

УДК 577.15

## ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

*B. Маркони*

Дан краткий обзор методов получения и очистки иммобилизованных ферментов. Приведены примеры использования в промышленности (в основном не пищевой) таких ферментов, как амилазы, протеазы, целлюлазы, глюкозооксидаза, глюкозоизомераза, липазы, инвертаза. Описаны различные способы иммобилизации ферментов.

Рассмотрены основные аспекты катализа иммобилизованными ферментами, в особенности с точки зрения стабильности ферментов, кинетики реакций и влияния диффузии. Приведены некоторые примеры использования ферментов, включенных в волокна (гидролиз пенициллина, расщепление молочной лактозы, изомеризация глюкозы).

Библиография — 65 ссылок.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Ферменты в растворе . . . . .	2077
II. Иммобилизованные ферменты . . . . .	2083
III. Основные аспекты катализа иммобилизованными ферментами . . . . .	2087
IV. Примеры возможного промышленного применения иммобилизованных ферментов . . . . .	2088

Ферментативные реакции нашли в последние годы широкое применение в химической и фармацевтической промышленности. В обзоре рассмотрены примеры промышленного (в основном не для производства пищевых продуктов) использования ферментативных реакций, осуществляемых как с помощью ферментов в растворе, так и с помощью иммобилизованных ферментов, что особенно важно в связи с их возрастающим значением в качестве промышленных катализаторов \*.

### I. ФЕРМЕНТЫ В РАСТВОРЕ

Наиболее важным источником ферментов, используемых в промышленности, по техническим и экономическим причинам являются микробиологические объекты. Соответствующие микроорганизмы выращивают с помощью поверхностных или объемных культур. Водные экстракты, содержащие ферменты, затем подвергают дальнейшей обработке различными методами с целью их концентрирования, частичной очистки, стабилизации и превращения ферментативного материала в готовый коммерческий продукт.

Обычно используют внеклеточные ферменты, что позволяет проводить процесс их выделения относительно просто и не требует разрушения клеток, хотя в настоящее время это легко достигается с помощью современных гомогенизаторов <sup>1</sup>. Используемая обычно схема выделения ферментов показана на рис. 1 <sup>2</sup>.

\* В настоящее время наиболее полное освещение этой проблемы дано в сборнике <sup>a</sup>. Кинетико-термодинамические аспекты катализа иммобилизованными ферментами изложены в <sup>b</sup>.

<sup>a</sup> Иммобилизованные ферменты (под ред. И. В. Березина), изд. МГУ, М., 1975.

<sup>b</sup> И. В. Березин, А. М. Клибанов, К. Мартинек, Успехи химии, 44, 17 (1975).

В случае необходимости добавляются консервирующие вещества, например толуол, органические кислоты, фенольные соединения, четвертичные аммониевые соли или фтористый натрий. Ферменты осаждаются добавлением в строго контролируемых условиях к очищенным растворам или жидким концентратам таких осадителей, как органические растворители (ацетон, этиловый спирт), неорганические соли (сульфат натрия или аммония, двузамещенный фосфат натрия), или макромолекулярные соединения (полиэтиленгликоли). Осажденный фермент, вы-

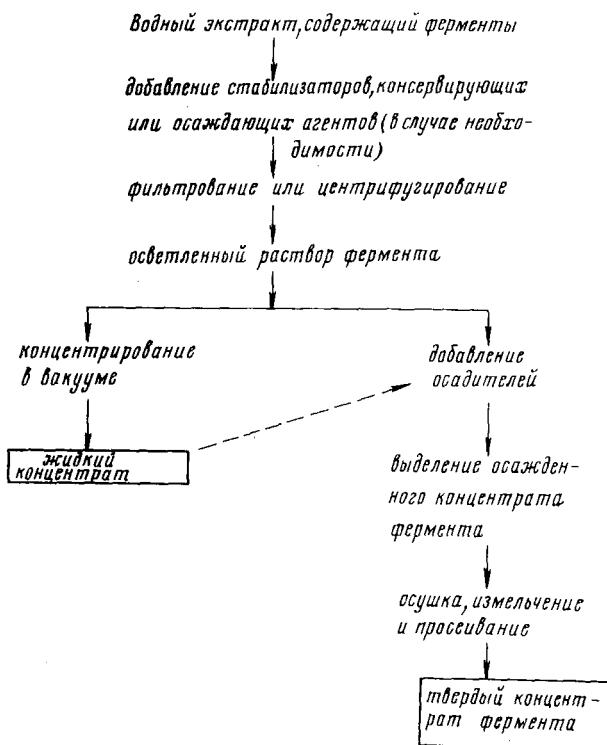


Рис. 1. Схема выделения ферментов

деленный фильтрованием или центрифугированием, сушат при атмосферном давлении или под вакуумом при низкой температуре, и твердый концентрат размельчают до частиц необходимого размера. Полученный концентрат содержит помимо нужного фермента другие белки, а также влагу, углеводы и минеральные соли<sup>3</sup>. Поскольку обычно для коммерческих целей цена препарата важнее, чем высокая степень чистоты, он не подвергается дальнейшей очистке. Однако в некоторых случаях наличие в препарате загрязняющих ферментов или других веществ, если они могут неблагоприятно влиять на продукты или процессы, нежелательно. Так, должны быть тщательно очищены ферменты, использующиеся для специальных аналитических целей, для некоторых фармацевтических процессов, для исследовательских целей<sup>2</sup>. Для производства ферментов высокой степени чистоты необходимо использовать специальные методы, как, например, фракционированное осаждение, дифференциальную адсорбцию и элюцию<sup>4</sup>, хроматографию<sup>5</sup>, электрофорез<sup>6</sup>, диализ<sup>7</sup>, кристаллизацию и лиофилизацию.

В табл. 1 перечислены коммерческие ферменты, производимые в основном из различных штаммов плесневых грибков, бактерий и дрожжей<sup>8</sup>. Наиболее важными представителями таких ферментов являются амилаза, некоторые другие карбогидразы, протеазы, глюкозооксидаза, пектиназа. Для их производства используются методы с применением объемных (погруженных) культур.

