

УДК 577.15.04.002.237

## ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

*А. И. Кёстнер*

В обзоре рассматриваются методы связывания ферментов с нерастворимыми носителями с целью получения гетерогенных ферментных катализаторов. Такого рода препараты получаются адсорбцией, ковалентным связыванием и включением в структуру геля. Иммобилизация изменяет кинетические характеристики ферментов, но эти изменения, нередко кажущегося характера, связаны с изменениями не в свойствах молекул самих ферментов, а их микроокружения. Иммобилизованные ферменты обладают повышенной стабильностью и могут применяться в технологических процессах, в биохимических анализы и в медицине.

Библиография — 506 наименований.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1480
II. Методы иммобилизации ферментов	1481
III. Влияние иммобилизации на свойства ферментов	1492
IV. Применение иммобилизованных ферментов	1499

## I. ВВЕДЕНИЕ

Искусственные нерастворимые производные ферментов вызывают к себе все возрастающий интерес химиков, биохимиков, технологов и медиков. Эти препараты, которые, согласно рекомендациям международного симпозиума<sup>6</sup>, следует называть иммобилизованными ферментами, рекомендуются для применения в технологических процессах, в аналитической химии и в медицине. Иммобилизованные ферменты, в частности в форме мембран, могут служить моделями субклеточных структур. Перспективы прикладного использования иммобилизованных ферментов и определенные удобства при проведении теоретических исследований отражены уже в сотнях статей и патентов. Кроме того, данная проблема рассматривается в десятках литературных обзоров. Не считая обзоров популярного или рекламного характера, а также малодоступных публикаций, мы можем сослаться на ряд весьма серьезных и обстоятельных работ<sup>2-20</sup>.

Иммобилизация ферментов является частью более широкой проблемы целенаправленной модификации биологически активных веществ. В данном обзоре в основном рассматриваются иммобилизованные ферменты и растворимые комплексы ферментов с полимерами. Иммобилизация же ингибиторов ферментов, антител, антигенов, нуклеиновых кислот, гормонов и прочих биологически активных веществ, а также химическая модификация ферментов низкомолекулярными веществами — опускаются. При этом следует подчеркнуть, что иммобилизация различных биологически активных веществ, способных к специальному комплексообразованию с биополимерами стала основой для создания новой весьма эффективной методики разделения и очистки белков и других биологических важных веществ аффинной хроматографии (хроматографии на основе специфической сорбции). Этот метод

развивается в последние годы особенно быстро, и о нем опубликован ряд подробных обзоров<sup>21-28</sup>.

Способность ферментов действовать, находясь в составе клеточных мембран, известна уже со времени становления энзимологии как науки. Можно полагать, что в клетках большинство ферментов действуют в нерастворимой форме, и общее их количество, включенное в мембранные структуры, превосходит то, которое присутствует в растворенной форме в протоплазме.

Мак-Ларен<sup>11</sup> для иллюстрации давности применения гетерогенного ферментативного катализа приводит пример использования уже в прошлом столетии колонок, наполненных землей, для исследования нитрификации. С другой стороны, хорошие выходы ферментативной активности при адсорбционной хроматографии доказывали, что связывание ферментов с нерастворимыми материалами может протекать без необратимой инактивации. Однако об иммобилизации ферментов мы можем говорить только с тех пор, как было доказано специфическое каталитическое действие целенаправленно полученных нерастворимых конъюгатов ферментов с носителем. Первые данные такого рода были опубликованы в первой половине нашего столетия Нельсоном<sup>29, 30</sup> и Лэнгмюром<sup>31, 32</sup>. Недостаточная прочность адсорбционных ферментных комплексов ограничивала их применение, и широкое исследование иммобилизованных ферментов началось только с 50-х годов, когда, наряду с адсорбцией, стали применять ковалентное связывание ферментов и включение биологических макромолекул в трехмерную структуру различных гелей. Помимо молекулярной иммобилизации (иммобилизации каждой молекулы) к настоящему времени разработаны также способы удерживания растворенных ферментов в микрокапсулах из полупроницаемых мембран, в полых волокнах, а также в крупномасштабных реакторах, снабженных мембранными для ультрафильтрации.

Сейчас известно много способов иммобилизации, получены сотни нерастворимых производных ферментов и показана возможность их многократного и продолжительного использования. Разработаны технологические процессы, методики анализа и некоторые терапевтические процедуры, основанные на применении иммобилизованных ферментов. Значение иммобилизованных ферментов в биохимизации технологических процессов подчеркивается в специальном постановлении Президиума Академии наук СССР<sup>33</sup>.

На настоящее время имеется свыше 1000 публикаций и свыше 200 патентов, касающихся иммобилизованных ферментов. Привести все эти ссылки в данном обзоре оказалось по понятным причинам невозможным, поэтому литература цитирована выборочно. Так как полные описания патентов сравнительно малодоступны и запатентованные результаты нередко публикуются впоследствии в открытой печати, в первую очередь сокращено число ссылок на патентные материалы. Тем не менее отказ от исчерпывающей библиографии не помешает читателю получить достаточно общее представление о состоянии рассматриваемой проблемы.

## II. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

### 1. Принципы иммобилизации

Методы иммобилизации биологически активных веществ можно разделить на две основные группы: молекулярную иммобилизацию, когда каждая молекула иммобилизируемого вещества связана с носителем отдельно, и иммобилизацию в растворе, когда большие или мельчайшие

объемы раствора фермента отделены от внешней среды полупроницаемой мембраной. Молекулярная иммобилизация, в свою очередь, осуществляется тремя путями, различающимися между собой природой связей, удерживающих иммобилизуемые молекулы на носителе. Эти связи могут быть адсорбционными, ковалентными или являться результатом механического удерживания молекул фермента трехмерной сеткой цепей макромолекул полимерного носителя. Возможны также методы, в которых комбинируются некоторые из вышенназванных принципов связывания.

## 2. Иммобилизация ферментов адсорбцией

Для иммобилизации ферментов путем адсорбции используются аниониты, катиониты и «нейтральные» адсорбенты, которые не являются четко выраженным ионитами.

Из нейтральных носителей чаще всего применяется двуокись кремния в виде силикагеля или стекла. На этих материалах иммобилизованы глюкозооксидаза<sup>34, 35</sup>, цитохром *c*<sup>36, 38</sup>, малатдегидрогеназа<sup>39</sup>, сукцинатдегидрогеназа<sup>40-42</sup>, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа<sup>43</sup>, каталаза<sup>40-42</sup>, гексокиназа<sup>40-42, 44, 45</sup>, амилоглюкозидаза<sup>34</sup>, трипсин<sup>46, 47</sup>, химотрипсин<sup>46</sup>, папаин<sup>35, 48</sup>, щелочная протеиназа<sup>49</sup>, кислая фосфатаза<sup>40-42, 50</sup>, РНКаза<sup>46, 51, 52</sup>, аминоацилаза<sup>53</sup>, фосфоглюкомутаза<sup>40-42</sup>. При этом интересно отметить работы группы Полторака<sup>54, 55</sup>, в которых ферменты адсорбированы на силикагеле посредством липидного промежуточного слоя. Таким путем было достигнуто даже повышение активности некоторых ферментов в десятки раз, что представляет собой весьма редкое явление при иммобилизации ферментов<sup>40-42</sup>. Результаты этих работ подыскиваются и обсуждаются в обзорах тех же авторов.

Подходящим материалом для получения активных адсорбентов являются различные глины. На таких носителях получены иммобилизованные глюкозооксидаза<sup>58, 57</sup>, каталаза<sup>58</sup>, глюкоамилаза<sup>58, 59</sup>, лизоцим<sup>60</sup>, инвертаза<sup>58</sup>, нейраминидаза<sup>56</sup>, трипсин<sup>61</sup>, химотрипсин<sup>61-63</sup>, щелочная протеаза<sup>49</sup>, бактериальная протеаза<sup>64</sup>, фосфатаза<sup>65, 66</sup>, уреаза<sup>67-69</sup>, пенициллинамида<sup>70</sup>. На прочих минеральных носителях иммобилизованы: НАД-пирофосфорилаза<sup>71</sup>, инвертаза<sup>30</sup>, пролиниминопептидаза<sup>72</sup>, щелочная протеаза<sup>69</sup>, лейцинаминопептидаза<sup>73</sup>, аминоацилаза<sup>53, 74</sup> и пенициллинамида<sup>75</sup>.

Активированный уголь применялся в качестве носителя для глюкозооксидазы<sup>34</sup>, сукцинатдегидрогеназы<sup>40</sup>, инвертазы<sup>29, 30</sup>, глюкоамилазы<sup>34, 58, 59, 76</sup>, каталазы<sup>41, 42, 77</sup>, щелочной фосфатазы<sup>78</sup>, кислой фосфатазы<sup>42, 77</sup>, гексокиназы<sup>42, 77</sup> и фосфоглюкомутазы<sup>42, 77</sup>. На целлюлозе адсорбированы: пероксидаза<sup>79</sup>, целлюлаза<sup>80</sup>, ДНКаза<sup>81</sup>; на нитроцеллюлозе иммобилизованы глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа<sup>82</sup> и АТФаза<sup>83</sup>. Для получения материала с РНК-сингетазной активностью использовали адсорбированные на нитроцеллюлозе клетки печени<sup>84</sup>. Эффективность адсорбции амилазы на фильтрах типа «Миллипор» можно повысить предварительным ацилированием фермента жирными кислотами<sup>85, 86</sup>. Глицериндегидрогеназа адсорбирована на декстрановом геле — сефадексе<sup>87</sup>.

Гораздо чаще, чем нейтральные носители, для иммобилизации ферментов применяются иониты. На ДЭАЭ- и ТЭАЭ-целлюлозах получены нерастворимые производные каталазы<sup>88</sup>, инвертазы<sup>89</sup>, глюкоамилазы<sup>90, 91</sup>, аминоацилазы<sup>53, 74, 92-95</sup>,  $\beta$ -галактозидазы<sup>96</sup>, пепсина<sup>95</sup>, протеиназы из почек<sup>95</sup>, аспарагиназы<sup>97</sup>, АТФ-дезаминазы<sup>98</sup>, глюкозоизомеразы<sup>99</sup> и *D*-оксиглюкозидазы<sup>100</sup>. Адсорбцией аминоацилазы на ДЭАЭ-сефадексе получена ферментная колонна для первой промышленной установки с нерастворимым ферментом<sup>53, 74, 101, 102</sup>. Тем же методом

иммобилизована декстронсахараза<sup>103</sup>. На синтетических полимерных анионитах были связаны: каталаза<sup>104</sup>, глюкозооксидаза<sup>34</sup>, глюкоамилаза<sup>34, 105</sup>, РНКаза<sup>51, 52</sup>, аминоацилаза<sup>53</sup> и пенициллинамида<sup>106</sup>.

Из катионитов для иммобилизации ферментов чаще всего применяются карбоксилсодержащие носители. На КМ-целлюзах иммобилизованы: каталаза<sup>88</sup>, пероксидаза<sup>107</sup>, аспарагиназа<sup>108</sup> и фосфомоноглутаматаза<sup>109</sup>; на КМ-сепадексе — глюкозооксидаза и глюкоамилаза<sup>34</sup>, а также аминоацилаза<sup>74</sup>. На полимерных карбоксильных катионитах иммобилизованы глюкозооксидаза<sup>34</sup>, глюкоамилаза<sup>34</sup>, РНКаза<sup>51, 52, 110</sup> и трипсин<sup>111</sup>. Из специальных карбоксильных носителей можно назвать сополимер аланина и глутаминовой кислоты, а также полигалактуроновую кислоту для иммобилизации ацетилхолинэстеразы<sup>112</sup>, и сукцинированное стекло для связывания лактатдегидрогеназы<sup>113</sup>. На сульфокатионитах иммобилизованы аминоацилаза<sup>74</sup> и РНКаза<sup>114</sup>.

Кроме нерастворимых ионитов при модификации ферментов применяются растворимые полиэлектролиты. Получаемые при этом растворимые полимер — ферментные комплексы также обладают повышенной стабильностью<sup>115—118</sup>.

### 3. Включение ферментов в гелевые структуры

При значительном различии в размерах фермента и его субстрата можно выбрать гель такой структуры, размеры пор которой достаточны для диффузии субстрата, но полностью исключают диффузию больших молекул фермента. Такой принцип обеспечивает необратимое связывание фермента с сохранением нативности. В этом методе иммобилизации до сих пор использовали ограниченное число гелеобразующих веществ. В гель кремневой кислоты включали трипсин<sup>119</sup> и ацетилхолинэстеразу<sup>120</sup>. Запатентован<sup>121, 122</sup> также способ получения включенных в кремневый гель холинэстеразы, щелочной фосфатазы, трипсина, липоксидазы, уреазы, каталазы и простагландинсинтетазы. В оксиметилцеллюзу включали аминоацилазу<sup>53</sup>, в агар — ацилазу<sup>123</sup> и холинэстеразу<sup>124</sup>, в крахмал — холинэстеразу<sup>124—126</sup> и уреазу<sup>127</sup>, в кремний-органический материал «Силастик» — трипсин<sup>128</sup>, химотрипсин<sup>128</sup>, ацетилхолинэстеразу<sup>129</sup> и комплекс глюкозооксидазы с пероксидазой<sup>129</sup>, и в полиуретан — пенициллинамида<sup>53</sup>. Своеобразным способом получения такого типа комплексов является электроосаждение коллагеновых волокон в растворе фермента. Так были иммобилизованы уреаза<sup>127, 130</sup>,  $\alpha$ -амилаза<sup>131</sup>, амилоглюкозидаза<sup>132</sup> и инвертаза<sup>132</sup>.

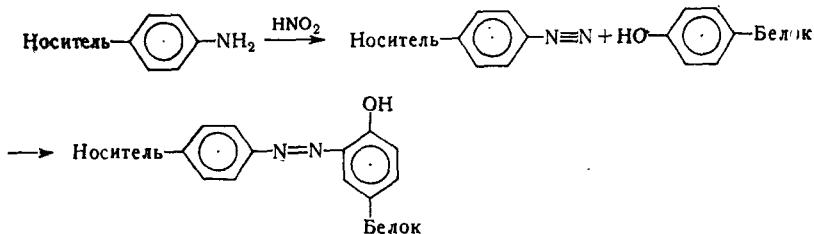
Самым распространенным носителем для получения ферментов, включенных в гель, является поперечношитый полиакриламид. Акриламид и N,N-метилен-бис-акриламид в различных соотношениях легко полимеризуются по свободнорадикальному механизму. В качестве источника необходимых свободных радикалов чаще всего используется фотохимическая или окислительно-восстановительная реакция, иногда применяется ионизирующая радиация<sup>133, 134</sup>. Путем захвата в полиакриламидный гель иммобилизованы глюкозооксидаза<sup>135—139</sup>, оксидаза L-аминокислот<sup>140—142</sup>, оксидаза D-аминокислот<sup>143—147</sup>, ксантинооксидаза<sup>143</sup>, алкогольдегидрогеназа<sup>143, 144</sup>, лактатдегидрогеназа<sup>137, 143, 144</sup>, каталаза<sup>137, 144</sup>, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа<sup>145, 146</sup>, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа<sup>143</sup>, пероксидаза<sup>148</sup>, гексокиназа<sup>146, 149</sup>, фосфофруктокиназа<sup>149</sup>,  $\alpha$ -амилаза<sup>150</sup>,  $\beta$ -амилаза<sup>150</sup>, глюкоамилаза<sup>151, 152</sup>, инвертаза<sup>153—155</sup>,  $\beta$ -глюкозидаза<sup>156, 157</sup>,  $\beta$ -галактозидаза<sup>158</sup>, трипсин<sup>133, 134, 150, 158, 159</sup>, химотрипсин<sup>150</sup>, папаин<sup>150</sup>, уреаза<sup>128, 142, 160, 161</sup>, аспарагиназа<sup>147</sup>, холинэстераза<sup>126, 162</sup>, аминоацилаза<sup>53, 163</sup>, фосфатазы<sup>164, 165</sup>, АТФ-ди-

фосфогидролаза<sup>166</sup>, РНКаза<sup>150</sup>, альдолаза<sup>149, 150, 187, 183</sup>, энолаза<sup>187-189</sup>, декарбоксилаза<sup>143, 159</sup>, аспартаза<sup>170</sup>, фосфоглицератмутаза<sup>167, 168, 171</sup>, глюкоизомераза<sup>172</sup>, фосфоглюкоизомераза<sup>149</sup>, цитратсинтетаза<sup>173</sup>, роданаза<sup>174</sup>, инъектаза<sup>174</sup>. Наряду с полиакриламидом применяются, но значительно реже, другие поликарильные гели, например оксиэтилметакрилат был использован для фиксации глюкозооксидазы<sup>175</sup>. Весьма длинный список полученных препаратов свидетельствует об универсальности этого метода. Кроме отдельных ферментов в полиакриламидном геле успешно были иммобилизованы ферментные комплексы<sup>143, 146, 149, 176-178</sup> и целые клетки микроорганизмов<sup>169, 179, 180</sup>.

