие имеющиеся в литературе экспериментальные данные по определению скоростей инактивации и влияния pH и температуры на кинетику реакций, очевидно, не описывают собственные свойства иммобилизованных ферментов.

В то же время имеется множество фактов, свидетельствующих об изменении собственной кинетики инактивации ферментов после их иммобилизации. Предлагались и постулировались различные механизмы и интерпретации этого явления; некоторые из гипотез выдержали экспериментальную проверку.

Во-первых, вследствие иммобилизации ферменты удерживаются в относительно фиксированном в пространстве положении, что уменьшает вероятность таких взаимодействий между молекулами фермента, которые способствуют их инактивации за счет агрегации или автолиза (в случае протеолитических ферментов).

Во-вторых, наличие нескольких связей молекулы фермента с носителем затрудняет нарушение третичной структуры белка. Известно, что попытки создать комплементарную поверхности фермента микроструктуру носителя путем включения фермента в гель сопровождались резким повышением его стабильности. Аналогично иммобилизация стабилизирует активную форму ферментов, состоящих из нескольких

субъединиц, и тем самым может замедлять инактивацию, обусловленную диссоциацией олигомерных белков.

Повышенная устойчивость иммобилизованных ферментов может быть также обусловлена благоприятным местным окружением, в меньшей степени инактивирующим белок, чем окружение в растворе. В качестве примеров можно привести носители, поверхности которых обладают буферными свойствами, или снижают местную концентрацию кислорода, или адсорбируют ферментные яды, или катализируют превращение денатурирующих веществ (например, H_2O_2) в безвредные соединения. Вероятно, на стабилизацию иммобилизованных ферментов могут оказывать влияние и другие факторы.

Задача 11. Гистерезис; влияние pH на иммобилизованный папаин. Изучение pH-электрода, на поверхность которого нанесен папаин, показывает, что зависимость генерируемого на поверхности электрода pH (внутреннего pH) от pH в растворе при различных направлениях изменения pH выражается разными кривыми. В данном случае изучалась реакция гидролиза этилового эфира бензоиларгинина (BAEE) до соответствующей кислоты.

А. Приняв, что $s_0 \gg K_m$, слой фермента очень тонок и активность папаина максимальна при pH 6,0, покажите, что это явление может быть обусловлено внешним сопротивлением массопередаче.

Б. Кинетические константы этой реакции, катализируемой растворимым ферментом, при pH 6,0 и 20 °C равны: $k_2 = 19$ ME (1 международная единица (ME) равна количеству микромолей BAEE, гидролизуемых 1 мг фермента в 1 мин), $K_1 = 5 \cdot 10^{-3}$ М. Найдите величину коэффициента массопередачи иона водорода и соответствующее указанным константам значение pK_2 фермента, если на поверхность электрода нанесено α мг/см² фермента и активность иммобилизованного фермента составляет только 6 % активности фермента в растворе. Во всех случаях $s \gg K_m$.

В. По найденной величине pK_2 и приведенным в предыдущей части задачи параметрам вычислите коэффициенты эффективности при различных внешних pH; постройте график зависимости коэффициента эффективности от внешнего pH. Иногда коэффициент должен превышать единицу, а при некоторых pH задача должна иметь несколько решений.

Задача 12. Кинетика реакций иммобилизованных ферментов с разделением зарядов. Концентрацию заряженного вещества (субстрата, ингибитора) на заряженной матрице, например на ферментной мембране, можно выразить следующим уравнением

$$[C^+]_{\text{мембрана}} = [C^+]_{\text{раствор}} \cdot e^{ze\psi/RT},$$

где z – ионный заряд субстрата или ингибитора; e – заряд электрона; ψ – электростатический потенциал мембраны ($\psi_{\text{раствор}} = 0$). Покажите, что кажущиеся величины K_S и K_I определяются выражением

$$K^{app} = K_{\text{ист}} \cdot e^{ze\psi/RT},$$

если рассматривать концентрации в объеме всего раствора. Допуская, что в мембране имеются e , e^- , e^{2-} (e^- – активная форма фермента), покажите, что максимальная начальная скорость реакции (если пренебречь влиянием массопередачи) достигается в случае матрицы-носителя фермента с ψ , определяемым уравнением

$$1 + \frac{h_0}{K_1\alpha} + \frac{K_2\alpha}{h_0} = \left(\alpha + \frac{s_0}{K_S} \right) \left(\frac{K_2}{h_0} - \frac{h_0}{K_2\alpha^2} \right),$$

где $\alpha = e^{ze\psi/RT}$ и $h_0 = [H^+]$ в основной массе раствора.