Составляя обзор применения ферментативных процессов в растворах в «непищевой» индустрии, мы нашли, что кроме производства крахмала и моющих порошков (которые, вследствие их коммерческой важности, будут рассмотрены более детально), ферменты используются в

ТАБЛИЦА 1

Некоторые промышленные ферменты и их микробиологические источники<sup>8</sup>

Источник	Фермент	Микроорганизм
Плесневые грибы	Амилазы	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Глюкозидазы	<i>Aspergillus flavus</i>
	Протеазы	<i>Aspergillus niger</i>
	Пектиназы	<i>Aspergillus niger</i>
	Глюкоксидаза	<i>Penicillium notatum</i>
	Катализы	<i>Aspergillus niger</i>
Бактерии	Амилазы	
	Протеазы	<i>Bacillus subtilis</i>
Дрожжи	Пенициллиназа	
	Инвертаза	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Лактаза	<i>Saccharomyces fragilis</i>

текстильной, бумажной, кожевенной, фармацевтической и других областях промышленности. В текстильной промышленности бактериальные амилазы используются как для приготовления модифицированных крахмальных клеев, так и при удалении клеев с тканых материалов. При этом препараты бактериальных амилаз, сохраняющие активность при значительно более высоких температурах, чем амилазы из плесневых грибков, в большой степени заменили солод и панкреатин. В бумажной промышленности некоторые бактериальные амилазы используются в процессе модификации крахмала для покрытия бумаги. Протеазы из *Bacillus subtilis*<sup>9</sup> используются в производстве дубленой кожи для снятия волос и в основном для смягчения кожи после дубления путем протеолитического разрушения желатина, образующегося из коллагена. Такая обработка повышает защитные свойства и улучшает структуру кожи<sup>10</sup>. Препараты протеаз должны иметь будущее также как депилаторы (препараты для удаления волос) в косметике<sup>11</sup>.

Плесневые или панкреатические амилазы, протеазы и липазы, и плесневые целлюлазы используются как средства, способствующие пищеварению. Стрептокиназа, трипсин и другие протеазы находят применение при обработке ран и как противовоспалительные или фибринолитические агенты. Среди гидролитических ферментов значительный промышленный интерес представляет также инвертаза (катализирующая гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы), применяющаяся при приготовлении высококонцентрированных инвертированных сахарных сиропов и в специальных целях, например для получения мягких сортов шоколада. Энзиматически инвертированная сахароза, в отличие от полученной кислотным гидролизом, не имеет нежелательного привкуса и цвета, причиной которых служат продукты разложения (например, фурфурол). Из двух возможных ферментов, гидролизующих сахарозу,

используется только  $\beta$ -фруктозидаза. Центром атаки в этом случае является фруктозный конец молекулы сахарозы. Этот внутриклеточный фермент, получаемый из дрожжей (обычно из *Saccharomyces cerevisiae*), сохраняет каталитические свойства при температурах 65—70° и имеет максимальную активность при pH 4,5. Очистка инвертазы путем удаления примесей повышает чувствительность фермента к физическим повреждениям<sup>12</sup>. Поэтому обычно используют неочищенные препараты, содержащие небольшие количества других ферментов (катализы, гексокиназы).

Амилазы являются внеклеточными ферментами, гидролизующими молекулы крахмала до декстринов и набора более низкомолекулярных соединений, состоящих из глюкозных звеньев. Они делятся на два класса: эндоамилазы и экзоамилазы. Эндоамилазы действуют случайным образом на связи (1→4) в крахмале, освобождая некоторые восстановливающие группы и образуя декстрины с различной длиной цепи. Связи (1→6), которые являются точками разветвления в амилопектине и гликогене, при этом не подвергаются атаке. Экзоамилазы атакуют полисахариды только со стороны невосстановляющихся концевых групп. Они могут либо расщеплять каждую связь с образованием только глюкозы (амилоглюкозидазы), либо разрывать связи через одну с образованием мальтозы ( $\beta$ -амилазы, называемые так потому, что получающаяся мальтоза имеет  $\beta$ -конформацию).

Амилоглюкозидазы из *Aspergillus niger* способны гидролизовать как (1→4), так и (1→6) глюкозидные связи олигосахаридов, однако в последнем случае скорость реакции значительно меньше<sup>13</sup>.

ТАБЛИЦА 2  
Микробные амилазы \*

Свойства	Бактерии		Плесневые грибы		Другие источники	
	ожижение	осахаривание	<i>Rhizopus</i>	<i>A. oryzae</i> или <i>A. niger</i>	<i>Endomycopsis</i>	<i>Oospora</i>
Температурная устойчивость, °C	65—90	55—70	50—65	55—70	35	50—70
pH-Стабильность	4,8—10,6	4,0—7,8	5,4—7,0	4,7—9,5	6,0—7,5	6,0—10,5
Оптимальные значения pH	5,4—6,0	4,8—5,2	3,6	4,9—5,2	5,4	5,6
Активность/mг	1800	1190	475	980	760	970
Адсорбция на крахмале	++	—	+	+	?	+
Стабилизация ионами Ca	+	—	—	+	—	—
Действие на крахмал:						
—максимальная степень гидролиза, %	35	70	48	48	90	37
—основные продукты	декстрин, мальтоза	глюкоза, мальтоза, мальтотриоза	мальтоза	мальтоза	глюкоза	декстрин, мальтоза
Действие на мальтозу	—	—	—	—	+	—
Действие на фенилмальтозу	—	+	+	+	+	—

\* По данным д-ра Дж. Фукумото.

Микробиологические  $\alpha$ -амилазы получают либо из плесневых грибов (предпочтительнее из *A. oryzae*), либо из бактерий (предпочтительнее из *B. subtilis*). В табл. 2 суммированы все известные источники амилаз<sup>14</sup>. Коммерческие  $\alpha$ -амилазы, полученные из разных бактерий и плесневых грибков, характеризуются различными значениями температуры и pH, соответствующими максимальной каталитической активностью.

сти, разной стабильностью и степенью, до которой они разрушают крахмал. Бактериальная  $\alpha$ -амилаза из термофильных штаммов *Bacillus subtilis* вследствие ее высокой термической стабильности может быть использована для ожигания крахмала. Для этого ее добавляют к тестообразной массе нежелатинизированных гранул крахмала (предпочтительно из картофеля или батата), которая поступает на стадию желатинизации, и смешивают в реакторе<sup>14</sup>. В Японии разработаны промышленные процессы с использованием глюкоамилазы из поверхностных культур *Rhizopus*<sup>15</sup>. Японские исследователи предложили также применять для получения глюкоамилазы объемные культуры штаммов *Endomycetes*<sup>16</sup>. В США разработаны процессы получения глюкоамилазы из *Aspergillus* в погруженных культурах. Этот метод дает более высокие выходы. Фермент из *Aspergillus* обладает прекрасными свойствами — высоким температурным оптимумом, лучшей стабильностью и более широким интервалом pH, в котором он сохраняет активность.

Все коммерческие препараты глюкоамилаз должны быть полностью очищены от фермента трансглюкозидазы, ответственной за получение небольших примесей олигосахаридов, в особенности изомальтозы, которая затрудняет производство декстрозы. Предложено несколько способов, позволяющих уменьшить содержание трансглюкозидазы в глюкоамилазных препаратах: а) выведены специальные культуры, которые не производят трансглюкозидазу; б) предлагается обработка неочищенного фермента агентами, удаляющими трансглюкозидазу (к ним относятся глиноземные минералы<sup>17</sup>, сульфонированные спирты<sup>18</sup>, Mg(OH)<sub>2</sub><sup>19</sup>, кислоты<sup>20</sup>), а также использование ионообменных смол<sup>21</sup> и т. д.