#### 4. Ковалентное связывание ферментов

Часто ковалентную иммобилизацию рассматривают отдельно для случая, когда новые ковалентные связи образуются между активированными группами носителя и реакционноспособными группами боковых цепей белка, и для случая, когда белок сшивается бифункциональным реагентом в нерастворимый «суперполимер» в порах или на поверхности малореактивного носителя или совсем без такового. Разница в этих способах исчезает, когда носитель содержит те же реакционноспособные группы, что и белок, а иммобилизацию проводят при помощи бифункционального реагента. В таких случаях могут иметь место одновременно и ковалентное связывание белковой молекулы с носителем, и иммобилизация, вследствие образования суперполимера. В данном обзоре все эти случаи рассматривают как один единый метод ковалентной иммобилизации. «Суперполимеризацию» фермента относят к иммобилизации без носителя, хотя при этом носителем можно считать образующийся нерастворимый межмолекулярно сшитый фермент.

Одним из первых был предложен метод ковалентного связывания белков при помощи реакции диазосочетания, в первую очередь с остатками тирозина молекулы белка.

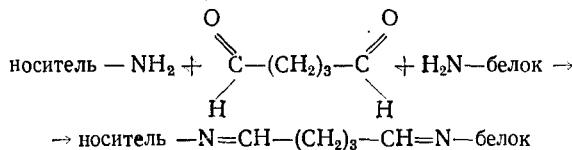


В этом методе применялись также бифункциональные реагенты, в первую очередь, 2,2'-дисульфо-бис-диазобензидин. Таким способом были иммобилизованы без носителя: папаин<sup>181</sup>, на целлюлозных носителях: глюкозооксидаза<sup>182, 183</sup>, трипсин<sup>182</sup>, химотрипсин<sup>182</sup>, папаин<sup>184, 185</sup>, апираза<sup>83</sup>, АТФаза<sup>83</sup>, карбоангидраза<sup>182, 183</sup>; на коллагене — папаин<sup>181</sup>. Чаще применяют связывание ферментов с предварительно диазотированным носителем. Так, например, на стекле, после его обработки  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисиланом и *n*-нитробензоилхлоридом, восстановления и диазотирования, были укреплены глюкозооксидаза<sup>186</sup>, пероксидаза<sup>186</sup>, оксидаза *L*-аминокислот<sup>187</sup>, инвертаза<sup>188</sup>, трипсин<sup>188, 189</sup>, папаин<sup>189</sup>, фицин<sup>186</sup>, проназа<sup>190</sup>, щелочная фосфатаза<sup>186, 191, 192</sup>, уреаза<sup>188, 193</sup>, ацетилхолин-эстераза<sup>194</sup>, аминоацилаза<sup>52</sup>, арилсульфатаза<sup>195</sup>, стероидэстераза<sup>196</sup>, и глюкоизомераза<sup>197</sup>. Тем же способом осуществлена иммобилизация кофермента НАД<sup>198, 199</sup>. Носители, которые уже содержат бензольные

ядра, только нитруют и восстанавливают. Таким образом, на полистироле иммобилизованы глюкозооксидаза<sup>200</sup>, каталаза<sup>201, 202</sup>, липаза<sup>201</sup>,  $\alpha$ -амилаза<sup>203, 204</sup>, пепсин<sup>204</sup>, РНКаза<sup>204</sup>, карбоксипептидаза<sup>204</sup> и аминоацилаза<sup>205</sup>, а на сополимерах *n*-амино-*D,L*-фенилаланина с алифатическими аминокислотами — трипсин<sup>206, 207</sup>, химотрипсин<sup>207</sup>, папаин<sup>181, 207</sup>, тромбин<sup>208</sup>, протромбин<sup>206, 208</sup>, проназа<sup>107, 209</sup>, уреаза<sup>207, 210</sup>, плазминоген<sup>211</sup>. По этому же способу проведено связывание политиорозильных производных ферментов — трипсина<sup>212–214</sup> и папаина<sup>215</sup>. Политиорозильные производные, которые содержат больше атакуемых диазосоединениями фенольных групп получаются обработкой фермента N-карбокси-*L*-тироzinангидридом. К диазотированной *n*-аминобензилцеллюзой привязаны: инвертаза<sup>188</sup>, различные амилазы<sup>216, 217</sup>, пуллуланаза<sup>218</sup>, декстраназа<sup>218</sup>,  $\beta$ -глюкозидаза<sup>216</sup>, химотрипсин<sup>219</sup>, трипсин<sup>216</sup>, тромбин<sup>220</sup>, фицин<sup>219</sup>, папаин<sup>218</sup>, карбоксипептидаза<sup>218</sup>, аминоацилаза<sup>53, 205</sup> и РНКаза<sup>219</sup>. Ароматические аминогруппы содержатся в полиакрильной смоле «Энзакрил АА», которая выпускается специально для иммобилизации ферментов<sup>221</sup>. С диазотированным «Энзакрилом АА» было проведено связывание амилазы<sup>222, 223</sup>, катепсина<sup>224</sup>, аминоацилазы<sup>53</sup> и аденоциндезаминазы<sup>225, 226</sup>. Следует упомянуть также иммобилизацию ферментов на диазотированных антракрилатах полисахаридов<sup>227, 228</sup>.

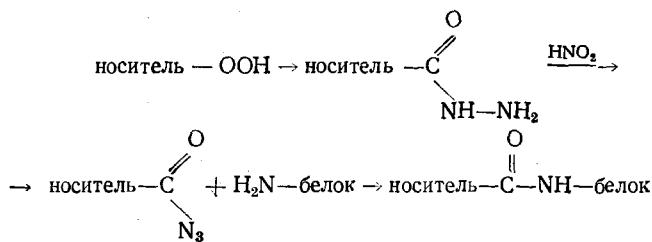
Большинство способов ковалентной иммобилизации ферментов основано на реакции нуклеофильных группировок белков, в частности, их первичных аминогрупп с электрофильными группами активированного носителя или бифункционального реагента.

В первую очередь рассмотрим реакцию аминогрупп с альдегидами:



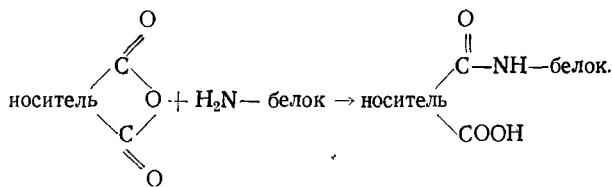
Чаще всего в этой реакции используются диальдегиды, главным образом глутаровый альдегид. При помощи этого бифункционального реагента иммобилизованы без носителя: каталаза<sup>229–232</sup>, глюкозооксидаза<sup>232</sup>, пероксидаза<sup>232</sup>, трипсин<sup>232–234</sup>, химотрипсин<sup>233, 235, 238</sup>, папаин<sup>237–241</sup>, карбоксипептидаза<sup>242–244</sup>, лизоцим<sup>127, 232, 236</sup>, субтилизин<sup>243</sup>, уреаза<sup>230</sup>, аспарагиназа<sup>230</sup>, РНКаза<sup>232</sup>, аминоацилаза<sup>53</sup> и некоторые зимогены<sup>128, 234, 236</sup>. Сшивкой глутаральдегидом белка, сорбированного на нейтральном носителе, иммобилизованы следующие ферменты: на целлюлозе — глюкозооксидаза, уратоксидаза, трипсин, химотрипсин, уреаза, карбоангидраза<sup>246</sup> и аденилатцилаза<sup>247</sup>, на силикагеле — трипсин<sup>248</sup>. Чаще ферменты сшивают глутаральдегидом с носителем, содержащим аминогруппы. Этим способом к аминоэтилцеллюлозе пришиты трипсин<sup>234, 249, 250</sup>, пепсин<sup>251</sup>, реннин<sup>252</sup> и альдолаза<sup>253</sup>, к частично гидролизованному полиамиду — алкогольдегидрогеназа<sup>217</sup>, лактатдегидрогеназа<sup>217</sup>, глюкозооксидаза<sup>254</sup>, уратоксидаза<sup>255</sup>, уреаза<sup>254, 255</sup>, *L*-аспартогидрогеназа<sup>256, 257</sup>, к поликариламиду — пероксидаза<sup>258</sup>, глюкозооксидаза<sup>259</sup>, цитохром<sup>258, 259</sup>, трипсин<sup>258, 259</sup>, химотрипсин<sup>258</sup>, кислая фосфатаза<sup>259</sup> и РНКаза<sup>250</sup>; к аминополистиролу — аденилатцилаза<sup>247</sup>. Значительно реже используются альдегиды содержащие носители, например для связывания трипсина<sup>260</sup>, папаина<sup>260</sup>,  $\alpha$ -амилазы<sup>260, 261</sup> и декстраназы<sup>260, 261</sup> применяли поликаролеиламиноацетальдегид-диметилацеталь, а для связывания инвертазы<sup>262</sup> — сополимер акролеина и стирола.

Широко применяется для иммобилизации ферментов реакция азидов кислот с аминогруппами белка:



Из-за плохой растворимости в воде диазиды редко употребляются в качестве бифункциональных реагентов. Предпочитают превращать в азиды карбоксильные группы гидрофильного носителя. Чаще всего при этом исходят из карбоксиметилцеллюлозы. Этим методом получены нерастворимые производные каталазы<sup>263</sup>, химотрипсина<sup>219, 264-269</sup>, трипсина<sup>269</sup>, фицина<sup>219, 270</sup>, бромелайна<sup>56</sup>, проназы<sup>271</sup>, РНКазы<sup>219, 272</sup>, АТФазы<sup>83</sup>, щелочной фосфатазы<sup>273</sup>, апиразы<sup>83, 274</sup>, аминоацилазы<sup>53</sup>, пенициллинамидазы<sup>275</sup>, аспарагиназы<sup>276</sup> стрептокиназы<sup>277</sup>, аденилаткиназы<sup>247</sup> и различных амилаз<sup>203, 278, 279</sup>. Другой распространенный носитель этого типа — полиакрилгидразид, известный также под фирменным названием «Энзакрил АН»<sup>221</sup>. На этом носителе укреплены: глюкозооксидаза<sup>280</sup>, люцифераза<sup>281</sup>,  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы<sup>272, 282</sup>, трипсин<sup>283-286</sup>, химотрипсин<sup>286</sup>, аминоацилаза<sup>285, 286</sup> и РНКаза<sup>287</sup>. Другие носители сравнительно редко использовались в азидном методе иммобилизации: карбоксиметилдекстран — для получения нерастворимых ацетилхолинэстеразы<sup>112</sup>, аспарагиназы<sup>288</sup> и стрептокиназы<sup>277</sup>, пектин — для трипсина и химотрипсина<sup>289</sup> и найлон — для трипсина<sup>290</sup>.

Весьма популярна также реакция с ангидридами двухосновных кислот.



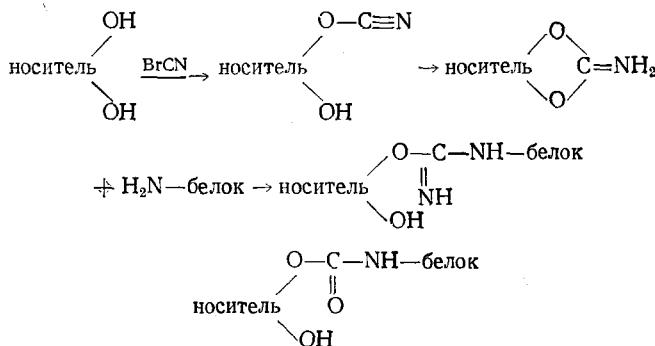
Так как при этом, наряду с ковалентной связью, образуется ионизируемая карбоксильная группа, то между молекулами белка и носителя может наблюдаться электростатическое взаимодействие. Обычно носители этого типа получаются сополимеризацией малеинового ангидрида и этилена и называются сокращенно ЭМА-полимерами. Таким способом иммобилизованы преимущественно протеолитические ферменты, главным образом трипсин<sup>2, 144, 181, 212, 213, 292-298</sup>. Этому типу производных посвящен специальный обзор<sup>291</sup>. Другие протеиназы представлены химотрипсином<sup>2, 144, 297, 298</sup>, пепсином<sup>299</sup>, плазмином<sup>2</sup>, калликреином<sup>144</sup>, папанином<sup>297, 299, 300</sup>, бромелайном<sup>300</sup>, фицином<sup>300</sup>, проназой и нейтральной протеиназой<sup>299</sup>, и субтилизинами Ново и Карлсберг<sup>297</sup>.

Для защиты от ацилирования активных центров SH-содержащих ферментов в некоторых случаях иммобилизации подвергались протеиназы, ингибированные соединениями ртути; после привязывания ферментов к носителю проводилась реактивация<sup>300</sup>. Кроме протеолитических ферментов иммобилизованы также: каталаза<sup>298</sup>, оксидаза D-аминокислот<sup>298</sup>, ксантинооксидаза<sup>298</sup>, амилаза<sup>299, 301</sup>, декстраназа<sup>301</sup>,

целлюлаза<sup>298, 301</sup>,  $\beta$ -глюкозидаза<sup>298</sup>, наргиназа<sup>302</sup>, РНКаза<sup>303</sup>, ацетилхолинэстераза<sup>304</sup>, липаза<sup>299, 301</sup>, пенициллинамидаза<sup>106, 302</sup>, аспарагиназа<sup>298, 301</sup>, уреаза<sup>301</sup>, щелочная фосфатаза<sup>273</sup>, пирофосфатаза<sup>298</sup>, гексокиназа<sup>298</sup>, аденилатциклаза<sup>247</sup> и оксинитрилаза<sup>301</sup>. Растворимые ЭМА-полимеры служили для получения растворимых полимер-ферментных комплексов<sup>301</sup>.

Из других полимерных ангидридов применяли только ангидрид полиметакриловой кислоты для иммобилизации трипсина, химотрипсина и папаина<sup>362, 386</sup>.

В последние годы очень большую популярность приобрел предложенный Поратом, Аксеном и Эрнбаком<sup>305</sup> метод активации гидроксилсодержащих носителей бромистым цианом. Под действием этого реагента на поверхности носителя образуются иминокарбонатные группы, способные образовывать связь с аминогруппами белков:

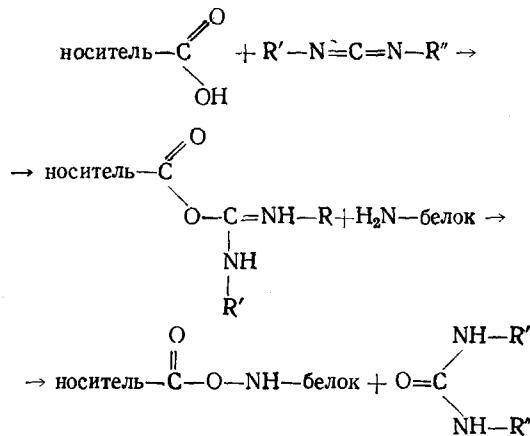


Чаще всего этот метод применяется для активации агарозы (сефарозы), которая имеет, вследствие способности сильно набухать в воде (содержание сухих веществ — 2, 4 или 6 %), весьма крупнопористую структуру, обеспечивающую включение в поры носителя крупных молекул фермента и высокие значения коэффициентов диффузии даже для высокомолекулярных субстратов. Этим способом иммобилизованы глюкозооксидаза<sup>306</sup>, лактопероксидаза<sup>307</sup>, липоксигеназа<sup>308</sup>, изоцитратдегидрогеназа<sup>309, 310</sup>, пиридиннуклеотидтрансгидрогеназа<sup>311</sup>, протокатехинат-3,4-диоксигеназа<sup>312</sup>, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа<sup>146</sup>, глюкоамилаза<sup>306</sup>, трипсин<sup>313-317</sup>, химотрипсин<sup>252, 305, 316, 318, 319</sup>, пепсин<sup>320, 321</sup>, ренин<sup>252, 322</sup>, катепсин<sup>224</sup>, эластаза<sup>323</sup>, лейцинаминопептидаза<sup>324, 325</sup>, амино- и карбоксипептидазы<sup>326</sup>, папаин<sup>316</sup>, бактериальная протеиназа<sup>327</sup>, различные нуклеазы<sup>328-334</sup>, холинэстеразы<sup>335</sup>, аминоацилаза<sup>53</sup>, пенициллинамидаза<sup>336</sup>, альдолаза<sup>337</sup>, глюкогенфосфорилаза<sup>338</sup>, синтетазы транспортных РНК гистидина<sup>339</sup> и изолейцина<sup>340</sup>.

Хотя с помощью активированной бромистым цианом сефарозы достигнуты весьма хорошие показатели для многих иммобилизованных ферментов, нельзя забывать о низкой механической и термической стойкости этого материала. С целью получения более пригодных для технологического применения препаратов нерастворимых ферментов бромистым цианом были активированы и другие полисахаридные материалы. Так, целлюлозе были привязаны глюкоамилаза<sup>341</sup>, проназа<sup>271</sup>, ацетилхолинэстераза<sup>112</sup>, пенициллинамидаза<sup>336</sup>, аспарагиназа<sup>276</sup>, полинуклеотидфосфорилаза<sup>342</sup> и стрептокиназа<sup>277</sup>. На декстрановом геле — сефадексе иммобилизованы глюкозооксидаза<sup>343</sup>, каталаза<sup>343</sup>, липоксигеназа<sup>344</sup>, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа<sup>345</sup>, изоцитратдегидрогеназа<sup>309</sup>, глюкоамилаза<sup>343</sup>,  $\beta$ -галактозидаза<sup>345</sup>, трипсин<sup>314, 346-348</sup>, химотрипсин<sup>319</sup>,

лейцинаминопептидаза<sup>336</sup>, РНКаза<sup>331</sup>, гексокиназа<sup>345, 349</sup> и стрептокиназа<sup>277</sup>.