Задача 13. Микрокапсулирование; β -галактозидаза. Гидролиз лактозы β -галактозидазой ингибируется продуктом реакции, и поэтому уравнение, выражающее скорость этой реакции, имеет форму

$$v = \frac{v_{max}s}{K_m \left(1 + \frac{p}{K_i} \right) + s}.$$

С целью облегчения процесса выделения β -галактозидазы из молока раствор фермента заключен в микрокапсулы из нитроцеллюлозы диаметром около 30 мкм.

А. Постройте график в координатах Лайнуивера–Бэрка для $p = 0$; 0,5; 1,5; 5,0 и 10,0 мМ ($e_0 = 75$ мг в 100 мл) при условии, что $v_{max} = k_p e_0$, $k_p = 0,57$ мкмоль/(мг·мин) $K_m = 0,54$ мМ, $K_i = 1,5$ мМ.

Б. На основе графика части А задачи, не привлекая приведенное в условии уравнение, постройте графики зависимости $1/v$ от $1/s$ для периодического процесса при следующих начальных условиях

s_0 , мМ	0,5	5,0	10,0	5,0
p_0 , мМ	0	0	0	5,0

В. Покажите, что даже при максимально возможной скорости реакции в микрокапсуле в системе, описанной в части А, скорость процесса лимитируется реакцией, то есть диффузия субстрата и продукта реакции осуществляются быстрее, чем сама реакция.

Задача 14. Мембранный биореактор. Фермент удерживается в проточном биореакторе полупроницаемой мембраной. Активный фермент инактивируется в ходе реакции первого порядка с константой скорости k_d . Постоянство состава продуктов реакции обеспечивают путем постепенного введения активного фермента в реактор, чтобы концентрация активного фермента в нем была постоянной, равной e_a . На мембране концентрируется гелеобразный слой фермента, увеличи-

вающий сопротивление потоку раствора, поэтому с целью обеспечения постоянной скорости потока J реакционной смеси через мембрану приходится непрерывно регулировать падение давления на мембране.

В то же время необходимая скорость потока J может быть достигнута только в том случае, если общая концентрация фермента e_{tot} (сумма активной и неактивной форм) не превышает некоторое максимально допустимое значение, определяемое уравнением

$$e_{max} = e_s \exp(J/k_e),$$

где e_s – концентрация насыщения фермента и k_e – коэффициент массопередачи фермента.

А. Определите зависимость общей концентрации фермента в реакторе от времени.

Б. Если скорость потока падает ниже J , то процесс следует остановить, а реактор подвергнуть чистке. Определите максимальное время непрерывной работы реактора t_{max} как функцию J .

В. Найдите значение J , позволяющее получить максимальное количество продукта реакции за период непрерывной работы реактора ($0 \leq t \leq t_{max}$) при $e_0 = 5$ кг/м³, $e_s = 100$ кг/м³, $k_e = 0,017$ мм/с, $k_d = 0,018$ сут⁻¹.

Г. Решите задачу В при $e_0 = 50$ кг/м³ (все другие параметры не изменяются).

Д. Как влияет константа скорости инактивации k_d на величину J , определяемую по условиям задачи «В»? На какие другие важные с экономической точки зрения параметры влияет k_d ?

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Ламберова, М.Э. Ферментативная кинетика / М.Э. Ламберова; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. Ч. 1 – 77 с.
2. Грачева, И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева, А.Ю. Кривова. – М.: Изд. «Элевар», 2000. – 512 с.
3. Лаптев, С.В. Микробиология / С.В. Лаптев, Н.И. Мезенцева, Е.П. Каменская, М.Э. Ламберова; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2012. – 319 с.
4. Ламберова, М.Э. Моделирование биотехнологических процессов / М.Э. Ламберова, Е.А. Скиба; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2011. – 114 с.

Дополнительная

5. Бейли, Дж. Основы биохимической инженерии / Дж. Бейли, Д. Оллис. – М.: Мир, 1989. – т. 1. – 562 с.
6. Кантере, В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств / В.М. Кантере. – М.: Агропромиздат, 1990. – 271 с.

Учебное издание

Ламберова Марина Эдуардовна

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

В двух частях

Часть 2

Учебное пособие

Редактор Глядищева Е.Е.

Технический редактор Богомолова О.А.

Подписано в печать 11.12.13. Формат 60×84, 1/16

Усл. п. л. – 5,81. Уч.-изд. л. – 6,25

Печать – ризография,

множительно-копировальный аппарат «RISO EZ300»

Тираж 65 экз. Заказ 2013-96

Издательство Алтайского государственного

технического университета

656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46

Оригинал-макет подготовлен ИИО БТИ АлтГТУ

Отпечатано на ИИО БТИ АлтГТУ

659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27