Амилолитические ферменты применяются в основном для производства крахмальных паток (концентрированные водные растворы крахмальных гидролизатов) и кристаллической глюкозы (декстрозы). Использование подходящих комбинаций  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз, амилоглюкозидаз, изоамилаз или мальтаз позволяет получить неограниченное разнообразие продуктов гидролиза крахмала и, как следствие, — сиропы с любыми желаемыми свойствами, например с содержанием мальтозы >80%<sup>22</sup>.

Другим интересным ферментом, катализирующим превращение глюкозы в фруктозу, является глюкозоизомераза, получаемая из некоторых штаммов *Streptomyces* и бактерий. В зависимости от температуры превращение может достигать ~50%. Так как фруктоза сладче, чем глюкоза, этим способом можно получать более сладкие патоки<sup>14</sup>.

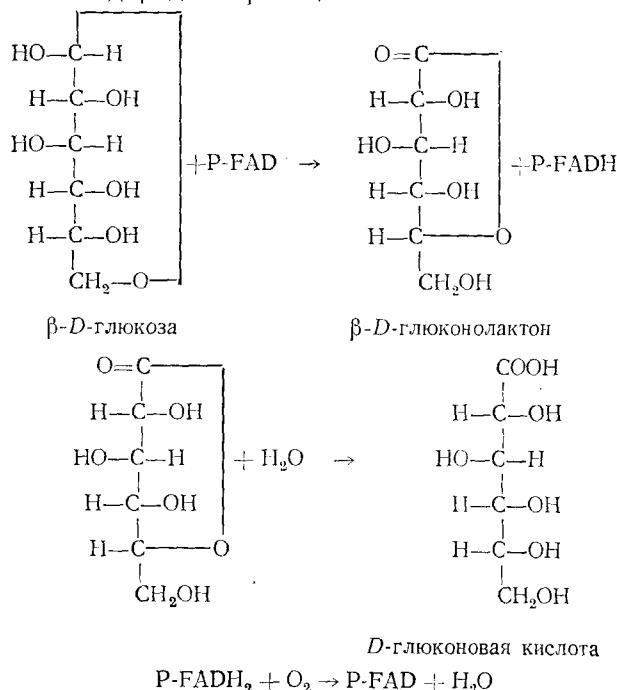
Второй класс гидролитических ферментов, имеющих важное промышленное значение, составляют протеазы. Они могут быть животного происхождения, как, например, трипсин, который получается из бычьих поджелудочных желез как побочный продукт после экстракции инсулина и имеет широкое фармацевтическое применение. Другие протеазы имеют растительное происхождение, например фицин, папаин или бромелайн, и в основном используются как вещества для смягчения мяса. Протеазы можно получать микробиологическими методами как с помощью плесневых грибков, так и с помощью бактерий; обычно используют несколько видов бактерий — такие, как *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae*.

Микробиологические протеазы делятся на три группы: кислотные, нейтральные и щелочные<sup>9</sup>. Кислотные протеазы, источником которых являются в основном плесени (*Aspergillus*, *Rhizopus*), наиболее активны в области pH 2—5, нечувствительны к действию соединений с сульфогидрильной группой, веществ, образующих хелаты с металлами, и к тяжелым металлам, и катализируют гидролиз большого числа пептид-

ных связей. Нейтральные протеазы — это цинксодержащие металлоферменты, и поэтому они дезактивируются хелатирующими реагентами. Оптимальными условиями для них являются pH 7—8 и температуры 45—50°. Они не обладают эстеразной активностью и в основном расщепляют пептидные связи следующего типа: His-Leu, Ala-Leu, Tyr-Leu, Gly-Phe, Phe-Phe.

Щелочные протеазы — самая важная группа, так как они широко используются в сочетании с детергентами, для удаления пятен белковой природы, например крови, казеина и т. д. Наиболее известные ферменты этой группы — это субтилизины<sup>9</sup>, например субтилизин *Novo* или субтилизин *Carlsberg* из различных *Bacilli* или штаммов *B. subtilis*. Щелочные протеазы имеют широкий интервал активности от значения pH 6 до 11, максимальная активность проявляется при pH 9,5—10,5. Они обладают высокой эстеразной активностью и расщепляют пептидные связи нескольких типов.

Протеазы используются также в небольших количествах для сухой чистки, выделения серебра из использованных фотографических пленок и для приготовления белковых гидролизатов. Широкое промышленное применение имеет еще один фермент — глюкозооксидаза, FAD-зависимая аэробная дегидрогеназа, которая превращает глюкозу в глюкононую кислоту с одновременным образованием эквимолекулярных количеств пероксида водорода по реакциям:



(где P-FAD — глюкозооксидаза).

Микробиологическим источником этого фермента являются *Penicillium notatum* и особенно *Aspergillus niger*. Внутриклеточный фермент из *A. niger* имеет оптимум в области pH 4,0—6,5. Коммерческий фермент содержит каталазу, что делает более выгодным его промышленное применение. Глюкозооксидаза используется для удаления кислорода из консервированных безалкогольных напитков, майонеза и фруктовых соков, а также для удаления глюкозы из яиц перед сушкой.

Катализ, которая разлагает перекись водорода на воду и кислород, используется в производстве сыров для разложения остатков  $H_2O_2$  после холодной стерилизации, в производстве пенистых резин (пенопластов) и пористого цемента, а также для ускорения отбеливания меха и птичьих перьев. Липаза, один из гидролитических ферментов, содержится в панкреатине и производится многими микроорганизмами. Она находит промышленное применение как средство, способствующее пищеварению, в ферментативных сухих очистителях, для устранения отходов, для разрушения жиров до жирных кислот, составляющих основу обычного мыла<sup>11</sup>.

Новыми промышленными карбогидразами являются целлюлазы.

Целлюлазный комплекс является смесью внеклеточных ферментов (в основном из *A. niger* или *Trichoderma, viridae*)<sup>23</sup>, содержащей, во-первых, фермент, который действует неспецифически, гидролизуя высоко ориентированные твердые целлюлозы ( $C_1$ ), и, во-вторых многокомпонентную фракцию  $\beta(1 \rightarrow 4)$ глюканаз (называемых  $C_x$ ) как экзо-типа (они удаляют единичные глюкозные звенья с невосстановливающихся концов целлюлозной цепи), так и эндо-типа, дающих целлюлодекстрину, и, в-третьих,  $\beta$ -глюкодимеразы, действующие на  $\beta$ -димеры глюкозы, например целлобиозу. Использование целлюлазного комплекса из *T. viridae* сделало возможным гидролиз предварительно обработанной целлюлозы, свободной от лигнина, в неочищенные вытяжки, содержащие 8% глюкозы<sup>23, 24</sup>. В более поздних работах, используя кедровые опилки, получили растворы, содержащие более чем 20% глюкозы<sup>25</sup>. Эти вытяжки могут быть использованы для производства продуктов ферментации или индивидуальных клеточных белков. Другими перспективными направлениями использования целлюлазы может быть ее применение для удаления растительных волокон из шерсти или же как средства, способствующего пищеварению, или для ферментативной сухой чистки.