Хорошим конденсирующим агентом, применяющимся в пептидном синтезе являются карбодиимииды. Реакция протекает в две стадии. На первой стадии карбодиимиид присоединяется к карбоксильной группе, а затем образуется пептидная связь с одновременным освобождением двузамещенной мочевины.

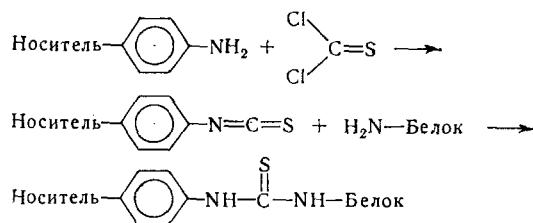


Эту реакцию можно использовать для образования внутри- или межмолекулярных амидных связей<sup>350</sup>, и она позволяет получить фермент, иммобилизованный без носителя (см., например, иммобилизацию аминоацилазы<sup>53</sup>). В большинстве случаев карбодиимииды применяются для конденсации карбоксильных групп носителя с аминогруппами фермента. Этим способом на карбоксиметилцеллюзде иммобилизованы: глютаматдегидрогеназа<sup>351</sup>, пероксидаза<sup>352, 353</sup>, химотрипсин<sup>351</sup>, проназа<sup>354</sup>, аспарагиназа<sup>276</sup> и ацетилхолинэстераза<sup>112</sup>; на декстране — глютаматдегидрогеназа<sup>351</sup>, химотрипсин<sup>351</sup> и проназа<sup>355</sup>. На акрильных полимерах иммобилизованы глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа<sup>146</sup>, глютаматдегидрогеназа<sup>351</sup>,  $\beta$ -галактозидаза<sup>158</sup>, пуллуланаза<sup>356</sup>, трипсин<sup>158</sup>, химотрипсин<sup>351</sup> и цитратсинтетаза<sup>159</sup>; на найлоне — трипсин<sup>290</sup>.

С целью иммобилизации применен ряд соединений с подвижными атомами галогена, в частности, бром- и иод-ацетилпроизводные, хлор-ангидриды кислот, нитрофторфенильные соединения и цианургалогениды (триазинилхлориды, проционовые красители). Эти соединения могут реагировать с аминами, сульфидрильными, гидроксильными и имидазольными группами. На фторфенилсодержащих полимерах иммобилизованы алкогольдегидрогеназа<sup>357, 358</sup>, инвертаза<sup>358, 359</sup>, амилазы<sup>357, 358, 360-362</sup>, пепсин<sup>357, 358</sup>, папаин<sup>360-362</sup>, щелочная фосфатаза<sup>273</sup> и аминоацилаза<sup>205</sup>. При помощи триазинилгалогенида ферменты иммобилизованы главным образом на аминоэтилированных целлюлозах, а также на других полисахарах. Таким способом получены нерастворимые препараты глюкозооксидазы<sup>363</sup>, лактатдегидрогеназы<sup>364</sup>, глюкоамилазы<sup>363, 365, 366</sup>, декстраназы<sup>363</sup>,  $\alpha$ -галактозидазы<sup>363</sup>,  $\beta$ -галактозидазы<sup>367, 368</sup>, инвертазы<sup>369</sup>, гиалуронидазы<sup>370</sup>, трипсина<sup>363, 371</sup>, химотрипсина<sup>189, 372, 373</sup>, папаина<sup>263</sup>, пенициллинамида<sup>363, 374, 375</sup>, ацетилхолинэстеразы<sup>112, 376</sup>, щелочной фосфатазы<sup>363</sup>, РНКазы<sup>363</sup>, пируваткиназы<sup>363, 368, 377</sup> и креатинфосфокиназы<sup>363</sup>. С помощью производных иод- и бромуксусной кислоты, а также иодалкилэфиров иммобилизованы химотрипсин<sup>378, 379</sup>, трипсин<sup>380</sup>, тромбин<sup>381</sup>, проназа<sup>355</sup>, глюкоамилаза<sup>344, 382</sup>, аминоаци-

лаза<sup>53, 363</sup>, пенициллинамида<sup>275</sup>, уреаза<sup>380</sup>, альдолаза<sup>384</sup> и стрептокиназа<sup>277</sup>. Под действием этилхлорформиата иммобилизованы пепсин<sup>385</sup>, трипсин<sup>289</sup>, химотрипсин<sup>289</sup> и фицин<sup>289</sup>. К хлорангидридам карбоксильных катионитов привязаны пенициллинамида<sup>108, 275</sup> и щелочная протеиназа<sup>386</sup>. Из неорганических соединений применялись хлористый сульфурил и тионилхлорид<sup>387, 388</sup>. Так были иммобилизованы лактатдегидрогеназа, инвертаза, пепсин, щелочная фосфатаза и треониндезаминаза. Новыми связующими агентами этого типа являются хлориды переходных металлов, в частности  $TiCl_4$ <sup>389, 390</sup>. При помощи этих реагентов на различных носителях, в том числе на дрожжевых клетках, привязаны глюкозооксидаза, уриказа, глюкоамилаза,  $\alpha$ -амилаза, инвертаза, трипсин, уреаза и глюкозоизомераза.

Для образования ковалентных связей между белком и носителем нередко применяются различные цианаты. Среди них в первую очередь необходимо отметить изотиоцианаты, получаемые при действии тиофосгена на амины:



Аналогичным путем обработка фосгеном приводит к образованию изоцианатных групп. Этими способами получены нерастворимые производные глюкозооксидазы<sup>391</sup>, каталазы<sup>201</sup>, различных амилаз<sup>222, 282, 381, 392, 393</sup>, протеиназ<sup>358, 361, 393, 394</sup> и липазы<sup>201</sup>. Значительно реже для иммобилизации применяют изоцианиды<sup>319, 385</sup> и цианаты<sup>396</sup>.

Из менее распространенных методов ковалентной фиксации ферментов следует указать на применение N-этил-5-фенилизоксазолил-3-сульфоната<sup>276, 397-401</sup> при иммобилизации трипсина и химотрипсина, а также аспарагиназы<sup>276</sup>, апиразы<sup>399</sup>, ДНКазы<sup>399</sup> и холинэстеразы<sup>399</sup>. На целлюлозокарбонате иммобилизованы<sup>402</sup>  $\beta$ -D-глюкозидаза,  $\alpha$ -амилаза, глюкоамилаза, трипсин. При помощи реакции с соединениями, содержащими эпоксидные группировки иммобилизованы некоторые протеиназы<sup>403</sup>. Некоторые ферменты иммобилизованы на энзакрилах, содержащих тиолактамные и тиольные группировки<sup>221, 224</sup>. Вышеописанные методы применяются для получения продажных препаратов нерастворимых ферментов<sup>404-410</sup>.

## 5. Изоляция ферментов с помощью мембран

Многократное применение ферментов достигается также изоляцией ферментного раствора с помощью мембран, поры которых не пропускают белковые макромолекулы, но в то же время проницаемы для субстрата и продуктов реакции. Это достигается микроГИКапсуляцией, при которой вокруг ферментного раствора образуются полимерные оболочки; получением искусственных волокон, содержащих микропузырьки ферментного раствора и включением ферментного раствора между мембранами на поверхности электрода. К этому типу изоляции можно было бы отнести и применение ферментов в реакторе с ультрафильтрацией реакционной смеси через мембрану, задерживающую макромолекулы белка. В последнем случае раствор субстрата вносится

ТАБЛИЦА 1

## Список иммобилизованных ферментов

№ п/п	Фермент	Ссылки на литературу
1	Алкогольдегидрогеназа	143, 204, 214, 357, 406
2	Ацетальдегиддегидрогеназа	421
3	Глицерофосфатдегидрогеназа	406
4	Лактатдегидрогеназа	113, 137, 143, 144, 217, 388, 406, 411
5	Глицератдегидрогеназа	39, 40—42
6	Малатдегидрогеназа	38, 217, 406
7	Изоцитратдегидрогеназа	309, 310
8	Глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа	43, 82, 145, 146, 345, 406
9	Стероиддегидрогеназа	179
10	Глюкозооксидаза	34, 35, 56, 57, 129, 135, 136, 137, 139, 175, 182, 183, 186, 200, 232, 246, 254, 259, 280, 306, 343, 363, 390, 391, 406, 408, 409, 420
11	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	406
12	Ксантинооксидаза	377
13	Глутаматдегидрогеназа	351
14	Оксидаза <i>L</i> -аминокислот	140—142, 187
15	Оксидаза <i>D</i> -аминокислот	143, 147, 298
16	НАД(Ф)-трансгидрогеназа	311
17	Нитритредуктаза	421
18	Уратоксидаза	246, 255, 390
19	Каталаза	32, 41, 42, 56, 77, 88, 104, 121, 122, 144, 137, 138, 202, 229, 231, 263, 298, 343, 411, 418, 420
20	Пероксидаза	120, 129, 148, 186, 232, 258, 259, 352, 353, 405, 406, 409
21	Цитохром <i>c</i>	36, 37, 258, 405, 409, 121, 122, 308, 344
23	Протокатехинат-3,4-диоксигеназа	312
24	Полифенолоксидаза	422
25	Люцифераза	281
26	Лактопероксидаза	307
27	β-Тирозиназа	419
28	α-Глюканфосфорилаза	338
29	Декстронсахараза	103
30	Галактозилтрансфераза	423
31	Нуклеозид-рибозилтрансфераза	350
32	Аминотрансфераза	420
33	Гексокиназа	40, 41, 42, 44, 77, 146, 149, 298, 338, 345, 349, 377, 406, 419
34	Креатинкиназа	363
35	Фосфоглицератмутаза	406
36	НАД-пирофосфорилаза	71
37	Полинуклеотидфосфорилаза	342
38	Роданеза	423
39	Липаза	51, 201, 299, 301, 411
40	Ацетилхолинэстераза	89, 112, 120, 129, 335, 376
41	Холинэстераза	121, 122, 124—126, 162, 335
42	Глицериндегидратаза	87
43	Кислая фосфатаза	40—42, 51, 77, 164, 259, 408
44	Щелочная фосфатаза	40—42, 78, 122, 164, 165, 186, 191, 192, 273, 363, 388, 404, 408
45	Фосфатаза	65, 66
46	Фосфомоноэстераза	109
47	Фосфодизтераза	404
48	Дезоксирибонуклеаза	81, 404
49	Нуклеаза	330, 332, 334
50	α-амилаза	85, 86, 131, 150, 203, 216, 217, 222, 223, 260, 261, 282, 389, 390, 393, 405, 406
51	β-амилаза	150, 217, 222, 358
52	Глюкоамилаза	34, 58, 59, 76, 90, 91, 105, 132, 151, 152, 200, 216, 261, 279, 306, 341, 363, 365, 366, 389, 390, 404
53	Мальтаза	416
54	Диастаза	204, 301, 357, 361, 362
55	Целлюлаза	80, 298, 301
56	Декстраназа	363
57	Мурамидаза	60, 128, 232, 236
58	Нейраминидаза	56, 406

ТАБЛИЦА 1 (продолжение)

№ п/п	Фермент	Ссылки на литературу
59	β-глюкозидаза	156, 157, 216, 298, 397
60	α-галактозидаза	363
61	β-галактозидаза	96, 158, 345, 367, 419, 420
62	Инвертаза	29, 30, 56, 89, 153—155, 262, 416, 419, 420
63	Нарингиназа	302
64	Пуллуланаза	218, 261, 301
65	Рибонуклеаза	46, 51, 52, 110, 114, 156, 204, 219, 232, 259, 272, 287, 328, 329, 331, 333, 334, 363, 404—409, 419, 420
66	Лейцинаминопептидаза	73, 324, 325, 405
67	Аминопептидаза	326, 393
68	Карбоксипептидаза	204, 218, 242, 243, 244, 326, 406, 408, 420
69	Иминоептидаза	72
70	Щелочная протеиназа	49, 186, 228, 299, 386
71	Бактериальная протеиназа	198, 228
72	Нейтральная протеиназа	299
73	Пепсин	31, 95, 204, 251, 299, 320, 321, 357, 358, 385, 387, 393
74	Калликреин	144
75	Трипсин	46, 47, 61, 111, 119, 121, 128, 133, 144, 150, 158, 159, 182, 186, 289, 206, 207, 212, 213, 216, 228, 232, 234, 246, 248, 250, 258, 260, 269, 283, 286, 289, 290, 292, 293—298, 304, 313, 314, 316, 346—348, 358, 363, 371, 380, 389, 390, 393, 401, 404—410
76	Папаин	48, 140, 148, 150, 155, 181, 184—186, 189, 207, 215, 227, 236, 238—241, 260, 278, 300, 304, 316, 346, 361, 363, 394, 397, 405—410, 420
77	Химотрипсин	5, 41, 61—63, 112, 128, 144, 150, 182, 207, 219, 233, 236—238, 246, 252, 259, 264—267, 286, 297, 305, 315, 316, 319, 351, 358, 373, 378, 393, 395, 397, 398, 401, 405—410
78	Эластаза	323
79	Катепсин	224
80	Фицин	106, 186, 219, 270, 289, 300, 406, 407, 409
81	Тромбин	206, 208, 220, 381,
82	Плазмин	47, 211
83	Ренин	252, 322
84	Бромелайн	300, 407, 409
85	Проназа	107, 190, 209, 271, 355, 406
86	Субтилизин	64, 297, 405—407
87	Аспарагиназа	27, 108, 147, 230, 256—277, 288, 298, 301, 406
88	Аминоацилаза	51—53, 74, 92—95, 101, 102, 163, 205, 285, 383
89	Уреаза	31, 32, 67, 68, 69, 122, 126, 129, 160, 161, 186, 193, 210, 230, 246, 254, 255, 286, 301, 380, 390, 405, 406, 411, 413, 414, 416, 420
90	Пенициллинамидаза	53, 70, 75, 106, 274, 336, 363, 374, 375, 419
91	Аргиназа	420
92	Аденозиндезаминаза	225, 226
93	Пирофосфатаза	298
94	АТФаза	83
95	АТФ-дезаминаза	98
96	АТФ-дигидролаза	166
97	Апираза	83, 271
98	Орцеллиндекарбоксилаза	159
99	Аргининдекарбоксилаза	143, 196
100	Цистеинсульфинатдекарбоксилаза	143, 195
101	Оксинитрил-лиаза	145
102	Альдолаза	149, 150, 167, 168, 253, 337, 384, 406, 419
103	Карбоангидраза	182, 183, 246, 317, 412, 417
104	Энолаза	167—169
105	Гиалуронат-лиаза	370
106	Треонин-дезаминаза	388
107	Аспартаза	170
108	Глюкозоизомераза	99, 172, 416, 419
109	Глюкозофосфат-изомераза	149, 406
110	Триозо-3-фосфатмутаза	406
111	Фосфоглицерат-фосфомутаза	41, 42, 40, 77, 145, 167, 168, 171
112	Триптофан-синтетаза	419
113	Изолейцин-т-РНК-синтетаза	340

ТАБЛИЦА 1 (окончание)

№ п/п	Фермент	Ссылки на литературу
114	РНК-синтетаза	84
115	Гистидин-т-РНК-синтетаза	339
116	Цитратсинтетаза	159, 173
117	Простагландинсинтетаза	121, 122
118	Инъектаза	174

в реактор, минуя мембранны, и фермент может действовать на макромолекулярные субстраты, если продукты низкомолекулярны.

Так как в этих системах ферменты сохраняют определенную подвижность в растворе, такого рода изоляцию ферментов трудно в полной мере относить к рассматриваемой нами проблеме иммобилизации. Учитывая сходство в методах практического применения микроинкапсулированных, в частности, включенных в волокна ферментов и макромолекулярно иммобилизованных ферментов мы укажем на некоторые соответствующие работы и приведем список полученных таким образом препаратов в табл. 1.

В микрокапсулы включали главным образом уреазу<sup>230, 411-415</sup>, а также липазу<sup>411</sup>, мальтазу<sup>416</sup>, глюкозоизомеразу<sup>416</sup>, карбоангидразу<sup>317, 412, 417</sup>, катализ<sup>411, 418</sup> и аспарагиназу<sup>230</sup>.

Диспергированием водного раствора фермента или нескольких ферментов в растворе линейного полимера в органическом растворителе получены разнообразные ферментативно активные волокна и ткани, которые способны длительно сохранять ферментативную активность<sup>419, 420</sup>.

Для облегчения нахождения ссылок по иммобилизации каждого отдельного фермента в табл. 1 приводится список известных на настоящее время иммобилизованных ферментов. Список составлен в порядке, соответствующем общепринятой классификации ферментов.

### III. ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

#### 1. Общая характеристика изменений

Обобщая весь накопленный экспериментальный материал, можно сделать вывод, что иммобилизация не приводит к принципиальным изменениям катализитических свойств ферментов. Кроме того, даже количественные характеристики действия ферментов — значения катализитических констант, энергии активации, оптимума pH и температуры нередко существенно не изменяются. Поэтому в дальнейшем мы будем рассматривать только те случаи, когда свойства иммобилизованного фермента отличаются от его первоначальных свойств.

При рассмотрении экспериментально определяемых различий в свойствах растворимых и нерастворимых ферментов необходимо иметь в виду, что молекулы иммобилизованного фермента функционируют в микроокружении, которое может значительно отличаться от макроокружения, т. е. состав среды внутри и снаружи частицы гетерогенного ферментного катализатора может быть разным. По этой причине Международной комиссией рекомендовано называть экспериментально определяемые кинетические характеристики иммобилизованных ферментов «кажущимися».

Мы предлагаем рассматривать кинетику иммобилизованных ферментов и, следовательно, возникновение наблюдаемых кинетических изменений на нескольких уровнях, характеристики которых приведены в табл. 2.

ТАБЛИЦА 2

Характеристика изменений кинетических свойств иммобилизованных ферментов на различных уровнях

№ п/п	Уровень кинетики	Причины возникновения изменений	Характер воздействия	Условия максимальных изменений
1	Установка	Градиенты концентраций по длине установки; изменение концентраций во время действия установки	Динамический — зависит от активности препарата фермента	Глубокое превращение субстрата, в частности, когда продукт является эффектором
2	Материал	Градиенты концентраций на поверхности раздела фаз раствор — ферментативно активный материал	То же	Высокие значения модуля $\kappa = \frac{E}{\rho \cdot \beta \cdot c}$
3	Зерно	Градиенты концентрации в толще ферментативно активного материала	»	Высокие значения модуля $\lambda = R^2 \frac{E}{D}$
4	Матрица	Влияние матрицы на коэффициент активности растворенных веществ; распределение субстрата и эффекторов между раствором и матрицей	Статический — не зависит от активности геля	Заряженная матрица; гидрофобная матрица в случае гидрофобного субстрата
5	Молекула	Непосредственное воздействие матрицы на конформацию белковой макромолекулы и на активный центр	Статический — То же	Не обобщены

О бозначения:  $E$  — активность препарата фермента;  $\rho$  — удельная поверхность материала;  $\beta$  — коэффициент массопередачи;  $R$  — радиус (полутолщина) материала;  $D$  — коэффициент диффузии субстрата (продукта) в зерне.

Конечно, для теоретической энзимологии представляют наибольший интерес изменения ферментативной кинетики на молекулярном уровне (уровень 5 табл. 2), однако изучение кинетики ферментов на этом уровне требует учета возмущений на уровнях 1—4.

В принципе наиболее легко исключить влияние установки. Для этого необходимо работать при достаточно низких степенях превращения субстрата. При этом следует подчеркнуть необходимость экспериментальной проверки независимости скорости реакции от степени превращения. Результаты наших собственных экспериментов показали, что в случае ингибирования фермента продуктами реакции нелинейности возникают даже при превращении нескольких процентов субстрата.

Разработка кинетики установок с иммобилизованными ферментами имеет огромное значение при внедрении гетерогенного ферментативного катализа в технологические процессы, и этой проблеме посвящен ряд теоретических и экспериментальных работ. Объем данной статьи не позволяет рассмотреть все эти работы, и мы предпочли сослаться только на некоторые наиболее новые и интересные публикации<sup>424—429</sup>.

Численным решением соответствующих уравнений, вытекающих из баланса массопередачи на поверхности и внутри зерна нами показано<sup>430</sup>, что сопротивление массопередачи на поверхности раздела фаз

не меняет формы кинетического уравнения Михаэлиса — Ментена, но приводит к увеличению кажущегося значения  $K_m$ . Основным параметром, определяющим перепад концентрации в слое массопередачи, а также увеличения кажущейся  $K_m$ , является модуль

$$\kappa = \frac{E}{\rho \cdot \beta \cdot c} \quad (4.1)$$

где  $E$  — ферментативная активность препарата,

$\rho$  — удельная поверхность материала,

$\beta$  — коэффициент массопередачи,

$c$  — концентрация субстрата в растворе.

Когда  $\kappa \leq 0,1$ , то сопротивлением массопередачи можно пренебречь. Наоборот, значения  $\kappa \geq 10$  соответствуют процессам, полностью управляемым внешней диффузией, что соответствует бесконечной  $K_m$ .

Кинетика в многослойном материале при наличии сопротивления массопередаче описана Рони<sup>431</sup>. Кинетика массопередачи в ферментативно-активной мембране описана также для случая наличия электростатического потенциала<sup>432</sup>, для ингибиования реакции продуктом<sup>433</sup> и для мембранны с двумя последовательными реакциями<sup>434</sup>.

Кинетика реакций в зерне (мембране) в стационарных условиях без учета внешней диффузии описывается общим уравнением:

$$\operatorname{div}(D \cdot \operatorname{grad} c) = g(c) \quad (4.2)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии продукта внутри материала,  $g(c)$  — уравнение, описывающее зависимость скорости реакции от концентрации субстрата.

Конкретная форма данного уравнения и, следовательно, возможность его аналитического решения зависит от геометрической формы и материала и вида уравнения  $g(c)$ . Практическое значение имеют решения для пластиинки (мембранны) бесконечных размеров, и для сферы, а в некоторых случаях также для бесконечного цилиндра (волокна). Решение уравнения (4.2) в случае мембранны не представляет трудности для различных форм кинетического уравнения. Из многих работ, где приводятся решения данного уравнения, безусловно следует отметить работу Му-Янга и Кобаяши<sup>435</sup>, в которой приводится обобщенное решение для некоторых, наиболее часто встречающихся форм функции  $g(c)$ .

Для сферы уравнение (4.2) принимает вид:

$$\frac{d^2c}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dc}{dr} = \frac{1}{D} g(c) \quad (4.3)$$

и решается аналитически только для реакций с кинетикой нулевого и первого порядка, а для реальной ферментативной кинетики имеется только приближенное решение. Лучшие приближенные решения этого же уравнения в случае кинетики Михаэлиса — Ментен получены Блумом и Йенденом<sup>436</sup> и развиты в дальнейшем О'Салливаном<sup>437</sup>. Методом единичных возмущений это же уравнение решено Мерреем<sup>438</sup>. В уже цитированной работе<sup>435</sup> даются приближенные решения уравнения (4.3) для нескольких форм функции  $g(c)$ , а его точные численные решения для случая кинетики Михаэлиса — Ментен получены Келлером<sup>439</sup> и Кёстнером<sup>440, 441</sup>. На основе всех приближенных или численных решений можно сделать вывод, что как внутренняя, так и внешняя диффузия не меняет форму основного кинетического уравнения, однако приводит к увеличению кажущегося значения  $K_m$ . В этом случае мерой диффузионного сопротивления служит безразмерный модуль

$$\lambda = R \sqrt{\frac{E}{K_m \cdot D}} \quad (4.3')$$

где  $R$  — радиус зерна,  $K_m$  — константа Михаэлиса для иммобилизованного фермента.

В первом приближении кажущаяся  $K_m$  линейно зависит от  $\lambda$

$$K_{m(\text{каж.})} = K_m (1 + 0,018 \cdot \lambda) \quad (4.4)$$

где 0,018 — коэффициент, определенный из численных решений.

Таким образом, диффузионное сопротивление на поверхности и внутри самого материала приводит к увеличению кажущейся  $K_m$ . Наименьшая разница между наблюдаемой и реальной величинами  $K_m$  обеспечивается при наиболее низкой активности и минимальных линейных размерах материала. Увеличение коэффициента диффузии путем регулирования размера пор материала и повышение коэффициента массопередачи, вследствие перемешивания, помогает достижению той же цели.

Взаимодействие растворенных веществ с матрицей иммобилизованного фермента может привести к значительным изменениям концентрации данных веществ внутри носителя. Характерным примером этого является изменение эффективной концентрации водородных ионов в электрически заряженной матрице. Изменение эффективного значения pH описывается уравнением:

$$\Delta \text{pH} = 0,43 \cdot e\psi/kT, \quad (4.5)$$

где  $\Delta \text{pH}$  — изменение pH,  $e$  — заряд протона,  $\psi$  — электростатический потенциал в матрице,  $K$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура.

Подобным же уравнением описывается изменение концентрации электрически заряженного субстрата в матрице. Применимость выше приведенного уравнения показана Гольдманом (см., например, его обзор<sup>7</sup>). В случае трипсина, включенного в силикагель, найдено совпадение вычисленного и экспериментально определенного сдвига pH<sup>119</sup>.

Концентрирование гидрофобного субстрата в сравнительно гидрофобной матрице также подтверждено экспериментально<sup>129, 442</sup>, однако, количественное описание данного явления отсутствует. Лорент<sup>443</sup> рассмотрел влияние полимерной среды на коэффициенты активности фермента, субстрата и фермент-субстратного комплекса, которое может приводить к изменению кажущегося значения  $K_m$ .

Таким образом, микроокружение молекул иммобилизованного фермента формируется под действием разнообразных факторов, количественный учет которых нередко затруднен.

## 2. Изменение активности и стабильности ферментов

Основная цель получения иммобилизованных ферментов состоит в увеличении интегральной активности фермента, определяемой суммарным количеством полученного продукта. Эффективность иммобилизации равна отношению интегральных активностей исходного фермента и его нерастворимого производного

$$\eta_i = \frac{P_i}{P_p} \quad (4.6)$$

где  $\eta_i$  — эффективность иммобилизации,  $P_i$  — количество продукта, образуемого нерастворимым ферментом в практических условиях,  $P_p$  — тоже для растворимого фермента.

Допустим, что  $P_p$  определяется, главным образом, количеством применяемого фермента  $A_p$  и временем проведения реакции  $t_p$ . Время  $t_p$  определено практическими требованиями завершения реакции в приемлемые сроки. Предполагая, что активность растворимого фермента в рабочих условиях в течение периода  $t_p$  существенно не снижается, получим для эффективности  $\eta$  следующее выражение:

$$\eta_n = \frac{A_n}{A_p} \cdot \frac{1}{t_p} \int_0^{t_n} [1 - f(t)] dt \quad (4.7)$$

где  $A_n$  — активность иммобилизованного фермента в начале работы,  $t_n$  — время работы иммобилизованного фермента, определяемое его устойчивостью,  $f(t)$  — скорость инактивации иммобилизованного фермента в рабочих условиях.

Отношение  $A_n/A_p$  определяет сохранение активности при иммобилизации (или «выход активности» реакции иммобилизации) и будет в дальнейшем обозначаться через  $\gamma$ . Остальную часть уравнения (4.7) — интегральный коэффициент пролонгирования действия фермента обозначим через  $I_n$  (4.8):

$$I_n = \frac{1}{t_p} \int_0^{t_n} [1 - f(t)] dt \quad (4.8)$$

Уравнение (4.7) в упрощенном виде выглядит так:

$$\eta = \gamma \cdot I_n$$

Значение  $I_n$  вычисляется на основании двух в достаточной степени произвольных величин  $t_p$  и  $t_n$  и вряд ли может быть точно определено. Иммобилизация считается практически целесообразной при значениях  $I_n > 1$ .

Коэффициент  $\gamma$  можно рассматривать в виде произведения коэффициентов иммобилизации фермента  $\alpha$  и проявления активности  $\beta$

$$\gamma = \alpha \cdot \beta = \frac{B_n}{B_p} \cdot \frac{E_n}{E_p} \quad (4.9)$$

где  $B_p$  — исходное количество ферментного белка,  $B_n$  — количество белка в полученном препарате,  $E_p$  — удельная активность растворимого фермента,  $E_n$  — наблюдаемая удельная активность иммобилизованного фермента.

Оставшийся в реакционной смеси или в промывных водах ферментный белок практически вряд ли может быть утилизирован, и поэтому с практической точки зрения нет необходимости в разделении коэффициента  $\gamma$  на два компонента. Для выяснения сущности процессов иммобилизации такой подход, однако, нередко применяется.

Достижение полного связывания белка, когда  $\alpha = 1$ , хорошо известно для ионообменной сорбции, но в большинстве описанных методов получения иммобилизованных ферментов  $\alpha$  оказывается значительно ниже единицы. Конкретные значения  $\alpha$  существенно зависят от условий иммобилизации, и сделать какие-либо обобщения весьма затруднительно. В некоторых случаях, особенно при адсорбции, наблюдается в течение недель вымывание фермента, что мешает точному определению  $\alpha$ .

Значение  $\beta$  также почти всегда оказывается ниже единицы, но в некоторых работах вполне достоверно доказано увеличение ферментативной активности<sup>39, 42, 69, 72, 78, 95, 391, 444</sup>. Часто увеличение активности наблюдается при адсорбции ферментов, и иногда активность возрастает в де-

сятки раз<sup>42, 444</sup>. Этот факт хорошо согласуется с обнаруживаемыми различными методами значительными изменениями при адсорбции нативной конформации белка, что в других случаях приводит к практически нулевым значениям  $\beta$ . Не вполне ясна и сущность такого явления, как повышение активности трипсина при замораживании или застудневании его растворов. Эти способы повышения ферментативной активности запатентованы<sup>445, 446</sup>.

Интересный пример увеличения суммарной активности совместно иммобилизованной трехферментной системы описан Маттиасоном и Мосбахом<sup>345</sup>. Увеличение активности в этом случае объясняется облегчением транспорта продукта первой реакции к молекулам ферментов, осуществляющих последующие этапы превращения.

Снижение удельной активности ферментов при фиксации может быть следствием: химической модификации определенных групп активного центра, экранирования доступа субстрата к молекуле фермента или к его активному центру и изменения конформации белковой макромолекулы. Нежелательную модификацию активного центра при ковалентной иммобилизации можно уменьшить предварительным образованием комплекса фермента с ингибитором и с последующим вымыванием ингибитора из полученного препарата. Наличие экранирования доказывается различием в значениях активности препарата относительно низко- и высокомолекулярного субстрата. Для некоторых иммобилизованных ферментов показан линейный характер убывания наблюдаемой активности с ростом логарифма молекулярного веса субстрата<sup>107, 109</sup>. Существование этого, так называемого «эффекта сита» доказано также восстановлением первоначальной активности при солюбилизации матрицы<sup>313</sup>. Для устранения нежелательных воздействий матрицы на молекулу фермента рекомендуется пришивку проводить через «удлинительный мостик» или «ножку» из 6—10 метиленовых групп<sup>113, 178, 258, 447—449</sup>. Носители с иммобилизованными «на ножке» лигандами наиболее пригодны для применения в качестве афинных сорбентов.

Общеизвестно увеличение при иммобилизации стабильности ферментов. Причины этого явления обобщены Заборским<sup>450</sup>. Стабилизация вызывается косвенными причинами, такими как экранирование ферментов от действия лизирующих микроорганизмов и устранение автолиза (или протеолиза примесями протеиназ), вследствие разобщенности молекул фермента на носителе. Вышеназванными причинами можно отчасти объяснить длительное сохранение ферментативной активности, однако повышение устойчивости к кратковременному действию денатурирующих факторов указывает на существование молекулярных механизмов стабилизации. Чаще всего сообщается об устойчивости иммобилизованных ферментов к действию повышенной температуры<sup>87, 120, 152, 166, 173, 198, 217, 219, 226, 256, 270, 281, 285, 350, 376, 383</sup>.

При этом интересно отметить исследования Суровцева и др.<sup>265</sup>, в которых показано существование в препарате иммобилизованного фермента двух фракций с различной термостабильностью. Однако известны работы, где сообщается об уменьшении температурной стабильности ферментов<sup>185, 225, 281, 433, 451—453</sup>. В целом же, увеличение лабильности ферментов под действием иммобилизации встречается реже.

Имеются сведения о весьма длительных сроках работы или сохранения активности при хранении иммобилизованных ферментов. Например, колонка с включенной в гель инвертазой действовала 1,5—3 года<sup>419, 454, 455</sup>. Образцы некоторых ковалентно связанных дегидрогеназ использовались для проведения более 1000 аналитических определений<sup>217</sup>.

Нередко сообщается о снижении ингибируемости иммобилизованных ферментов<sup>120, 249, 432, 456</sup>. Весьма примечателен факт сохранения активности иммобилизованных ферментов в растворах 4—8 М мочевины и других реагентов, разрывающих водородные связи<sup>101, 203, 314, 347</sup>. При этом защитное действие может зависеть от природы матрицы. Например, иммобилизация трипсина на сефадексе бромциановым методом защищает фермент от действия мочевины, связывание тем же методом на агарозе защитного действия не оказывает<sup>347</sup>. Мочевина, по мнению некоторых авторов<sup>101, 314</sup>, может увеличивать атакуемость субстрата ферментом и таким образом даже увеличить эффективность действия фермента. Если денатурирующий агент приводит к потере ферментативной активности, то связи белковой молекулы с матрицей могут содействовать восстановлению нативной трехмерной структуры<sup>113, 249, 309, 328, 457</sup>.

Иммобилизованная на стекле дезоксирибонуклеаза не требует для проявления своей активности двухвалентных катионов, необходимых растворимому ферменту<sup>465, 458</sup>.

Иммобилизация защищает ферменты также от окисления и денатурации при облучении  $\gamma$ -лучами<sup>202</sup>.

### 3. Влияние иммобилизации на основные характеристики ферментов

Различия в субстратной специфичности иммобилизованных и растворимых ферментов можно объяснить различной доступностью молекулы фермента для субстратов разного молекулярного веса. Это справедливо, например, в случае протеолитических ферментов<sup>107, 209, 219, 288, 294</sup>.