## II. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Преимущества использования иммобилизованных ферментов в качестве катализаторов изложены во многих обзорных статьях. Основой их применения в области химического катализа и автоматического анализа является возможность многократного использования в сочетании с высокой селективностью катализа и небольшой стоимостью их приготовления и очистки; во многих случаях также могут быть уменьшены реакционные объемы. В плане исследовательских задач иммобилизованные ферменты следует рассматривать как специфические, легко удаляемые из системы реагенты, при использовании которых можно избежать загрязнения ими получаемых продуктов. Далее, иммобилизация может повысить стабильность ферментов. Искусственно иммобилизованные ферменты можно использовать, так же как и модельные системы, для исследования механизма действия ферментов в биологических мембрanaх.

В биомедицинских целях ферменты следует использовать только в иммобилизованной форме, чтобы предотвратить аллергические реакции организма или нежелательные взаимодействия между ферментом и отдельными компонентами обрабатываемых органических растворов. Ковалентно связанные ферменты приобретают все большую важность при выделении коферментов и встречающихся в природе ингибиторов ферментов методом афинной хроматографии из неочищенных экстрактов или частично очищенных растворов.

Эти разнообразные и привлекательные возможности побудили многих исследователей в течение последних нескольких лет направить свое внимание на изучение иммобилизованных ферментов. Открыты различные методы получения иммобилизованных систем, исследована активность полученных ферментов. Интенсивно разрабатываются теоретические аспекты кинетики действия этих ферментных систем наряду с инженерными проблемами создания реакторов с использованием иммобилизованных ферментов.

*Методы иммобилизации.* При обсуждении вопроса об использовании иммобилизованных ферментов как промышленных катализаторов мы рассмотрим только относительно дешевые носители и простые методы фиксации ферментов.

Для приготовления водонерастворимых ферментов используются в основном четыре метода. а) Физическое включение (т. е. включение в пористые материалы, полости в которых окружены стенками, не пропускающими белки, но позволяющими проникать в эти полости веществам с небольшим молекулярным весом). В качестве примера таких носителей можно привести полиакриламидный или крахмальный гель, микрокапсулы, матрицы в виде волокон. б) Ковалентное связывание ферментов с органическим или неорганическим носителем за счет реакций функциональных групп белка, не определяющих катализическую активность. в) Образование ковалентных межмолекулярных связей при взаимодействии ферментов с соответствующими бифункциональными реагентами. г) Адсорбция на нерастворимых матрицах (на ионообменных смолах или инертной подложке, например за счет гидрофобных взаимодействий).

Успешно используется комбинация методик (в) и (г), т. е. адсорбция белка на соответствующем носителе с последующим образованием межмолекулярных связей. В табл. 3 приведены наиболее важные примеры ковалентного связывания.

Рассмотрим преимущества и недостатки некоторых приведенных выше методов иммобилизации.

*Физическое включение в гель.* Включение ферментов в такие гели, как пространственно «сшитый» полиакриламид или крахмал, обладает тем преимуществом, что может быть проведено в довольно мягких условиях. В этом случае носитель оказывает минимальное воздействие на иммобилизованный фермент. Отсутствие ковалентных связей фермента с матрицей делает этот метод в принципе применимым к любому ферменту.

Недостатком метода следует считать относительную недоступность ферментов для субстратов с большим молекулярным весом, ощущаемое влияние диффузии субстратов и продуктов и возможные потери фермента при его вымывании из неплотных сетчатых гелей<sup>26</sup>. Интересная разновидность данного способа иммобилизации — включение в микрокапсулы<sup>26</sup>, сделанные из тонких сферических полупроницаемых мембран из найлона или коллодия, которые используются в основном в биомедицинских целях.

*Включение в волокнистые структуры.* Разработанный в нашей лаборатории метод включения ферментов в волокнистую структуру относится к категории методов физического включения. Он состоит в получении эмульсии путем смешивания водного раствора фермента с раствором полимера в растворителе, не смешивающемся с водой. Эта эмульсия продавливается затем через тонкие фильеры в нерастворяющую жидкость, что вызывает коагуляцию полимера<sup>28</sup>; при этом белок оказывается внедренным в поры влажного скрученного синтетического

ТАБЛИЦА 3

## Методы ковалентного связывания ферментов

Активатор	Носитель
Изотиоцианат	сифадекс энзакрил АА
Азид	СМ-целлюлоза энзакрил АН
Карбодимиид	СМ-целлюлоза
Малеиновый ангидрид Диазосоединения	акриламид — акриловая кислота сополимер этилена и малеинового ангидрида энзакрил АА
Галогенциан	полистирол сополимер <i>n</i> -аминофенилаланина и лейцина целлюлоза сифадекс полисахарид
N-этил-5-фенил— изоксазолий— 3-сульфонат— Трихлор- <i>s</i> -триазин	полиакриловая кислота полиглутаминовая кислота СМ-целлюлоза целлюлоза ДЕАЕ-целлюлоза ДЕ-целлюлоза
Глутаровый альдегид	АЕ-целлюлоза нейлон
Силан Bis-диазобензидин-2,2'-ди- сульфокислота	стекло коллодий

волокна. Размеры пор можно менять в определенных пределах путем изменения условий проведения эксперимента. На рис. 2 приведена полученная на электронном микроскопе фотография поперечного сечения волокна. Такая техника «улавливания» очень проста, может применяться к любым белкам и дает возможность осуществлять как одновременное включение в матрицу нескольких различных белков, так и включение больших количеств одного белка. Чистота белка не влияет на «улавливание», и метод может быть использован для включения отдельных органелл, клеток или спор. Ферменты, внедренные таким способом в матрицу, защищены от действия микробов и макромолекулярных веществ, продуцируемых микробами, например протеаз.

Очевидно, в дальнейшем можно повысить стабильность внедренного ферmenta, подбирая в качестве носителя полимеры, способные взаимодействовать с белковой глобулой ферmenta, стабилизируя ее.

*Ковалентное связывание.* Ковалентное связывание ферментов с твердой матрицей является наиболее широко используемым и детально изученным методом. Ковалентное связывание обладает тем преимуществом, что полученные системы не разрушаются при изменении pH, ионной силы и добавлении субстрата. Однако этот метод связывания, изменяя химическую структуру ферmenta, может изменить также и его реакционную способность (либо за счет блокирования активного центра ферmenta в результате реакции связывания, либо из-за вовлечения в реакцию аминокислотных остатков, которые участвуют в механизме действия ферmenta<sup>26</sup>). При фиксации должны соблюдаться мягкие условия, умеренные значения ионной силы, pH 4—10, температура 0—35°C. В ходе иммобилизации активный центр ферmenta должен быть защищен путем использования ковалентных блокирующих реагентов или за счет проведения реакции в присутствии субстрата или ингибиторов. Но-

ситель должен быть гидрофильным, обладать высокой пористостью, и обычно его нужно перевести в активную форму до реакции с ферментом. Размеры частиц в значительной степени определяют количество связанного фермента на грамм носителя<sup>29</sup>. Рост поверхности носителя повышает количество связанного фермента на единицу веса, а увеличение числа гидрофильных областей в полимере также обычно повышает его связывающую способность.