Такие различия позволяют получать при помощи иммобилизованных протеиназ иные пептидные фрагменты, чем при действии растворимых ферментов и, следовательно, получить дополнительную информацию при установлении первичной структуры белков<sup>294</sup>. Иммобилизованные амилазы не действуют на амилопектин<sup>152</sup>, но образуют из крахмала больше низкомолекулярных продуктов<sup>459</sup>. Иммобилизованная люцифераза более чувствительна к изменению молекулярного веса синтетических субстратов<sup>281</sup>. При иммобилизации декстронсахаразы отделяется фактор, регулирующий тип образующихся глюкозидных связей и поэтому иммобилизация фермента приводит к получению продуктов с большей степенью разветвленности<sup>103</sup>.

Во многих случаях обнаружено предсказываемое теорией увеличение значения  $K_m$ . Увеличение  $K_m$  в 2—10 раз отмечается для ковалентно фиксированных на целлюлозе креатинфосфотрансферазы<sup>460</sup>, апиразы<sup>274</sup>, холинэстеразы<sup>376</sup>, лактазы<sup>461</sup>, фосфомоноэстеразы<sup>109</sup>, глюкоамилазы<sup>279</sup>. То же явление обнаружено в случае связанной с сефарозой липоксигеназы<sup>308</sup>, адсорбированных инвертазы<sup>452</sup> и глюкоамилазы<sup>59</sup>, а также для многих ферментов, включенных в микроячеистые волокна<sup>419</sup>. В случае фосфатазы в коллоидиевой мембране  $K_m$  увеличивается до 350 раз<sup>433</sup>. По неизвестным причинам лиофилизация увеличивает кажущуюся  $K_m$  иммобилизованной лактазы<sup>461</sup>. В случае применения иммобилизованных ферментов в колонке, увеличение скорости протекания субстрата уменьшает  $K_m$ <sup>5, 256, 432, 462</sup>, что хорошо согласуется с предположением о зависимости кажущейся  $K_m$  от условий массопередачи. Уменьшение значения  $K_m$  в десятки раз обнаружено в случае глюкозооксидазы<sup>391</sup>, сукцинатдегидрогеназы<sup>39</sup>, трипсина<sup>292</sup>, бромелайна<sup>463</sup>, холенинэстеразы<sup>129</sup> и пенициллинамидазы<sup>374</sup>. Это явление в принципе также может быть объяснено концентрированием субстрата в матрице. В частности, для ковалентно связанного с карбоксиметилцеллюлозой бромелайна уменьшение  $K_m$  в 10 раз наблюдается только при низких

значениях ионной силы, а при высокой ионной силе, когда подавляется взаимодействие субстрата с карбоксильными группами носителя,  $K_m$  нерастворимого и растворимого фермента одинаковы.

Интересно отметить, что иногда, наряду с увеличением температурной устойчивости, температурный оптимум фермента при иммобилизации снижается<sup>90, 188, 383, 452</sup>. Однако в основном наблюдается повышение температурного оптимума<sup>169</sup>. Каждая энергия активации ферментативной реакции чаще всего остается без изменений, но в некоторых случаях было показано ее увеличение<sup>391</sup> или уменьшение<sup>169, 383</sup>. Для криволинейного графика Аррениуса возможно изменение формы кривой<sup>169</sup>.

По-разному изменяются зависимости активности ферментов от pH при использовании различных носителей: сдвиг оптимума pH в кислую сторону наблюдали в случае протокатехинатдиоксигеназы<sup>312</sup>, трипсина<sup>292</sup>, химотрипсина<sup>63</sup>, инвертазы<sup>89</sup>, уреазы<sup>193</sup> и пенициллинамидазы<sup>374</sup>; и в щелочную сторону — для липоксигеназы<sup>308, 344</sup>, трипсина<sup>119, 292</sup>, химотрипсина<sup>267, 313</sup>, эластазы<sup>323</sup> и инвертазы<sup>188, 369</sup>. Величина сдвига оптимума обычно составляет 0,5—1,0 единиц pH и редко достигает 2 единиц.

Сдвиг оптимума pH объясняется различием между локальным значением pH микроокружения активного центра фермента и pH, измеряемым в объеме раствора. Это приводит к изменению кажущихся измеряемых величин  $pK_a$  по ионизации функциональных групп фермента. На локальное значение pH микрооружения влияют: заряд матрицы, изменение заряда субстрата при превращении его в продукты, диффузия субстрата и продукта, изменение суммарного заряда белка при иммобилизации и т. п.

Изменение pH-оптимума двухферментной системы может быть объяснено кооперативным действием этих ферментов<sup>306</sup>. Кроме того при иммобилизации нередко меняется и форма кривой pH-зависимости. Расширение колоколообразной кривой имеет место для адсорбированной сукцинатдегидрогеназы<sup>39</sup>, ковалентно связанный ацетилхолинэстеразы<sup>194</sup>, проназы<sup>150</sup>, энолазы<sup>169</sup> и аденоциндезамины<sup>226</sup>, а также у многих ферментов, включенных в ячеистые волокна<sup>419</sup>. Сужение колокола обнаружено для адсорбированной глюкоамилазы<sup>90</sup> и для ковалентно связанных папаина<sup>300</sup>, инвертазы<sup>464</sup>, аспарагиназы<sup>256</sup>, пенициллинамидазы<sup>374</sup>. Подробный анализ причин изменения pH-зависимости приведен в обзоре Гольдмана и соавторов<sup>7</sup>.

## V. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

### 1. Применение в технологических процессах

Подавляющее большинство работ по иммобилизованным ферментам направлено на получение гетерогенных ферментных катализаторов с целью использования их в промышленной технологии. Общие вопросы внедрения ферментативного катализа, перспективы его развития и возможные затруднения рассматриваются в некоторых обзора и сборниках трудов научных конференций<sup>17, 19, 465—469</sup>. В данном обзоре мы не рассматриваем вопросы, касающиеся конкретного технологического оформления процессов с применением иммобилизованных ферментов, а приводим только принципы использования такого рода катализаторов.

По своему назначению процессы с применением иммобилизованных ферментов могут быть подразделены следующим образом: а) получение нужного продукта в виде чистого вещества или в виде компонента в производимой смеси, б) устранение нежелательной примеси из про-

ТАБЛИЦА 3

Примеры предложений внедрения ферментного катализа в промышленную технологию

Фермент	Исходное вещество или обрабатываемая смесь	Получаемое вещество и достигаемый эффект	Ссылки на литературу
<i>Получение нужного продукта</i>			
Амилаза	Крахмал	Глюкоза, глюкозная патока	34, 85, 282, 365, 470—473
Инвертаза	Сахароза	Инвертный сироп	89, 369, 441, 454, 455, 474
Протеиназа	Молоко	Створоженное молоко для получения сыра	252, 322, 475, 476
Пенициллиназа	Бензилпенициллин	6-аминопенициллановая кислота	8, 31, 70, 336, 363, 374, 477, 478
Глюкозооксидаза	Глюкоза	Глюконовая кислота	7
Глюкозоизомераза	Глюкоза	Инвертный сироп	172, 479
Стероиддегидрогеназа	Кортизол	Преднизолон	179
Оксинитрилаза	Бензальдегид	Нитрил миндальной кислоты	100
Полинуклеотидфосфорилаза	Мононуклеотиды	Олигонуклеотиды, полинуклеотиды	342, 428
Левансахараза	Сахароза	Леваны	103
Аденилаткиназа	Ацетилфосфат; адено-нозиндифосфат	Аденозинтрифосфат	480
НАД-пирофосфорилаза		Никотинамидадениндинуклеотид	71
<i>Устранение нежелательных примесей</i>			
β-Галактозидаза	Молоко, молочная сыворотка	Гидролиз труднорастворимой и плохо усвояемой лактозы	481, 482, 483
Протеиназа	Пиво	Гидролиз белков, приводящих к помутнению продукции	225, 423
Протеиназа	Антибиотики	Гидролиз примесных иммуногенных белков	355
Нарингиназа	Сок цитрусовых	Устранение горького привкуса нарянгина	302
<i>Разделение рацемических смесей</i>			
Аминоацилаза	Ацетилированные <i>DL</i> -аминокислоты	Свободные <i>L</i> -аминокислоты и ацетил- <i>D</i> -аминокислоты	94, 102, 383, 484
<i>Концентрирование при помощи специфической сорбции</i>			
Протеиназы	Предварительно обработанное сырье	Природные ингибиторы протеаз	144, 291, 346, 485

дукции или из отходов производства, в) химическое превращение одного из оптических изомеров с целью облегчения разделения рацемической смеси, г) концентрирование или выделение необходимого вещества путем специфической сорбции.

Примеры конкретных предложений применения иммобилизованных ферментов приведены в табл. 3, куда внесены только те предложения, для которых осуществлена хотя бы предварительная их проверка в лабораторном масштабе и опущены те, для которых подобная проверка отсутствует.

По нашим сведениям, в промышленных масштабах внедрены процессы разделения рацемических аминокислот и производства 6-амино-

пенициллановой кислоты. Учитывая сравнительно высокую стоимость иммобилизованных ферментов, в ближайшее время можно ожидать, в первую очередь, внедрения процессов, в которых вырабатываются дорогостоящие продукты — лекарственные вещества и биохимические реагенты. Следующим шагом внедрения могут быть уже крупнотоннажные процессы пищевой и химической промышленностей.

## 2. Применение в лабораторных исследованиях и в медицине

Иммобилизованные ферменты все шире используются в фундаментальных биохимических исследованиях в качестве моделей субклеточных структур и для изучения стерических воздействий на ферментативную кинетику. При помощи ферментных мембран созданы действующие модели активного транспорта<sup>486, 487</sup>. Броун и др.<sup>487</sup>, осуществив активный транспорт глюкозы в мембране, содержащей гексокиназу и фосфатазу, назвали исследуемое ими явление «векторным катализом». Подходом к созданию биологических модельных систем можно считать и некоторые другие работы<sup>281, 327</sup>.

Расширяется также применение иммобилизованных ферментов в аналитической практике. Этому вопросу посвящен ряд обзоров<sup>3, 21, 488—490</sup>. Аналитическое применение ферментов может быть разделено на три группы: а) афинная хроматография, б) определение субстратов в проточных системах с оптическими датчиками или при помощи ферментных электродов, в) определение ингибиторов ферментов.

Афинной хроматографии посвящено очень много отдельных статей и написан ряд обзоров, из которых мы отметим последние<sup>21, 26, 491, 492</sup>, а также опубликованный недавно в этом журнале обзор Черкасова<sup>28</sup>. Мы приводим только некоторые ссылки на работы, в которых в качестве афинного сорбента применялся иммобилизованный фермент<sup>291, 346, 485, 493, 494</sup>.

Удобный вариант определения субстратов заключается в применении ферментных электродов. Ферментные электроды изготавливаются из специфического электрохимического датчика, чувствительная поверхность которого покрыта мембраной с включенным в нее ферментом<sup>235</sup>. По принципу действия, т. е. по характеру определяемого вещества, ферментные электроды разделяются на две группы: а) определяется образующийся продукт, б) определяется уменьшение диффузии субстрата через ферментную мембрану.

Данные о ферментных электродах приведены в табл. 4. Однако в большинстве случаев стабильность таких электродов недостаточна и, вероятно, по этой причине ферментные электроды промышленностью не выпускаются.

Другой вариант количественного определения субстратов представляет собой систему из дозирующих установок, колонки с иммобилизованным ферментом и проточного колориметра (или флуориметра). При этом можно вместо колонки использовать трубку, к внутренней поверхности которой привязан фермент<sup>217, 200</sup>. Такие системы созданы для определения глюкозы (при помощи глюкозооксидазы<sup>138, 137, 254</sup>), мочевины (при помощи уреазы<sup>210, 254, 255</sup>), мочевой кислоты (при помощи уратоксидазы<sup>254</sup>), этилового спирта, молочной и яблочной кислот (при помощи соответствующих дегидрогеназ<sup>217</sup>).

Установки принципиально той же конструкции применяются для определения ингибиторов ферментов. Особенно высокая чувствительность достигается в случае применения флуорогенных субстратов. Этот метод применен для определения фосфороорганических соедине-

ний, ингибирующих иммобилизованную холинэстеразу<sup>126, 142, 268, 500</sup>. Он имеет кроме высокой чувствительности еще одно существенное преимущество. В отличие от химических методов анализа, в которых вещества определяются по их функциональным группам, ферментативный анализ позволяет определить ядовитые вещества по биологическому действию, проявляемому именно в виде ингибиции некоторых ферментов ключевого значения.

ТАБЛИЦА 4

## Принципы действия ферментных электродов

Определяемое вещество	Фермент, включенный в мембрану	Вещество, определяемое датчиком	Ссылки на литературу
Глюкоза	Глюкозооксидаза	O <sub>2</sub>	135, 280, 495, 496
Мочевина	Уреаза	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	142, 161, 497, 498
Глутамин	Глутаминаза	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	466
Аспарагин	Аспарагиназа	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	147
L-аминокислоты	L-аминооксидаза	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	140—142, 499
D-аминокислоты	D-аминооксидаза	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	147
Этиловый спирт	Алкогольоксидаза	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	491
Амидалин	β-глюкоцидаза	CN <sup>-</sup>	156, 157

Из прочих применений иммобилизованных ферментов следует назвать еще проведение направленного протеолиза при определении первичной структуры белков<sup>159, 224, 501</sup>. Для проявления электрофорограмм некоторых ферментов можно наложить на исследуемую полоску пластиночку из полиакриламида, в которой иммобилизованы необходимые для проявления ферменты и субстраты<sup>145</sup>. С этой целью для проявления фосфоглюкомутазы применяют пленку с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и для проявления пирофосфорилазы — пленку с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и фосфоглюкомутазой.

Терапевтическое действие парентерального введения растворимых ферментов известно уже давно. Среди многих применений ферментной терапии в последнее время наибольшее внимание заслужило лечение некоторых злокачественных новообразований аспарагиназой. Но успех ферментной терапии очень часто сводится на нет из-за быстрого разложения вводимого фермента в живом организме и из-за вызываемого вводимым ферментом как чужеродным белком серьезных иммунологических реакций. Путь к преодолению этих препятствий предвидится в замене нативных ферментов их нерастворимыми или растворимыми производными<sup>502</sup>. Конечно, введение иммобилизованных ферментов в кровяное русло возможно только в случае, когда размеры частиц препарата не превышают нескольких микрон. В частности, в этих целях рекомендуется применять микроИнкапсулированные ферменты. Эффективность инкапсулированных аспарагиназы<sup>242, 276, 503, 504</sup>, каталазы<sup>418, 505</sup> и стрептокиназы<sup>277</sup> уже доказана опытами на животных. Вводимые ферменты обладали ничтожной иммуногенностью и большей стабильностью. Но пока не вполне ясно, как организм реагирует на длительное введение значительных количеств полимерного носителя фермента. Ввиду этого может быть целесообразно применять биологически разлагаемые полисахаридные носители.

Принципиально иной путь применения иммобилизованных ферментов для направленного изменения состава крови заключается в про-

пускации крови через ферментную колонку вне организма. Например, рекомендована замена громоздкой и дорогостоящей диализной установки «искусственной почки» небольшой колонкой и иммобилизованной уреазой<sup>129, 414, 458</sup>. В колонке должен содержаться также сорбент для связывания образующегося аммиака.

Контакт многих полимерных материалов с кровью вызывает вредный для организма человека гемолиз и весьма опасное тромбообразование. С целью получения улучшенных имплантационных материалов рекомендовано выпускать полимеры со связанными на них протеолитическими ферментами или белками<sup>151</sup>. Такого же типа материалы применены для лечения ожогов и ран<sup>446</sup>.

Вышеприведенные примеры показывают возможности применения иммобилизованных ферментов в медицинской практике. Однако осуществление этих возможностей, по-видимому, еще сложнее, чем модификация технологических процессов или создание новых аналитических методов.

*Дополнение при корректуре.* За время подготовки статьи к печати число публикаций и патентов по иммобилизованным ферментам увеличилось почти в два раза, однако, включить этот материал в данный обзор не представлялось возможным. Состоялся также ряд симпозиумов, посвященных тому же вопросу. Среди них необходимо отметить I-ый Всесоюзный симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов<sup>506</sup> (май 1974 г., г. Таллин).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. P. V. Sundaram и др., Biotechn. Bioengn. Symp., 3, 15 (1972).
2. J. H. Silman, E. Katchalski, Ann. Rev. Biochem., 35, 873 (1966).
3. L. Goldstein, E. Katchalski, Ztschr. analyt. Chem., 243, 375 (1968).
4. L. Goldstein, в книге Fermentation Advances, Acad. Press, N. Y., 1969, стр. 391.
5. L. Goldstein, Meth. Enzymol., 19, 935 (1970).
6. E. Katchalski, J. Silman, R. Goldman, Adv. Enzymol., 34, 445 (1971).
7. R. Goldman, L. Goldstein, E. Katchalski, В книге G. R. Stark, Biochemical aspects of reactions on solid supports, Acad. Press, N. Y. 1971, стр. II.
8. A. S. Lindsey, J. Macromolec., C3, 1 (1969).
9. B. Alexander, A. M. Engel, Meth. Enzymol., 19, 978 (1970).
10. E. M. Crook, K. Brocklehurst, C. W. Wharton, Там же, 19, 963 (1970).
11. A. D. McLaren, L. Packer, Adv. Enzymol., 33, 245 (1970).
12. E. Brown, A. Racois, Bull. soc. chim. France, 1971, 4613.
13. F. Friedberg, Chromatogr. Revs., 14, 121 (1971).
14. J. Gryszkiewich, Folia Biologica, 19, 119 (1971).
15. G. J. H. Melrose, Rev. Pure Appl. Chem., 21, 83 (1971).
16. P. Pihar, Chem. Listy, 65, 713 (1971).
17. R. Carbonell, M. D. Kostin, Am. Ind. Chem. Eng. J., 18, 1 (1972).
18. H. O. Hultin, I. R. Kittrell, R. L. Laurence, Enz. Technol. Dig., 1, 16 (1972).
19. H. D. Orth, W. Brümmer, Angewand. Chem., 84, 319 (1972).
20. А. И. Кестнер, М. И. Креен, Ин-т научно-техн. информ. ЭССР, Таллин, 1973.
21. P. Cuatrecasas, C. B. Anfinsen, Meth. Enzymol., 22, 345 (1970).
22. P. Cuatrecasas, см. 7 стр. 79.
23. P. Cuatrecasas, C. B. Anfinsen, Ann. Rev. Biochem., 40, 259 (1971).
24. P. Cuatrecasas, Adv. Enzymol., 36, 29 (1972).
25. G. Feinstein, Naturwiss., 58, 389 (1971).
26. R. H. Reiner, A. Walch, Chromatogr., 4, 578 (1971).
27. G. Zweig, J. E. Sherma, Anal. Chem., 44, № 5, 42 R (1972).
28. Л. А. Черкасов, Успехи химии, 41, 1911 (1972).
29. J. M. Nelson, E. G. J. Griffin, J. Am. Chem. Soc., 38, 1109 (1916).
30. J. M. Nelson, D. J. Hitchcock, Там же, 43, 1956 (1921).
31. I. Langmuir, V. J. Schaefer, Там же, 60, 1351 (1938).
32. I. Langmuir, V. J. Schaefer, Chem. Rev., 24, 181 (1939).
33. Вестник АН СССР, 1972, № 6, 20.
34. K. Miyamoto, T. Fujii, Y. Miura, J. Ferment. Technol., 49, 565 (1971).
35. R. A. Messing, Enzymologia, 39, 12 (1970).
36. Е. С. Хорикова, А. В. Шерев, О. М. Полторак, Вестн. МГУ, II, № 6, 12 (1969).
37. А. В. Шерев, О. М. Полторак, Там же, II, № 1, 18 (1970).

38. А. Л. Камышинский, Е. С. Чухрай, *ЖФХ*, **47**, 883 (1973).
39. Е. А. Тверитинова, Н. И. Лобода, Е. С. Чухрай, О. М. Полторак, *Там же*, **12**, 526 (1971).
40. Е. С. Чухрай, О. М. Полторак, *Там же*, **11**, 10 (1970).
41. М. Г. Гольдфельд, Е. С. Воробьева, *ЖФХ*, **40**, 2594 (1966).
42. Е. С. Чухрай, О. М. Полторак, *Вестн. МГУ*, II, № 5, 41 (1967).
43. Е. А. Тверитинова, Е. Кирай, Е. С. Чухрай, О. М. Полторак, *Там же*, II, № 6, 16 (1969).
44. Ю. А. Жирков, Е. С. Чухрай, О. М. Полторак, *Там же*, II, 405 (1971).
45. D. L. Marshall, J. L. Walter, R. D. Falb, *Biotechnol. Bioengn. Symp.*, 3, 195 (1972).
46. R. A. Messing, *Enzymologia*, **38**, 370 (1970).
47. P. Johnson, T. L. Whateley, *Biochim. biophys. acta*, **276**, 323, (1972).
48. G. Manecke, *Pure Appl. Chem.*, **4**, 507 (1962).
49. Франц. пат. 2020661 (1970). *Bull. Off. Propri. Ind.*, 16755 (1970).
50. Е. С. Чухрай, А. Л. Николаев, Б. Н. Кирин и др., *ЖФХ*, **43**, 2805 (1969).
51. L. B. Barnett, H. B. Bull, *Biochim. biophys. acta*, **36**, 244 (1959).
52. L. A. Sluyterman, J. Wijdenes. *Там же*, **200**, 593 (1970).
53. I. Chibaia, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, Y. Matsuo, *4 Int. Ferm. Symp.*, 1972, F8-7.
54. О. М. Полторак, Е. С. Чухрай, *Вестн. МГУ*, сер. II, № 2, 133 (1970).
55. О. М. Полторак, Е. С. Чухрай, Высшая школа, М., 1971, 256.
56. Д. Г. Звягинцев, Л. Я. Великанов, II Всес. биохим. съезд, Ташкент, 1969, тема 2—2—5, 18.
57. D. J. Ross, B. A. McNeilly, A. Barbara, *Soil Biol. Biochem.*, **4**, 9 (1972).
58. A. Kimura, X. Sirasaki, C. Usami, *J. Chem. Soc. Japan. Industr. Chem. sect.*, **62**, 489 (1969).
59. S. Usami, N. Taketomi, *Hakko Kyokaishi*, **23**, 267 (1965).
60. A. D. McLaren, *Enzymologia*, **21**, 356 (1960).
61. A. D. McLaren, E. F. Estermann, *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**, 157 (1956).
62. A. D. McLaren, *Там же*, **68**, 158 (1957).
63. A. D. McLaren, *Science*, **125**, 697 (1957).
64. J. J. Skujins, E. F. Estermann, A. D. McLaren, *Canad. J. Microbiol.*, **5**, 631 (1959).
65. M. Kroll, M. Kramer, *Naturwiss.*, **42**, 157 (1955).
66. I. R. Ramirez-Martinez, A. D. McLaren, *Enzymologia*, **31**, 23 (1966).
67. G. Durand, C. r., **259**, 3397 (1964).
68. L. A. Pinck, F. E. Allison, *Soil Sci.*, **91**, 183 (1961).
69. P. V. Sundaram, E. M. Crook, *Canad. J. Biochem.*, **49**, 1388 (1971).
70. D. Y. Ryu, C. F. Bruno, B. K. Lee, см. <sup>53</sup>, F7(1)-7,53.
71. A. Traub, E. Kaufmann, Y. Teitz, *Anal. Biochem.*, **28**, 465 (1969).
72. I. K. Paunio, *J. Dent. Res.*, **51**, 339 (1972).
73. C. Schwabe, *Biochemistry*, **8**, 795 (1969).
74. T. Tetryua, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Enzymologia*, **31**, 214 (1966).
75. Венг. пат. 150782 (1964); C. A., **60**, 7414F (1964).
76. S. Usami, M. Matsubawa, I. Noda, *Hakko Kyokaishi*, **29**, 195 (1971).
77. Е. С. Воробьева, *ЖФХ*, **40**, 2596 (1966).
78. О. М. Полторак, Е. С. Воробьева, *Там же*, **40**, 1665 (1966).
79. B. Z. Siegel, S. M. Siegel, *Nature*, **186**, 391 (1960).
80. M. Mandels, J. Kostick, R. Parizek, *J. Polymer Sci. C*, № 36, 445 (1971).
81. G. L. Fletcher, S. Okada, *Nature*, **176**, 882 (1955).
82. R. Goldman, H. M. Lenhoff, *Biochim. biophys. acta*, **242**, 514 (1971).
83. K. P. Wheeler, B. A. Edwards, R. Whittam, *Там же*, **191**, 187 (1969).
84. G. Sauermann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 738 (1970).
85. I. Urabe, H. Okada, см. <sup>53</sup>, F8-3, 64. ,
86. I. Urabe, H. Okada, см. <sup>53</sup>, F8-3, 67.
87. Z. Schneider, A. Stroinitzki, J. Pawelkiewicz, *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **16**, 203 (1968).
88. M. A. Mitz, *Science*, **123**, 1076 (1956).
89. H. Suzuki, Y. Ozawa, H. Maeda, *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 807 (1966).
90. M. J. Bachler, G. W. Strandberg, K. I. Smile, *Biotechnol. Bioengn.*, **12**, 85 (1970).
91. L. K. Smile, *Там же*, **13**, 309 (1971).
92. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Enzymologia*, **31**, 225 (1966).
93. T. Tosa, I. Chibata, *Hakko Kyokaishi*, **25**, № 2, 49 (1967).
94. T. Barth, H. Maskova, *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, **36**, 2398 (1971).
95. M. A. Mitz, R. G. Schulzeter, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4024 (1959).
96. M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioengn.*, **13**, 589 (1971).
97. А. Я. Николаев, *Биохимия*, **27**, 843 (1962).
98. S.-T. Chung, M. Hamano, K. Aida, T. Uemura, *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1287 (1968).
99. Англ. пат. 1274158 (1972); Изобр. за рубежом. гр. 15, 11, 43 (1972).
100. W. Becker, E. Pfeil, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4299 (1966).
101. T. Tosa, T. Mori, I. Chibata, *Enzymologia*, **40**, 49 (1971).

102. *T. Tosa, T. Mori, I. Chibata*, Biotechnol. Bioengn., 9, 603 (1967).
103. *S. Ogino*, Agric. Biol. Chem., 34, 1268 (1970).
104. *H. Brandenberger*, Angew. Chem., 67, 661 (1955).
105. *Y. K. Park, D. C. Lima*, см. <sup>53</sup>, G8-5, 238.
106. Пат. ФРГ 1917057 (1969); Aussz. Off. I, 2782 (1969).
107. *J. P. Roozen, W. Pilnik*, Lebensmitt.-Wiss. Technol., 4, № 3, 93 (1971).
108. *A. Я. Николаев, С. Р. Мардашев*, Биохимия, 26, 641 (1961).
109. *J. Gryszkiewicz, E. D. Ziember, W. Ostrowski*, Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Biol., 11-18, 439 (1970).
110. *Р. Б. Пономарева*, Сб. 3-й симпозиум по физиол. активн. синтет. полимерам и макромолекул. моделям биополимеров. Тезисы докл., «Зинатне», Рига, 1971, стр. 23.
111. *E. Brown, A. Racois*, Tetrahedron Letters, 15, 1047 (1971).
112. *R. O. Stasiw, A. B. Patel, F. X. Hasselberger, H. D. Brown*, Biophys. Soc. Abstr., 14, 149a (1970).
113. *I. C. Cho, H. E. Swaisgood*, Biochim. biophys. acta, 258, 675 (1972).
114. *М. А. Мкртумова, Г. А. Деборин*, ДАН, 146, 1434 (1962).
115. *С. В. Кольцова, М. В. Гликкина, Н. Г. Илларионова, Г. В. Самсонов*, Молекул. биол., 5, 225 (1971).
116. *С. В. Кольцова, М. В. Гликкина, Г. В. Самсонов*, Изв. АН СССР, сер. хим., 1970, 1895.
117. *С. В. Кольцова, Э. Н. Морозова, Б. В. Москвичев, Г. Д. Рудовская, Г. В. Самсонов*, Всес. симп. по химии протеолит. ферментов, Вильнюс, 1973, стр. 76.
118. *Н. П. Кузнецова, М. В. Гликкина, Н. А. Андреева, Н. Г. Илларионова, Л. А. Волкова, Г. В. Самсонов*, Молекул. биол., 7, 42 (1973).
119. *T. Sato, T. Mori, T. Tosa, I. Chibata*, Arch. biochem. biophys., 147, 788 (1971).
120. *S. N. Pennington, H. D. Brown, A. B. Patel, C. O. Knowles*, Biochim. biophys. acta, 167, 479 (1968).
121. Франц. пат. 2019322 (1970); Bull. Off. Propri. Ind., 15004 (1970).
122. Пат. ФРГ 1939347 (1970); С. А., 73, 10964p (1970).
123. Чехосл. пат. 113908 (1965). С. А., 63, 19001B (1965).
124. Ам. пат. 3223593 (1965); С. А., 64, 7034H (1966).
125. *G. G. Guilbault, D. N. Kramer*, Anal. Chem., 37, 1675 (1965).
126. *G. G. Guilbault, J. Das*, Anal. Biochem., 33, 341 (1970).
127. *W. R. Vieth, S. S. Wang*, Biotechnol. Bioengng. Symp., 3, 285 (1972).
128. *D. Hopwood, C. R. Allen, M. McCabe*, Histochem. J., 2, 137 (1970).
129. *S. N. Pennington, H. D. Brown, A. B. Patel, S. K. Chattopadhyay*, J. Biomed. Mater. Res., 2, 443 (1968).
130. *I. Karube, S. Suzuki*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 51 (1972).
131. *S. Suzuki, I. Karube, I. Watanabe*, см. <sup>53</sup>, F8-5, 70.
132. *W. R. Vieth, S. G. Gilbert, S. S. Wang*, см. <sup>53</sup>, G8-3, 237.
133. *J. Dobo*, Acta Chim. Acad. Scient. Hung., 63, 453 (1970).
134. Англ. пат. 1238280 (1971); Ред. патентных заявок Великобр. гр. XII, 17, 8 (1972).
135. *S. J. Updike, G. P. Hicks*, Nature, 214, 986 (1967).
136. *S. J. Updike, G. P. Hicks*, Science, 158, 270 (1967).
137. *G. P. Hicks, S. J. Updike*, Anal. Chem., 38, 726 (1966).
138. *М. И. Креен, А. И. Кестнер, К. А. Каск*, Труды ТПИ, Таллин, 1973, № 331, 147.
139. *L. B. Wingard, C. C. Lin, N. L. Nagda*, Biotechnol. Bioengn., 1971, 629.
140. *G. G. Guilbault, E. Hrabankova*, Anal. Letters, 3, № 2, 53 (1970).
141. *G. G. Guilbault, E. Hrabankova*, Anal. Chem., 42, 1779 (1970).
142. *G. G. Guilbault*, Biotechnol. Bioengn. Symp., 3, 361 (1972).
143. Пат. ФРГ 1959169 (1970); С. А., 73, 31926t (1970).
144. *H. Fritz, H. Schult, M. Hutzel, M. Wriedemann, E. Werle*, Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem., 348, 308 (1967).
145. *O. Gabriel*, Meth. Enzymol., 22, 578 (1971).
146. *K. Mosbach, B. O. Mattiasson*, Acta Chem. Scand., 24, 2093 (1970).
147. *G. G. Guilbault, E. Hrabankova*, Anal. Chem. acta, 56, 258 (1971).
148. *M. Ploeg, P. Van der Duijn*, J. Roy. Microbiol. Soc., 83, 415 (1964).
149. *H. D. Brown, A. Patel, S. K. Chattopadhyay*, J. Chromatogr., 35, 103 (1968).
150. *P. Bernfeld, J. Wan*, Science, 142, 678 (1963).
151. *R. D. Falb, G. A. Grode*, Feder. Proc., 30, 1688 (1971).
152. *C. Gruesbeck, H. F. Rase*, Ind. Engn. Chem. Prod. Res. Develop., 11, 74 (1972).
153. *М. И. Креен, А. И. Кестнер, К. А. Каск*, Труды ТПИ, 1971, сер. А, № 300, 21.
154. *М. И. Креен, А. И. Кестнер, К. А. Каск*, Там же, 1973, № 331, 117.
155. *Р. Э. Трейман, А. И. Кестнер, М. И. Креен*, Тезисы секц. сообщ. II. Всесоюзн. биохим. съезда, 1969, 68.
156. *R. A. Lienado, G. A. Rechnitz*, Anal. Chem., 43, 1457 (1971).
157. *G. A. Rechnitz, R. Lienado*, Там же, 43, 283 (1971).
158. *H. Nilsson, R. Mosbach, K. Mosbach*, Biochim. biophys. acta, 268, 253 (1972).
159. *K. Mosbach, R. Mosbach*, Acta Chem. Scand., 20, 2807 (1966).