Наиболее подходящими центрами связывания молекулы фермента с матрицей являются концевые аминогруппы, а также боковые аминогруппы, содержащиеся в лизиновых остатках. В процессе связывания

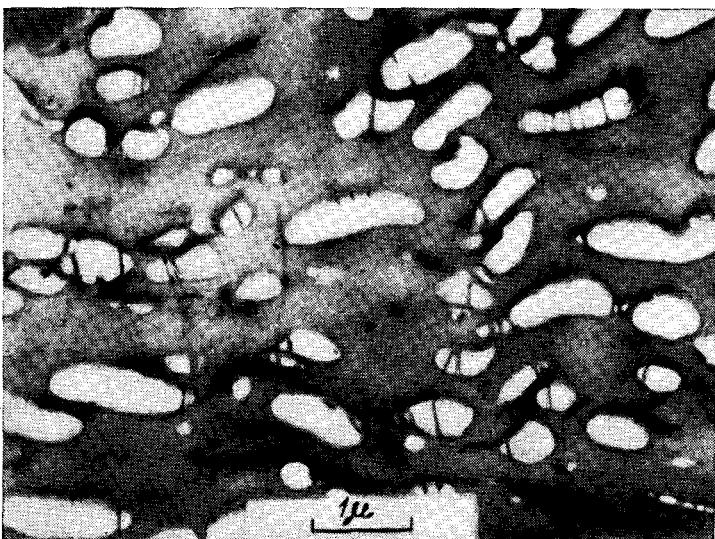


Рис. 2. Фотография поперечного сечения полимерных волокон, полученная на электронном микроскопе

могут участвовать имидазольные кольца гистидина и гуанидиновые группы аргинина. Эффективными могут быть также карбоксильные кислотные группы глутаминовых и аспарагиновых остатков и С-концевые группы белков. Другим местом связывания может являться гидрокси-фенильная группа тирозинового остатка, которая легко взаимодействует с диазониевыми реагентами.

Иммобилизация ферментов путем образования межмолекулярных связей была успешно проведена при использовании бифункциональных реагентов, содержащих как две идентичные функциональные группы<sup>30</sup>, так и различные группы или группы, обладающие различной реакционной способностью.

Следует отметить, что методика ковалентного связывания ферментов с подходящими носителями хотя и предотвращает вымывание ферментов и позволяет контролировать физические свойства и размеры частиц конечного продукта, тем не менее имеет ограничения из-за чувствительности многих ферментов к химической модификации<sup>30</sup>.

*Адсорбция и методы образования поперечных связей.* Для адсорбции ферментов используются различные адсорбенты: как заряженные смолы, так и нейтральные поверхности. Адсорбционная методика не гарантирует полной иммобилизации. Высокие концентрации соли или субстрата повышают скорость десорбции фермента. Избежать этого

можно путем образования межмолекулярных связей в белках после их адсорбции. Так, синтетические мембранны высокой активности были получены за счет образования «сетки» молекул фермента, адсорбированных на коллоидии<sup>30</sup> или на целлофановых мембранных<sup>31</sup>, или сетки из молекул фермента и неактивного белка<sup>31</sup>.

### III. ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ КАТАЛИЗА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ \*

*Стабильность иммобилизованных ферментов.* Активность иммобилизованных ферментов, отнесенная к единице веса, зависит от количества связанного фермента, которое может меняться от нескольких миллиграммов до нескольких граммов на грамм носителя, и от активности самого фермента, изменяющейся от <10% до >100% от начальной, и может превышать ту активность, которую имел бы фермент в таком же количестве в растворе. Это в основном определяется различным микрокружением фермента на поверхности и в порах полимерной матрицы.

Иммобилизация, как правило, увеличивает эффективное время жизни и температурную стабильность фермента, однако в некоторых случаях возможен противоположный эффект: носитель, содержащий гидрофобные группы, в значительной степени денатурирует белок, в то время как гидрофильный носитель с положительным или отрицательным зарядом может влиять на стабильность иммобилизованного фермента за счет электростатических взаимодействий между связанным ферментом и носителем<sup>30</sup>. Протеолитические ферменты стабилизируются при иммобилизации также и за счет предотвращения автолиза.

Вид pH-зависимости активности иммобилизованного фермента может значительно отличаться от аналогичной зависимости того же фермента в растворе вследствие изменений, вызываемых действием молекулы носителя-полиэлектролита на эффективные константы кислотной диссоциации ионизируемых групп в активном центре фермента. Однако более важные взаимодействия типа заряд — заряд происходят между ионными зарядами субстрата или других компонентов в растворе и остаточными зарядами на матрице. Если компоненты раствора имеют заряд, противоположный заряду матрицы, их концентрация около поверхности и в порах матрицы становится выше, чем в массе растворителя; противоположная картина наблюдается для зарядов одноименного знака<sup>32</sup>. Так, например, щелочная ветвь pH-зависимости для фицина, связанного на СМ-целлюлозе, сдвинута на 0,5 единицы в сторону больших pH, так как концентрация протонов внутри матрицы увеличена за счет их взаимодействия с полем отрицательно заряженных карбоксильных групп<sup>33</sup>. Эти аномалии исчезают при высоких значениях ионной силы.

*Кинетика реакций.* Молекулы фермента связаны с носителем, как правило, в нескольких точках. Это приводит к образованию некоторого числа поперечных связей, что может затруднить доступ субстрата к связанной или экранированной молекуле фермента<sup>34</sup>. Другим фактором, оказывающим влияние на концентрацию субстрата в микроокружении активного центра связанного фермента, является диффузия. Частицы иммобилизованного фермента в водной суспензии окружены непрерывляемым слоем раствора, в котором устанавливается некоторый градиент концентрации субстрата<sup>35</sup>. В результате насыщение иммобилизованного фермента субстратом происходит при концентрациях суб-

\* Эти вопросы более подробно освещены в сборнике<sup>a</sup> и особенно в обзоре<sup>b</sup>; см. примечание к стр. 2077.

страта, более высоких, чем это требуется для насыщения активного фермента в растворе. Это приводит к увеличению эффективной константы Михаэлиса. Из-за диффузии нерастворимые ферменты проявляют максимум активности только при достаточно высоких скоростях перемешивания раствора<sup>36-38</sup>. Примером положительного влияния диффузии является случай нерастворимых полиферментных систем, которые более эффективны, чем индивидуальные ферменты в растворе, поскольку продукт, образующийся на начальных стадиях, не диффундирует мгновенно в объем, а остается на подложке в больших концентрациях, что выгодно для протекания последующих стадий реакции<sup>39</sup>.