160. R. Goldman, O. Kedem, E. Katchalski, *Biochemistry*, **7**, 4518 (1968).
161. G. G. Guilbault, J. G. Montalvo, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2164 (1969).
162. Y. Degani, T. Miron, *Biochim. biophys. acta*, **212**, 362 (1970).
163. T. Mori, T. Sato, I. Chibata, *Enzymologia*, **43**, 213 (1972).
164. Z. Lojda, M. van der Ploeg, P. van der Duijn, *Histochemie*, **11**, 13 (1967).
165. P. van Duijn, M. van der Ploeg, в книге G. L. Weid, G. F. Bahr, *Introduction to Quantitative Cytochemistry*, Acad. Press, N. Y.—London, **11**, 228 (1970).
166. H. D. Brown, A. B. Patel, S. K. Chattopadhyay, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2**, 231 (1968).
167. P. Bernfeld, R. E. Bieber, D. M. Watson, P. C. McDonnell, *Federat. Proc.*, **28**, 534 (1969).
168. P. Bernfeld, R. E. Bieber, P. C. McDonnell, *Arch. biochem. biophys.*, **127**, 779 (1968).
169. P. Bernfeld, R. E. Bieber, Там же, **131**, 587 (1969).
170. Яп. пат. 7017587 (1970); С. А., **73**, 86574g (1970).
171. P. Bernfeld, R. E. Bieber, D. M. Watson, *Biochim. biophys. acta*, **191**, 570 (1969).
172. G. W. Strandberg, K. L. Smiley, *Appl. Microbiol.*, **21**, 588 (1971).
173. K. Mosbach, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2084 (1970).
174. G. G. Guilbault, *Enz. Techn. Digest*, **1**, 73 (1972).
175. M. Miyamura, S. Suzuki, *J. Chem. Soc. Japan, Chem. Ind. Sect. Chem.*, **1972**, 1274.
176. N. E. Franks, *Biochim. biophys. acta*, **252**, 246 (1971).
177. N. E. Franks, *Biotechnol. Bioengn. Symp.*, **3**, 327 (1972).
178. K. Mosbach, Там же, **3**, 189 (1972).
179. K. Mosbach, P. O. Larsson, *Biotechnol. Bioengn.*, **12**, 19 (1970).
180. S. J. Updike, R. Harris, *Nature*, **224**, 1122 (1969).
181. H. Silman, M. Abu-Weissenberg, E. Katchalski, *Biopolymers*, **4**, 411 (1966).
182. Пат. ФРГ 1915970; Ausz. Off., 2619 (1969).
183. E. Selegny, S. Avrameas, G. Brown, D. Thomas, С. р. (С), **266**, 1968 (1968).
184. R. Goldman, H. Silman, S. Caplan, O. Kedem, E. Katchalski, *Science*, **150**, 758 (1965).
185. T. Kotchalski, *Symmetry Funct. Biol. Syst. Macromol. Level, Proc. Nobel Symp.* 11th, **1969**, 283.
186. Ам. пат. 3519538 (1970); РЖ Биохим., **1971**, 9Ф1673.
187. H. H. Weetall, G. Baum, *Biotechnol. Bioengn.*, **12**, 399 (1970).
188. R. D. Mason, H. H. Weetall, Там же, **14**, 637 (1972).
189. H. H. Weetall, *Science*, **166**, 615 (1969).
190. G. P. Royer, G. M. Green, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 426 (1971).
191. H. H. Weetall, *Nature*, **223**, 959 (1969).
192. H. H. Weetall, M. A. Jacobson, см. <sup>53</sup>, F8-2, 66.
193. H. H. Weetall, L. S. Hersh, *Biochim. biophys. acta*, **185**, 464 (1969).
194. G. Baum, F. B. Wand, H. H. Weetall, Там же, **268**, 411 (1972).
195. H. H. Weetall, *Nature*, **232**, 473 (1971).
196. M. J. Grove, G. W. Strandberg, K. L. Smiley, *Biotechnol. Bioengn.*, **13**, 709 (1971).
197. G. W. Strandberg, K. L. Smiley, Там же, **14**, 509 (1972).
198. M. K. Weibel, H. H. Weetall, H. J. Bright, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 347 (1971).
199. M. K. Weibel, E. R. Dougle, A. E. Humphrey, H. J. Bright, *Biotechnol. Bioengn. Symp.*, **3**, 167 (1967).
200. W. E. Hornby, H. Filippusson, A. McDonald, *FEBS Letters*, **9**, 8 (1970).
201. H. Brandenberger, *Rev. Ferment. Ind. Aliment.*, **11**, 237 (1956).
202. J. A. Hourigan, G. J. H. Melrose, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **6**, 761 (1972).
203. T. Fukushi, T. Toshizo, *J. Biochem. (Japan)*, **64**, 283 (1968).
204. N. Grubhofer, L. Schleicht, *Naturwissenschaften*, **40**, 508 (1953).
205. Пат. ФРГ 1517761 (1970); Ausz. Off., 330 (1970).
206. A. M. Engel, B. Alexander, *J. Biol. Chem.*, **246**, 1213 (1971).
207. Ам. пат. 3167485 (1965); С. А., **62**, 16574c (1965).
208. Q. Z. Hussain, T. F. Newcomb, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **115**, 301 (1964).
209. P. Cresswell, A. R. Sanderson, *Biochem. J.*, **119**, 447 (1970).
210. E. Riesel, E. Katchalski, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1521 (1964).
211. S. Rimon, Y. Stupp, A. Rimon, *Canad. J. Biochem.*, **44**, 415 (1966).
212. B. Alexander, A. Rimon, E. Katchalski, *Thrombos Diathes. Haemorrh.*, **16**, 507 (1966).
213. A. Rimon, B. Alexander, E. Katchalski, *Biochemistry*, **5**, 792 (1966).
214. A. Bar-Eli, E. Katchalski, *Nature*, **188**, 856 (1960).
215. J. Cebra, D. Givol, H. Silman, E. Katchalski, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1720 (1961).
216. Пат. ФРГ 2062246 (1971); С. А., **75**, 1050f (1971).
217. S. A. Barker, P. J. Somers, *Carbohydr. Res.*, **9**, 257 (1969).
218. Пат. ФРГ 2012089 (1970); С. А., **74**, 9896g (1971).
219. M. Lilly, C. Money, W. Hornby, E. Crook, *Biochem. J.*, **95**, 45P (1965).
220. W. G. Owen, R. H. Wagner, *Am. J. Physiol.*, **220**, 1941 (1971).
221. R. Epton, T. H. Thomas, *An introduction to water-insoluble enzymes*, Koch-Light. Lab. Ltd, Colnbrook, 1971, 28.
222. S. A. Barker, P. J. Somers, R. Epton, J. McLaren, *Carbohydr. Res.*, **14**, 287 (1970).

223. R. Epton, T. H. Thomas, *Aldrichim. acta*, **4**, 61 (1971).
224. D. H. Calam, H. J. Thomas, *Biochim. biophys. acta*, **276**, 328 (1972).
225. Ам. пат. 3597220 (1971); C. A., **75**, 128507m (1971).
226. A. Lucacchini, G. Ronca, N. Montali, C. A. Rossi, *Int. J. Prot. Res.*, **4**, 57 (1972).
227. C. L. Mühltreiter, F. B. Weakly, *Biotechnol. Bioengn.*, **14**, 281 (1972).
228. Ам. пат. 3647630 (1972); Изобр. за рубежом, гр. 15, 8, 126 (1972).
229. A. Schejter, A. Bar-Eli, *Arch. biochem. biophys.*, **136**, 325 (1970).
230. M. T. S. Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1531 (1971).
231. L. K. Ferrier, T. Richardson, N. E. Olson, *Enzymologia*, **42**, 273 (1972).
232. S. Avrameas, T. Ternynck, *Immunochem.*, **6**, 53 (1969).
233. S. Avrameas, B. Guilbert, *Biochemie*, **53**, 603 (1971).
234. C. K. Glassmeyer, Ph. D. Thesis, Univ. Cincinnati, 1971.
235. E. F. Jansen, Y. Tomimatsu, A. C. Olson, *Arch. biochem. biophys.*, **144**, 394 (1971).
236. Y. Tomimatsu, E. F. Jansen, W. Gaffield, A. C. Olson, *J. Colloid Interface Sci.*, **36**, 51 (1971).
237. L. A. A. Stuyterman, M. I. M. Graaf, *Biochim. biophys. acta*, **171**, 277 (1969).
238. S. H. Ashoor, R. A. Sair, N. F. Olson, T. Richardson, Там же, **229**, 423 (1971).
239. M. Ottesen, B. Svensson, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, **38**, 171 (1971).
240. E. F. Jansen, A. C. Olson, *Arch. biochem. biophys.*, **129**, 221 (1969).
241. P. Witt мл., R. A. Save, T. Richardson, N. Olson, *Brev. Dig.*, **45**, 2 (1970).
242. F. A. Quiocho, F. M. Richards, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**, 833 (1964).
243. W. H. Bishop, F. A. Quiocho, F. M. Richards, *Biochemistry*, **5**, 4077 (1966).
244. F. A. Quiocho, F. M. Richards, Там же, **5**, 4062 (1966).
245. K. Ogata, M. Ottesen, I. Svendsen, *Biochim. biophys. acta*, **159**, 403 (1968).
246. G. Brown, E. Selegny, S. Avrameas, D. Thomas, Там же, **185**, 260 (1969).
247. H. D. Brown, W. S. Matthews, S. K. Chattopadhyay, A. Patel, S. N. Pennington, Там же, **279**, 356 (1972).
248. R. Haynes, K. A. Walsh, *Federat. Proc.*, **28**, 534 (1969).
249. C. K. Glassmeyer, J. D. Ogle, *Biochem.*, **10**, 786 (1971).
250. A. F. Habeeb, *Arch. biochem. biophys.*, **119**, 264 (1967).
251. E. B. Kearney, J. I. Salach, W. H. Walker, R. Sang, T. P. Singer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 490 (1971).
252. M. L. Green, G. Crutchfield, *Biochem. J.*, **115**, 183 (1969).
253. J. Lynn, R. D. Falb, *Abstr. 1158th Meet. Am. Chem. Soc. Biol. Sect.*, 1969, Contr. 297.
254. D. Inman, W. E. Hornby, *Biochem. J.*, **129**, 225 (1972).
255. H. Filippuson, W. E. Hornby, A. McDonald, *FEBS Letters*, **20**, 291 (1972).
256. J. P. Allison, L. Davidson, A. Hartman-Gutierrez, G. B. Kitto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 66 (1972).
257. W. J. Mandy, J. P. Allison, G. B. Kitto, *Federat. Proc.*, **31**, 496 (1972).
258. T. Ternynck, S. Avrameas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1574 (1971).
259. P. O. Weston, S. Avrameas, Там же, **45**, 1574 (1971).
260. R. Epton, J. V. McLaren, T. H. Thomas, *Biochem. J.*, **123**, 21 (1971).
261. R. Epton, J. V. McLaren, T. M. Thomas, *Carbohyd. Res.*, **22**, 301 (1972).
262. Пат. ФРГ 2104810 (1971); C. A., **76**, 1190u (1972).
263. Франц. пат. 2022145 (1970).
264. T. Takami, T. Akdo, *Seikagaku*, **40**, 749 (1968).
265. В. И. Суровцев, Л. В. Козлов, В. К. Антонов, *Биохимия*, **36**, 199 (1971).
266. Б. П. Суриков, Там же, **31**, 387 (1966).
267. В. И. Суровцев, Л. В. Козлов, В. К. Антонов, *ДАН*, **195**, 1463 (1970).
268. Т. В. Долгих, В. И. Суровцев, Л. В. Козлов, В. К. Антонов и др., *Прикл. биохимия и микробиол.*, **7**, 686 (1971).
269. Пат. ФРГ 1930057 (1970); C. A., **74**, 50078e (1971).
270. W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook, *Biochem. J.*, **98**, 420 (1966).
271. A. B. Patel, F. X. Hasselberger, C. Ghiren, H. D. Brown, *Biophys. J.*, **10**, 150A (1970).
272. A. A. M. Gribnau, J. G. G. Schoenmakers, M. van Kraaskamp, H. Bloemendaal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 1064 (1970).
273. R. A. Zingaro, M. Uziel, *Biochim. biophys. acta*, **213**, 371 (1970).
274. R. Whittam, B. Edwards, K. Wheeler, *Biochem. J.*, **107**, 38 (1968).
275. Франц. пат. 2005645 (1969); *Bull. Off. Propri. Ind.*, 1349 (1970).
276. F. X. Hasselberger, H. D. Brown, *Cancer Res.*, **30**, 2736 (1970).
277. Пат. ФРГ 2059165 (1971); C. A., **75**, 95019y (1971).
278. P. Liu-Osheroff, R. J. Guillory, *Biochem. J.*, **127**, 419 (1972).
279. H. Maeda, H. Suzuki, J. Agr. Chem. Soc. Japan, **44**, 547 (1970).
280. G. G. Guilbault, G. J. Lubrano, *Anal. chem. acta*, **60**, 254 (1972).
281. F. B. Erlanger, M. F. Isambert, A. M. Michelson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 70 (1970).
282. S. A. Barker, P. J. Somers, R. Epton, *Carbohyd. Res.*, **14**, 323 (1970).
283. H. Fritz, M. Gebhardt, R. Meister, H. Schult, *Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem.*, **351**, 1119 (1970).

284. *J. K. Inman, M. M. Dintzis*, *Biochem.*, 8, 4074 (1969).
285. *Y. Ohno, M. A. Stahmann*, *Macromolecules*, 4, 350 (1971).
286. Японск. пат. 7006875 (1970); С. А., 73, 109659 (1970).
287. *С. К. Василенко, А. Г. Беньяминова, Л. Д. Детиненко, Г. А. Ким, Д. Г. Кнорре*, *Биохимия*, 37, 527 (1972).
288. Пат. ФРГ 2036180 (1971); С. А., 75, 3921f (1971).
289. Англ. пат. 1174854 (1959); С. А., 72, 101121g (1970).
290. *W. E. Hornby, H. H. Filippuson*, *Biochim. biophys. acta*, 220, 343 (1970).
291. *H. Fritz, K. Hochstrasser, E. Werle*, *Ztschr. Analyt. Chem.*, 243, 452 (1968).
292. *L. Goldstein, Y. Levin, E. Katchalski*, *Biochem.*, 3, 1913 (1964).
293. *Y. Levin, M. Pecht, L. Goldstein, E. Katchalski*, *Biochem.*, 3, 1905 (1964).
294. *E. B. Ong, Y. Tsang, G. E. Perlmann*, *J. Biol. Chem.*, 241, 5661 (1966).
295. *S. Lowey, L. Goldstein, S. Luck*, *Biochem. Ztschr.*, 345, 248 (1966).
296. *C. Cohen, H. Slayter, L. Goldstein, B. Kucua, C. Hall*, *J. Mol. Biol.*, 22, 385 (1966).
297. *L. Goldstein*, *Anal. Biochem.*, 50, 40 (1972).
298. Англ. пат. 1274869 (1972); Изобр. за рубежом, гр. 15, 11, 13 (1972).
299. Ам. пат. 3616229 (1971).
300. Ам. пат. 3650901 (1972); Изобр. за рубежом, гр. 15, 8, 126 (1972).
301. Пат. ФРГ 1948273 (1970); Ausz. Off., 1472 (1970).
302. *L. Goldstein, A. Lifshitz, M. Sokolovsky*, *J. Biochem.*, 2, 448 (1971).
303. *W. Brummer, N. Henrich u. dr.*, *Eur. J. Biochem.*, 25, 129 (1972).
304. *A. Conte, K. Lehmann*, *Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem.*, 352, 533 (1971).
305. *J. Porath, R. Axen, S. Ernback*, *Nature*, 215, 141 (1967).
306. *S. Gestrelus, B. Mattiasson, K. Mosbach*, *Biochim. Biophys. acta*, 278, 339 (1972).
307. *G. S. David*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 464 (1972).
308. *S. Grossman, M. Trop, A. Pinsky, P. Budowski*, *Isr. J. Chem.*, 8, 151 (1970).
309. *A. E. Chung*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 152, 125 (1972).
310. *K. F. O. Driscoll, M. Izu, R. Korus*, *Amer. Chem. Soc. Polym. Prep.*, 13, 844 (1972).
311. *A. E. Chung, L. E. Middleditch*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 152, 539 (1972).
312. *O. R. Zaborsky, J. Ogletree*, *Biochim. Biophys. acta*, 289, 68 (1972).
313. *R. Axen, B. A. Myrin, J. C. Janson*, *Biopolymers*, 9, 401 (1970).
314. *D. Gabel, P. Vretblad, R. Axen, J. Porath*, *Biochim. Biophys. acta*, 214, 561 (1970).
315. *K. K. Stewart, R. F. Doherty*, *FEBS Letters*, 16, 226 (1971).
316. *R. Axen, S. Ernback*, *Eur. J. Biochem.*, 18, 351 (1971).
317. *J. Chauvet, R. Acher*, *FEBS Letters*, 23, 317 (1972).
318. *M. K. Joustra*, *18th Colloq. Protides of the Biol. Fluids*, 18, 439 (1971).
319. *R. Axen, P. Vretblad*, Там же, 18, 383 (1971).
320. *P. Vretblad, R. Axen*, *FEBS Letters*, 18, 254 (1971).
321. *M. Bustin, A. Conway-Jacobs*, *J. Biol. Chem.*, 246, 615 (1971).
322. *T. Seki, T. A. Janssen, Y. Levin, E. G. Erdös*, *Nature*, 225, 864 (1970).
323. *L. Sundberg, T. Kristiansen*, *FEBS Letters*, 22, 175 (1972).
324. *R. Koelsh*, *Enzymologia*, 42, 257 (1972).
325. *J. Lasch, M. Iwig, H. Hanson*, *Eur. J. Biochem.*, 27, 431 (1972).
326. *B. Hofsten, D. Gabel, P. A. Myrin, G. Nassen*, *4th Int. Ferm. Symp.*, 1972, 68-2, 236.
327. *D. Gabel, B. Hofsten*, *Eur. J. Biochem.*, 15, 410 (1970).
328. *T. H. Gawronski, F. Wold*, *Biochemistry*, 11, 449 (1972).
329. *D. Givol, Y. Weinstein, M. Gorecki, M. Wilchek*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 825 (1970).
330. *G. S. Omenn, D. A. Ontjes, C. B. Anfinsen*, *Nature*, 225, 189 (1970).
331. *J. C. Lee*, *Biochim. biophys. acta*, 235, 435 (1971).
332. *M. Wilchek*, *FEBS Letters*, 7, 161 (1970).
333. *R. Axen, J. Carlsson, J. C. Janson, J. Porath*, *Enzymologia*, 41, 359 (1971).
334. *M. Wilchek*, *Biochem. J.*, 127, 7P (1972).
335. *R. Axen, E. Heilbronn, A. Winter*, *Biochim. biophys. acta*, 11, 478 (1969).
336. Англ. пат. 1261711 (1972); Изобр. за рубежом, гр. 15, 8, 35 (1972).
337. *W. W.-C. Chan*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 1198 (1970).
338. *K. Feldman, H. Zeisel, E. Helmrich*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 2278 (1972).
339. *J. F. Kennedy, S. A. Barkey, A. Rosewear*, *J. Chem. Soc.*, 1972, 2568.
340. *J. Denburg, M. DeLuca*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 67, 1057 (1970).
341. *H. Maeda, H. Suzuki*, см. 53, 68-4, 237.
342. *C. H. Hoffman, E. Harris, S. Chodroff, S. Michelson, J. W. Rothrock*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 710, (1970).
343. Франц. пат. 2033404 (1970).
344. *S. Grossman, M. Trop, P. Budowski, M. Perl, A. Pinsky*, *Biochem. J.*, 127, 909 (1972).
345. *B. Mattiasson, K. Mosbach*, *Biochim. biophys. acta*, 235, 253 (1971).
346. *G. J. Beasley*, *Biochem. J.*, 117, 70P (1970).
347. *D. Gabel*, Там же, 127, 13P (1972).
348. *G. J. Beasley, E. McCairns*, *Biochim. biophys. acta*, 271, 204 (1972).
349. *R. Bohnensack, W. Augustin, E. Hoffmann*, *Experientia*, 25, 348 (1969).

350. G. R. Stark, Meth. Enzymol., 25B, 579 (1972).
351. I. Mezzasoma, C. Turano, Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., 47, 407 (1971).
352. N. Weliky, F. S. Brown, E. C. Dale, Arch. Biochem. Biophys., 131, 1 (1969).
353. H. H. Weetall, N. Weliky, Anal. Biochem., 14, 160 (1966).
354. Англ. пат. 1224181 (1968); Реф. патентных заявок Великобрит., гр. 12, 32, 26 (1968).
355. S. Shaltiel, R. Mizrahi, Y. Stupp, M. Sela, Eur. J. Biochem., 14, 509 (1970).
356. J. V. Miller, P. Cuatrecasas, E. B. Thompson, Biochim. biophys. acta, 276, 407 (1972).
357. G. Manecke, G. Günzel, Macromol. Chem., 51, 199 (1962).
358. G. Manecke, Pure Appl. Chem., 4, 507 (1962).
359. G. Manecke, S. Singer, Macromol. Chem., 39, 13 (1960).
360. G. Manecke, H. J. Forster, Там же, 91, 136 (1966).
361. G. Manecke, G. Günzel, J. Polymer Sci., 1970, 607.
362. Пат. ФРГ 1282579 (1965); С. А., 70, 74670К (1969).
363. Англ. пат. 1183260 (1970); Реф. патентных заявок Великобрит., гр. 12, 11-12, 24 (1970).
364. R. J. H. Wilson, G. Kay, M. Lilly, Biochem. J., 108, 845 (1968).
365. R. J. H. Wilson, M. D. Lilly, Biotechnol. Bioengn., 11, 349 (1969).
366. S. P. O'Neill, P. Dunnill, M. D. Lilly, Там же, 13, 337 (1971).
367. R. O. Stasiw, A. B. Patel, H. D. Brown, Там же, 14, 629 (1972).
368. Ю.-Афр. пат. 6804010 (1968); С. А., 71, 14363у (1969).
369. P. Monsan, G. Durand, FEBS Letters, 16, 39 (1971).
370. W. H. Stimson, A. Serafini-Fracassini, Там же, 17, 318 (1971).
371. Д. Л. Яглом, М. С. Шульман, А. Д. Вирник, Микробиол. пром., 3, 1 (1971).
372. G. Kay, M. D. Lilly, Biochim. biophys. acta, 198, 276 (1970).
373. S. P. O'Neill, J. R. Wykes, P. Dunnill, M. D. Lilly, Biotechnol. Bioengn., 13, 319 (1971).
374. D. A. Self, G. Kay, M. D. Lilly, P. Dunnill, Там же, 11, 337 (1969).
375. D. Warburton, K. Balasingham, P. Dunnill, M. D. Lilly, Biochim. biophys. acta, 284, 278 (1972).
376. R. O. Stasiw, H. E. Brown, F. X. Hasselberger, Canad. J. Biochem., 48, 1314 (1970).
377. R. J. H. Wilson, G. Kay, M. D. Lilly, Biochem. J., 109, 137 (1968).
378. E. Brown, A. Racois, Bull. soc. chim. France, 12, 5357 (1971).
379. E. Brown, A. Racois, H. Guenifjev, Там же, 12, 4341 (1971).
380. E. Brown, A. Racois, Там же, 12, 4351 (1971).
381. T. F. Newcomb, M. Hoshida, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17, 61 (1965).
382. H. Maeda, H. Suzuki, Agric. Biol. Chem., 36, 1581 (1972).
383. T. Sato, T. Mori, T. Tosa, I. Chibata, Arch. Biochem. Biophys., 147, 788 (1971).
384. H. Ozawa, J. Biochem., 62, 531 (1967).
385. S. S. Rao, V. M. Patki, A. E. Kulkarni, Indian J. Biochem., 7, 210 (1970).
386. Ам. пат. 2047495 (1971).
387. Р. К. Антонян, А. А. Никитенко, Н. А. Фром, Пробл. гематол., перелив. крови, 16, 55 (1971).
388. P. Monsan, G. Durand, С. г., C273, 33 (1971).
389. L. Hough, Nature, 235, 389 (1972).
390. A. N. Emery, J. S. Hough, J. M. Novais, T. P. Lyons, Chem. Engineer (L), № 258, 71 (1972).
391. A. N. Emery, J. S. Hough, Chem. Eng. (Gr. Brit.), 258, 71 (1972).
392. Ам. пат. 3672955 (1972); С. А., 77, 99669z (1972).
393. Яп. пат. № 8910 (1967); Токкё-Хоко, Сеп. 1, № 332 (1967).
394. G. Manecke, G. Guenzel, Naturwiss., 54, 531 (1967).
395. R. Axen, P. Vretblad, J. Porath, Acta Chem. Scand., 25, 1129 (1971).
396. L. Kagedal, S. Akerström, Там же, 24, 1601 (1970).
397. R. P. Patel, D. V. Lopiek, S. P. Brown, S. Price, Biopolymers, 5, 577 (1967).
398. R. P. Patel, S. Price, Там же, 5, 583 (1967).
399. A. B. Patel, S. N. Pennington, H. D. Brown, Biochim. biophys. acta, 178, 626 (1969).
400. I. Chibata, T. Tosa, Tampakushitsu Kakusan Koso, 11, 23 (1966).
401. T. Wagner, C.-J. Hsu, G. Kelleher, Biochem. J., 108, 892 (1968).
402. Англ. пат. 1289549 (1972); Изобр. за рубежом, гр. 15, 18, 38 (1972).
403. Пат. ФРГ 2102514 (1971); С. А., 75, 105551g (1971).
404. I. Senhata, Catalyst, 14, 71 (1972).
405. Enzite, Miles-Seravac, Miles-Yeda, 1970, № 3, 15.
406. Insoluble enzymes, Sigma Price List, St. Louis, 1972, May, 196.
407. Polymer Gebundene Enzyme, Merck, Darmstadt, 1971, 19.
408. Insolubilized enzyme data sheet, Worthington Biochemical Co., 1972, стр. 4.
409. Research biochemicals, Nutritional Biochem. Corp., Cleveland, 1973, стр. 64.
410. Sephadzyme, Pharmacia, Upsala, 1970, 1.
411. M. Kitajima, S. Mijano, A. Kondo, J. Chem. Soc. Japan, Industr. Chem. Sect., 72, 493 (1969).

412. *T. M. S. Chang, F. C. McIntosh, S. G. Mason*, Canad. J. Physiol. Pharmacol., **44**, 115 (1966).
413. *S. N. Levine, W. C. LaCourse*, J. Biomed. Mat. Res., **1**, 275 (1967).
414. *R. M. Salemme, M. M. Litt, O. Lindan, R. E. Sparks*, Chem. Eng. Progr. Symp. Ser., **67**, 133 (1971).
415. *T. M. S. Chang*, Science, **146**, 524 (1964).
416. *M. C. Porter*, Biotechnol. Bioengn. Symp., **3**, 113 (1972).
417. *R. S. Boguslaski, A. M. Janik*, Biochim. biophys. acta, **250**, 266 (1971).
418. *T. M. S. Chang, M. J. Poznansky*, Nature, **218**, 243 (1968).
419. *D. Dinelli*, Proc. Biochem., **7**, 9 (1972).
420. Пат. ФРГ 1932426 (1970); С. А., **72**, 86678g (1970).
421. *P. P. Chambers*, Enz. Techn. Digest, **1**, 86 (1972).
422. *A. L. Shrier*, Biotechnol. Bioengn. Symp., **3**, 323 (1972).
423. *D. Romeo, A. Girard, R. Rothfield*, J. Mol. Biol., **53**, 475 (1970).
424. *H. H. Weetall, N. B. Hawewala*, Biotechnol. Bioengn. Symp., **1972**, **3**, 241.
425. *T. Kobayashi, M. Moo-Young*, Biotechnol. Bioengn., **13**, 893 (1971).
426. *M. D. Lilly, P. Dunnill*, Biotechnol. Bioengn. Symp., **3**, 221 (1972).
427. *S. H. Lin*, Biophysik, **8**, 302 (1972).
428. *S. P. O'Neill*, Biotechnol. Bioengn., **14**, 201 (1972).
429. *S. P. O'Neill*, Там же, **14**, 473 (1972).
430. Э. Х. Саймер, А. И. Кёстнер, Труды ТПИ, пищ. технол., Таллин, 1973, № 331, 163.
431. *P. R. Rony*, Biotechnol. Bioengn., **13**, 431 (1971).
432. *M. L. Shuler, R. Aris, H. M. Tsuchiya*, J. Theor. Biol., **35**, 67 (1972).
433. *U. Lindberg, S. Eriksson*, Eur. J. Biochem., **18**, 474 (1971).
434. *R. Goldman, E. Katchalski*, J. Theor. Biol., **32**, 243 (1971).
435. *M. Moo-Young, G. Kobayashi*, Canad. J. Chem. Eng., **50**, 162 (1972).
436. *J. J. Blum, D. J. Jenden*, Arch. biochem. biophys., **66**, 316 (1957).
437. *D. G. O'Sullivan*, J. Theor. Biol., **2**, 117 (1962).
438. *J. D. A. Murray*, Math. Biosci., **2**, 379 (1968).
439. *H. B. Keller*, Numerical methods for two point boundary value problems, Blaisdell Publ. Co. Toronto, L., 1968, стр. 323.
440. А. И. Кёстнер, Э. Х. Саймер, Материалы Всес. симп. по хим. протеолит. ферм., Вильнюс, 1973, стр. 42.
441. А. И. Кёстнер, Труды ТПИ, **1973**, № 331, 157.
442. *T. Mori, T. Sato, J. Matuo, T. Tosa, I. Chibata*, Biotechnol. Bioengn., **14**, 663 (1972).
443. *T. C. Laurent*, Eur. J. Biochem., **21**, 498 (1971).
444. *H. Maeda, H. Suzuki*, Agric. Biol. Chem., **36**, 1581 (1972).
445. Ам. пат. 3455784 (1969); С. А., **71**, 98594k (1969).
446. Ам. пат. 3455783 (1969); С. А., **71**, 98593j (1969).
447. *S.-C. Tu, D. B. McCormick*, Separ. Sci., **7**, 403 (1972).
448. *J. B. Taylor, H. E. Swaisgood*, Biochim. biophys. acta, **284**, 268 (1972).
449. *P. Cuatrecasas, I. Parikh*, Biochemistry, **11**, 2291 (1972).
450. *O. R. Zaborsky*, Biotechnol. Bioengn. Symp., **3**, 211 (1972).
451. *R. Koelsh, J. Lasch, H. Hanson*, Acta Biol. Med. Germ., **24**, 833 (1970).
452. *S. Usami, J. Noda, K. Goto*, J. Ferm. Technol., **49**, 598 (1971).
453. *R. Goldman, H. Lehnhoff*, Adv. Enzym., **34**, 445 (1971).
454. А. И. Кёстнер, М. И. Креен, К. А. Калуняц, Микробиол. пром., **1973**, № 3, 11.
455. М. И. Креен, А. И. Кёстнер, К. А. Каск, Труды ТПИ, Таллин, 1973, № 331, 131.
456. *A. Bar-Eli, E. Katchalski*, J. Biol. Chem., **238**, 1690 (1963).
457. *C. J. Epstein, C. B. Anfinsen*, Там же, **237**, 2175 (1962).
458. *T. M. S. Chang*, Science, **146**, 524 (1964).
459. *W. M. Ledingham, W. E. Hornby*, FEBS Letters, **5**, 118 (1969).
460. *W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook*, Biochem. J., **107**, 669 (1968).
461. *A. K. Sharp, G. Kay, M. D. Lilly*, Biotechnol. Bioengn., **11**, 363 (1969).
462. *M. D. Lilly, W. E. Hornby, E. M. Crook*, Biochem. J., **100**, 718 (1966).
463. *C. W. Wharton, E. M. Crook, K. Brocklehurst*, Eur. J. Biochem., **6**, 565 (1968).
464. *H. Filippusson, W. E. Hornby*, Biochem. J., **120**, 215 (1970).
465. *A. Scheffer, A. Bar-Eli*, Arch. biochem. biophys., **136**, 325 (1970).
466. *M. D. Lilly, P. Dunnill*, Proc. Biochem., **6**, 29 (1971).
467. *V. H. Edwards*, Biotechnol. Bioeng. Symp., **3**, 343 (1972).
468. *W. Pfeil*, Wiss. und Fortschr., **23**, 77 (1973).
469. Enzyme engineering, Biotechnol. Bioengn. Symp., **3**, 486 (1972).
470. *S. A. Barker, R. Epton*, Proc. Biochem., **5**, 14 (1970).
471. *H. Maeda, H. Suzuki*, Nippon Kogekagaku. Kaishi, **44**, 547 (1970).
472. *H. Maeda, S. Miyado, H. Suzuki*, Hakko Kyokaishi, **28**, 391 (1970).
473. *A. N. Emery, J. S. Hough*, Birmingham Univ. Chem. Eng., **22**, 37 (1971).
474. *H. Negoro*, J. Ferment. Technol., **48**, 689 (1970).
475. *L. K. Ferrier, T. Richardson, N. F. Olson*, J. Dairy Sci., **54**, 762 (1971).
476. *T. Richardson*, Ezn. Technol. Dig., **2**, 76 (1973).

477. Франц. пат. 2036383 (1970); C. A., 75, 76782a (1971).
478. Ам. пат. 3305453 (1963); Off. Gas US Patent Office, 3, 987 (1967).
479. A. H. Emery, Enz. Technol. Dig., 1, 6 (1972).
480. D. I. C. Wang, Там же, 1, 7 (1972).
481. G. Kay, M. D. Lilly, A. K. Sharp, R. J. M. Wilson, Nature, 217, 641 (1968).
482. M. D. Lilly, G. Kay, A. K. Sharp, R. J. H. Wilson, Biochem J., 107, 5P (1968).
483. M. Charles, R. Coughlin, E. Alten, Enz. Technol. Dig, 2, 81 (1973).
484. M. A. Stahman, J. Ohno, Macromol., 4, 350 (1971).
485. K. Hochstrasser, E. Werle, S. Schwartz, Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem., 350, 897 (1969).
486. J. E. Bailey, D. Luss, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1460 (1972).
487. G. Broun, D. Thomas, E. Sélégny, Ztschr. Membrane Biol., 8, 313 (1972).
488. G. G. Guilbault, Anal. Chem., 38, 527R (1966).
489. G. G. Guilbault, Там же, 42, 334B (1970).
490. G. G. Guilbault, Pergamon Press, Oxford, 1970, стр. 312.
491. L. C. Clark, Biotechnol. Bioengn. Symp., 3, 337 (1972).
492. M. Schwartz, Anal. Chem., 44, 9R (1972).
493. E. Fink, E. Jakmann, H. Fritz, H. Ingrisch, R. Geiger, Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem., 352, 1591 (1971).
494. J. Weder, Angew. Chem., 83, 938 (1971).
495. M. Notin, R. Guillien, P. Nabet, Ann. Biol. Clin., 30, 193 (1972).
496. Ам. пат. 3542662 (1970); РЖБиохим., 1971, 13Ф1518П.
497. G. G. Guilbault, Biotechnol. Bioengn. Symp., 3, 361 (1972).
498. G. G. Guilbault, J. G. Montalvo, Anal. Letters, 2, 283 (1969).
499. G. G. Guilbault, Pure Appl. Chem., 25, 727 (1971).
500. G. G. Guilbault, Enz. Technol. Dig., 1, 10 (1972).
501. H. P. J. Bennet, D. F. Elliott, B. E. Evans, P. J. Lowry, Biochem. J., 129, 695 (1972).
502. T. M. S. Chang, Science Tools, 16, 33 (1969).
503. T. M. S. Chang, Biotechnol. Bioengn. Symp., 3, 395 (1972).
504. T. M. S. Chang, Canad. J. Physiol. Pharmacol., 45, 705 (1967).
505. T. M. S. Chang, New Scientist, 42, 18 (1969).
506. Получение и применение иммобилизованных ферментов. Тезисы докладов. I Все-союзного симпозиума, 131с., Таллин, 1974.

Таллинский политехнический ин-т,  
Химический факультет