Эффективная константа Михаэлиса для иммобилизованного фермента зависит от заряда матрицы, если субстрат также заряжен<sup>20</sup>: она возрастает, если матрица и субстрат имеют одинаковый знак заряда, поскольку субстрат отталкивается матрицей, и уменьшается при противоположных знаках заряда, так как в этом случае субстрат притягивается матрицей и его концентрация в микроокружении фермента выше, чем в массе раствора. Константа Михаэлиса может изменяться по этим причинам на порядок и более.

#### IV. ПРИМЕРЫ ВОЗМОЖНОГО ПРОМЫШЛЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

*Разделение рацемических смесей.* Выполнено большое количество работ по разделению D,L-аминокислот с использованием ацилаз, полученных из микроорганизмов и свиных почек.

Шибата с сотр.<sup>40-46</sup> достигли успехов в разделении на ацилазах D,L-метионина. Имеются сообщения о создании заводской установки мощностью 20 тонн в месяц. Авторы использовали различные методы иммобилизации ферментов: (а) ионную адсорбцию на DEAE-целлюлозе и DEAE-сепадексе, (б) ковалентное связывание с иод-ацетилцеллюлозой, (в) включение в поликариламидный гель.

Ацилаза из свиных почек, включенная в триацетатцеллюлозу в виде волокон, исследована в нашей лаборатории. Был получен высокоактивный катализатор (17 700 мкмоль/час на 1 г сухого волокна при 37° С). В условиях использования при 25° активность этих волокон уменьшалась на 25% за 650 часов, в течение которых было получено 550 г L-метионина на грамм сухого волокна.

*Осахаривание крахмала.* Лилли с сотр.<sup>47</sup> провели ковалентное связывание амилоглюкозидазы с DEAE-целлюлозой с помощью 2-амино-4,6-дихлоро-сим-триазина. Активность полученного фермента не является специфической. Необходимо, однако, отметить, что она остается постоянной в течение 28 дней использования. В более поздней работе<sup>48</sup> сообщается, что возможно связывание белка в количествах до 120 мг на грамм носителя и что активность равна приблизительно 20—30% активности исходного фермента. В условиях экспериментов при 50° активность уменьшается приблизительно на 30% через 21 день, однако при 25° фермент полностью стабилен.

Смайли и др.<sup>49</sup> исследовали ионное связывание амилоглюкозидазы на DEAE-целлюлозе. Активность, как было найдено, составляет 55% от исходной и остается постоянной в течение 3 недель при температуре 40°. Амилоглюкозидаза из *A. niger*, включенная в поликариламидный гель<sup>50</sup>, имеет активность, равную 20% от активности фермента в растворе, высокую термическую стабильность и pH-зависимость, аналогичную зависимости для исходного фермента. Активность сохраняется постоянной в течение 15 часов при 60°, затем уменьшается со скоростью

1,5% в час. При 50° активность постоянна в течение 150 часов, затем начинается инактивация.

Глюкоамилазы, включенные в СТА-волокна, изучены в нашей лаборатории<sup>51</sup>. Активность нерастворимых производных по отношению к ожиженному крахмалу составляет одну десятую от активности по отношению к мальтозе (возможно, вследствие затрудненности диффузии для молекул крахмала, обладающих большим молекулярным весом). Активность ферментированных волокон остается постоянной в течение 6 месяцев работы с мальтозой при 25°; в случае 30%-ных растворов предварительно ожженного крахмала при 45° волокна сохраняют активность в течение 300 часов.

Предложена методика отделения продуктов реакции от фермента и субстрата с использованием ультрафильтрующих мембран<sup>52</sup>. В этом случае фермент задерживается мембраной и может быть использован снова.

Недавно было проведено ковалентное связывание амилоглюкозидазы с пористым стеклом<sup>53</sup>. Выходы связывания составляют 40—60%, и даже до 80%. При обычной методике приготовления при 45° среднее время жизни составляет 650 дней. Подсчитано, что 500 колонок (объемом 1 фут<sup>3</sup>, т. е. 0,028 м<sup>3</sup>) иммобилизованной глюкоамилазы обладают достаточной мощностью для обеспечения потребности США в глюкозе.

Проведено большое число работ по иммобилизации  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз. Однако активность полученных нерастворимых производных очень низка (6—15%) и стабильность неудовлетворительна. Недавно было сообщено об иммобилизации пуллюланазы<sup>54</sup> путем ковалентного связывания с сополимером акриламида — акриловая кислота с помощью карбодиимида. Полнота связывания составляет 34%, активность — 43%; однако полученная система нестабильна.

*Изомеризация глюкозы.* Глюкоизомераза была иммобилизована путем включения в полиакриламидный гель, а также в результате ковалентного связывания ее с пористым стеклом. В обоих случаях фермент оказался нестабильным.

Проведены эксперименты по включению глюкоизомеразы в волокна триацетата целлюлозы<sup>55</sup>. Получены высокоактивные волокна, причем активность оставалась практически постоянной в течение 2 месяцев при 45°.

*Восстановление лактозы в молочных продуктах.* Иммобилизованная  $\beta$ -галактозидаза была получена разными исследователями. Шарп и сотр.<sup>56</sup>, например, провели ковалентное связывание фермента из *E. coli* с производными триазинилцеллюлозы. Стабильность полученных образцов при этом сильно зависела от температуры и наличия возможных отравляющих соединений.

Имеется сообщение<sup>57</sup> об использовании для обработки молока иммобилизованной лактазы из грибка, полученной при полимеризации акриловых мономеров в виде шариков. Включаются 5,6 мг фермента на 1 г носителя. Активность образцов 36%.

В нашей лаборатории изучены свойства  $\beta$ -галактозидазы из дрожжей, включенной в волокна из триацетата целлюлозы<sup>58, 65</sup>. Активность иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы составляет около 40% от активности свободного фермента. И свободный, и иммобилизованный фермент обнаруживают максимум активности при pH 6,0—7,0 (рис. 3) и температуре 37°. Гидролиз молока и чистой лактозы идет с приблизительно одинаковыми скоростями. Иммобилизованная галактозидаза сохраняет исходную активность в течение 80 суток работы. При использовании очень активных волокон, содержащих фермент в количестве 1500 еди-

ниц на 1 г волокна, можно проводить гидролиз молочной лактозы при низких температурах ( $5^{\circ}\text{C}$ ), не опасаясь изменить органолептические свойства обработанного молока или внести бактерии (см. табл. 4). Опытная установка, работающая при этих условиях, демонстрирует возможность промышленного проведения гидролиза молочной лактозы, что решило бы проблему удаления лактозы из пищевых продуктов.

*Гидролиз пенициллина.* Пенициллиназа была иммобилизована путем ковалентного связывания с производными хлор-*сим*-триазинилцеллюлозы<sup>59, 60</sup>. По данным работы<sup>59</sup>, иммобилизованный фермент име-

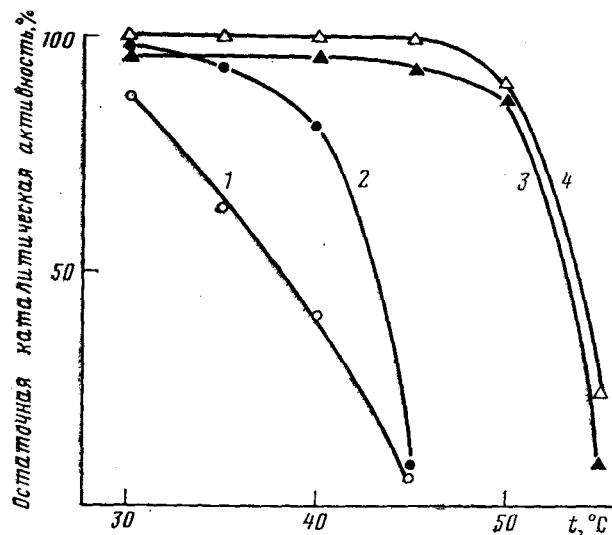


Рис. 3. Температурная устойчивость свободной  $\beta$ -галактозидазы из дрожжей:  
1 — после 22 час, 2 — после 6 час инкубации из *E. coli*; 3 — после 22 час, 4 — после 6 час инкубации

ет активность, равную 25% от активности в растворе, и сохраняет ее в течение 11 недель работы при  $37^{\circ}$ . В работе<sup>60</sup> лучшие образцы обладают активностью от 70 до 120  $\mu\text{моль}/\text{мин}$  на 1 г носителя, что составляет 45—80% от активности фермента в растворе.

ТАБЛИЦА 4

Влияние плотности заполнения колонок волокном из триацетатцеллюлозы с включенной в него  $\beta$ -галактозидазой из дрожжей на гидролиз молочной лактозы

Количество волокна, г на 1 мл объема колонки	Степень гидролиза молочной лактозы, % *			
	30 мин	60 мин	120 мин	180 мин
0,115	7,75	12,4	23,7	33,7
0,250	7,75	15,0	27,0	38,5
0,400	11,0	14,4	29,8	40,7

\* Молоко в количестве 500 мл при  $25^{\circ}$  циркулирует через колонку со скоростью 10 л/час.

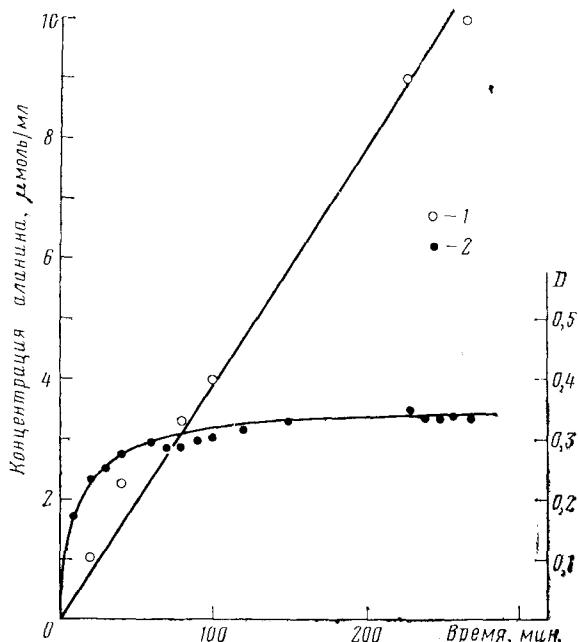
В нашей лаборатории<sup>61</sup> проведена иммобилизация пенициллиназы из *E. coli* в волокнах из триацетата целлюлозы. Активность достигает 40  $\mu\text{моль}/\text{мин}$  на 1 г носителя и остается постоянной в течение

150 дней при 37°С. Степень гидролиза пенициллина на ферменте составляет 98%.

В настоящее время в нашей лаборатории получены нерастворимые образцы с активностью 110 мкмоль/мин на 1 г носителя, с помощью которых можно провести гидролиз 12%-ного раствора пенициллина за короткое время. На тех же волокнах осуществлен синтез ампициллина из 6-аминопенициллановой кислоты и сложных эфиров фенилглицина с выходом около 70%. Кроме того, с хорошим выходом проходит гидролиз цефалоспоринов, производных пенициллина.

*Перегруппировки в стероидах.* Клетки *Curvularia lunata*, уловленные в полиакриламидном геле, используются для 11- $\beta$ -гидроксилирования соединений Рейхштейна<sup>62</sup>. В этой же работе сообщается о получении иммобилизованных клеток *Corinebacterium Simplex*, которые

Рис. 4. Кинетика реакции получения аланина, катализированной лактатдегидрогеназой и аланиндеидрогеназой, иммобилизованными в волокнах: 1 — увеличение концентрации аланина; 2 — изменение концентрации NADH ( $D$  — оптическая плотность на длине волны 340 нм)



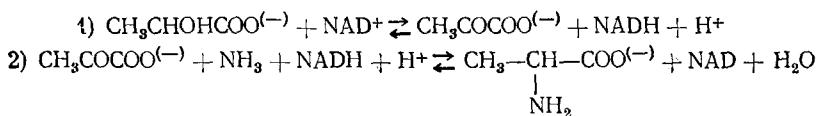
сохраняют  $\Delta$ -1-дегидрогеназную активность и могут быть использованы в колонках. Однако в обоих случаях активность систем слишком мала для использования их в промышленности.

*Последовательные реакции.* Наибольший теоретический и практический интерес представляет возможность катализа ряда последовательных реакций без выделения промежуточных соединений. Браун с сотр.<sup>63</sup> исследовали расщепление глюкозы с помощью четырех гликолитических ферментов: гексокиназы, фосфоглюкозоизомеразы, фосфофруктокиназы и альдолазы. Ферменты были включены в полиакриламидный гель и помещены в колонку в нужной последовательности.

Мосбах и Маттиасон<sup>39, 64</sup> изучали ферментные комплексы, связанные с той же матрицей. В работе<sup>39</sup> были получены ковалентно связанные с сефадексом  $\beta$ -галактозидаза, гексокиназа и глюко-6-фосфатдегидрогеназа. Оказалось, что такой связанный комплекс имеет большую активность, чем в растворе; авторы объяснили это влиянием диффузии.

В нашей лаборатории получены включенные в волокна лактатдегидрогеназа и аланиндеидрогеназа для получения аланина из лактата и

аммиака:



На рис. 4 приведены типичные кинетические кривые, показывающие, что концентрация аланина увеличивается по линейному закону, тогда как концентрация NADH за  $\sim 100$  мин достигает стационарного значения. Время достижения стационарной концентрации определяется диффузией NADH из микрополостей волокон в объем раствора.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. J. J. H. Hastings, Adv. Appl. Microbiol., 14, 1 (1971).
2. L. A. Underkofer, Chem. Eng. Progr. Symp. Series, 62 (69), 11 (1966).
3. E. J. Beckhorn, M. D. Labbee and L. A. Underkofer, J. Agr. Food Chem., 13, 30 (1965).
4. L. Moravek, C. B. Anfinsen, J. L. Cone, H. Taniuchi, J. Biol. Chem., 244, 497 (1969).
5. P. Cuatrecasas, C. B. Anfinsen, Ann. Rev. Biochem., 40, 259 (1971).
6. J. Porath, Sci. Tools, 11, 21 (1964).
7. M. C. Porter, Biotechnol. Bioeng. Symp., No. 3, 115 (1972).
8. L. A. Underkofer, R. R. Barton, S. S. Rennert, Appl. Microbiol., 6, 212 (1958).
9. L. Keay, Process Biochemistry, 6, 17 (1971).
10. K. H. Gustavson, The Chemistry of Tanning Processesm Acad. Press, N. Y., 1956.
11. M. Sherwood, School Science Review, 50, Part 173, 762 (1969).
12. E. M. Fischer, L. Kohtes, J. Fellig, Helv. Chim. Acta, 34, 1132 (1951).
13. W. W. Windish, N. S. Mhetre, Adv. Appl. Microbiol., 7, 273 (1965).
14. K. G. De Noord, Some aspects of the use of enzymes in the manufacture of starch hydrolysates, Dechema — Monographien, No. 1327—1350 (Verlag Chemie, GmbH) 247, 1971.
15. L. A. Underkofer, Development of a commercial enzyme process: Glucoamylase, cellulases and their applications (American Chemical Society Publications), 1969, p. 343.
16. Y. Hattori, Die Stärke, 17, 82 (1965).
17. U. S. Patent 3, 042, 584; July 3, 1962; assigned to Corn Products Co., C. A., 57, 8790a (1962).
18. U. S. Patent 3, 067, 108; December 4, 1962; ass. to A. E. Staley Manufacturing Co; C. A., 57, 16949a (1962).
19. U. S. Patent 3, 108, 298; October 29, 1963; Ass. to Grain Processing Corp.; C. A., 60, 5834g (1964).
20. U. S. Patent 3, 303, 102; February 7, 1967, Ass. to Corn Products Co., C. A., 66, 74957b (1967).
21. U. S. Patent 3, 335, 066; August 8, 1967; Ass. to Grain Processing Corp., C. A., 67, 10414k (1967).
22. L. A. Underkofer, W. J. Ferracane, Food Eng., 1957, April, 123.
23. M. Mandels, J. Weber, The Production of Cellulases, Cellulases and their applications (American Chemical Society Publications), 391, 1969.
24. T. K. Ghose, J. A. Kostick, Enzymatic Saccharification of cellulose in semi—and continuously a gitated systems, Celluloses and their applications (American Chemical Society Publications), 115, 1969.
25. N. Toyama, K. Ogawa, Fourth Internat. Fermentation Symp., Kyoto, 19—25 March, 1972.
26. R. D. Falb, Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 3, 177 (1972).
27. T. M. S. Chang, Там же, No. 3, 395 (1972).
28. D. Dinelli, Process Biochem., 7, 9 (1972).
29. G. Manecke, Biotechnol. Bioeng. Symp., No. 3, 185 (1972).
30. R. Goldman, L. Goldstein, E. Katchalski, Water-insoluble enzyme derivatives and artificial enzyme membranes, Biochemical aspects of reactions on solid support. Acad. Press, N. Y., 1971.
31. D. Thomas, E. Brown, E. Selegny, Biochimie, 54, 229 (1972).
32. M. L. Bender, F. J. Kezdy, Ann. Rev. Biochem., 34, 49 (1965).
33. E. M. Crook, FEBS Symposium, 19, 297 (1969).
34. H. D. Orth, W. Brümmer, Angew. Chem. Internat. Edit., 11(4), 249 (1972).
35. R. Goldman, E. Katchalski, J. Theor. Biol., 32A, 243 (1971).
36. M. D. Lilly, A. K. Sharp, Chem. Eng., 215, CE12 (1968).
37. W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook, Biochem. J., 98, 420 (1966).

38. I. H. Silman, M. Albu-Weissenberg, E. Katchalski, Biopolymers, 4, 441 (1966).
39. B. Mattiasson, K. Mosbach, Biophys. Acta, 235, 253 (1971).
40. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, Enzymol., 31, 214 (1966).
41. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, Там же, 32, 153 (1967).
42. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, Biotechnol. Bioeng., 9, 603 (1967).
43. T. Tosa, T. Mori, I. Chibata, Agr. Biol. Chem., 33, 1053 (1969).
44. T. Tosa, T. Mori, I. Chibata, J. Ferment. Technol., 49, 522 (1971).
45. T. Sato, T. Mori, T. Mori, I. Chibata, Archs. Biochem. Biophys., 147, 788 (1971).
46. T. Mori, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, Enzymol., 43, 213 (1972).
47. R. J. H. Wilson, M. D. Lilly, Biotechnol. Bioeng., 11, 349 (1969).
48. S. P. O'Neill, P. Dunnill, M. D. Lilly, Biotechnol. Bioeng., 13, 337 (1971).
49. K. L. Smiley, Там же, 13, 309 (1971).
50. C. Gruesbeck, H. F. Rase, Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop., 11, 74 (1972).
51. C. Corno, G. Galli, F. Morisi, M. Bettonte, A. Stopponi, Die Stärke, 12, 420 (1972).
52. T. A. Butterworth, D. J. C. Wang, A. J. Sinskey, Biotechnol. Bioeng., 12, 615 (1970).
53. H. H. Weetall, N. B. Hawewala, Biotechnol. Bioeng. Symp., No. 3, 241 (1972).
54. K. Martensson, K. Mosbach, Biotechnol. Bioeng., 14, 715 (1972).
55. S. Giovenco, P. Morisi, P. Pansolli, FEBS letters, 36, 57 (1973).
56. A. K. Sharp, G. Kay, M. D. Lilly, Biotechnol. Bioeng., 11, 363 (1969).
57. H. Nilsson, R. Mosbach, K. Mosbach, Biochim. Biophys. Acta, 268, 253 (1972).
58. F. Morisi, M. Pastore, A. Viglia, J. of Dairy Science, 56, 1123 (1973).
59. D. A. Self, G. Kay, M. D. Lilly, P. Dunnill, Biotechnol. Bioeng., 11, 33 (1969).
60. D. Warburton, K. Balasingham, P. Dunnill, M. D. Lilly, Biochim. Biophys. Acta, 284, 278 (1972).
61. W. Marconi, F. Cecere, F. Morisi, G. Della Penna, B. Rappuoli, J. of Antibiotics, 26, No. 4, 228 (1973).
62. K. Mosbach, P. O. Larsson, Biotechnol. Bioeng., 12, 19 (1970).
63. H. D. Brown, A. B. Patel, S. K. Chatopadhyay, J. Chromatogr., 35, 253 (1968).
64. K. Mosbach, B. Mattisaaon, Acta Chem. scand., 24, 2093 (1970).
65. F. Morisi, M. Pastore, A. Viglia, J. of Dairy Science, 57, 269 (1974).

Исследовательские лаборатории  
Снэмпрогетти, Рим, Италия