

УДК 577.152.513.042.

Свойства препарата иммобилизованной глюкозоизомеразы «Имфрузим»

Е. Г. ПОЛИЩУК, И. И. МЕНЯЙЛОВА, Л. А. НАХАПЕТЯН
ВНИИ биотехнологии, Москва

Определена активность препарата иммобилизованной глюкозоизомеразы, которая составила 240 ед./г, что соответствует уровню активности препаратов фирмы Novo (Дания). Энергия активации реакции изомеризации и энергии реакции инактивации равны соответственно 53,3 и 117 кДж. В зависимости от температуры значения констант равновесия прямой и обратной реакций изомеризации варьировали от 1,060 до 1,162. Найдена зависимость значений $K_{M \text{ каж.}}$ и V_{max} от температуры и концентрации ионов магния.

Иммобилизованная глюкозоизомераза к настоящему времени широко применяется в пищевой промышленности многих стран для получения полноценного заменителя сахара — глюкозо-фруктозного сиропа. Его производство в 1984 г. только в США достигло 3,8 млн. т [1]. В связи с этим всестороннее изучение свойств препарата иммобилизованной глюкозоизомеразы «Имфрузим» представляется весьма актуальным.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Препарат иммобилизованной глюкозоизомеразы клеток «Имфрузим» был получен поперечной сшивкой клеток продуцента и желатина с помощью глутарового альдегида [2].

Активность глюкозоизомеразы определяли при 70°, рН 7,0 и использовании в качестве субстрата 40 %-ного раствора глюкозы, содержащего $4 \cdot 10^{-3}$ М ионов магния. 1 единица активности превращает в указанных условиях 1 мкМ глюкозы во фруктозу за 1 мин. Содержание фруктозы и глюкозы в растворах определяли поляриметрически [3]. Активность препарата составила 240 ед./г.

Концентрацию глюкозы и фруктозы в опытах по определению величин эффективных кинетических параметров прямой и обратной реакции изомеризации изменяли в пределах 0,3—2,2 М.

При изучении влияния ионов магния на значение эффективной константы K_M концентрацию иона металла изменяли в пределах 10^{-4} — 10^{-1} М.

Все опыты проводили в термостатированных колонках, для каждого опыта в колонку помещали 1 г иммобилизованной глюкозоизомеразы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучено влияние температуры на начальную скорость реакции изомеризации глюкозы во фруктозу (рис. 1).

Величина энергии активации реакции изомеризации, рассчитанная по полученным данным, составила 12 700 кал, или 53,3 кДж.

Определена зависимость логарифма периода полуинактивации от температуры. Данные эксперимента приведены на рис. 2.

Рассчитанная из этих данных величина энергии активации реакции инактивации иммобилизованной глюкозоизомеразы составила 27 900 кал, или 117 кДж, что хорошо согласуется с литературными данными [4]. Существенная разница в значениях энергии активации реакций изомеризации и инактивации указывают на стабильность иммобилизованного препарата и возможность практического его использования.

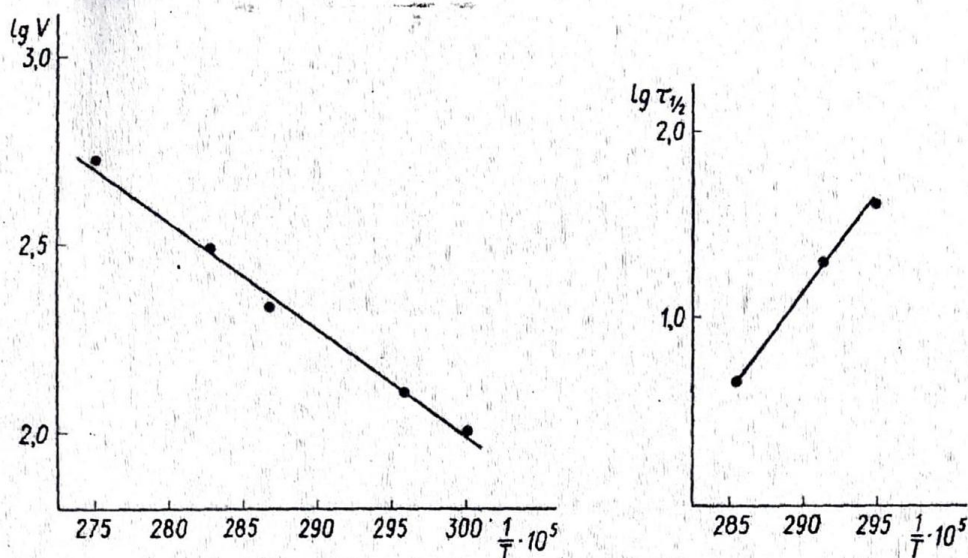


Рис. 1. Зависимость логарифма начальной скорости реакции изомеризации от величины, обратной температуре

Рис. 2. Зависимость логарифма периода полуинактивации от величины, обратной температуре

На рис 3 представлена кривая накопления продукта реакции изомеризации при разных скоростях притока субстрата к слою иммобилизованного фермента.

В качестве субстрата были взяты растворы глюкозы или фруктозы с содержанием сухих веществ (СВ) 40 %. Равновесная концентрация глюкозы в процессе изомеризации фруктозы составила 48,5 %, а равновесная концентрация фруктозы при использовании в качестве субстрата глюкозы — 51,5 %, т. е. константа равновесия при 60° рав-

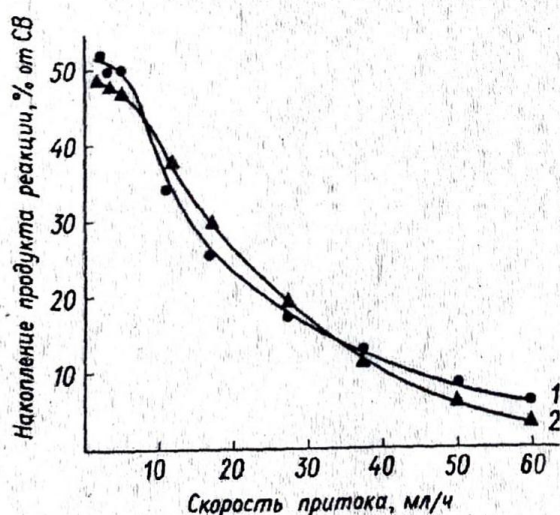


Рис. 3. Зависимость накопления продукта реакции от скорости притока субстрата (60°):
1 — субстрат глюкоза; 2 — субстрат фруктоза

на 1,06. Зависимость константы равновесия от температуры представлена в табл. 1.

Из данных, приведенных в этой таблице, видно, что константа равновесия с повышением температуры возрастает, но незначительно, что согласуется с литературными данными, приведенными в обзорных работах [5, 6]; существенное возрастание константы равновесия с 0,83 при 30° до 1,38 при 80° наблюдали для нативного препарата глюкозоизомеразы из *Bacillus coagulans* [7].

Изучено влияние различных факторов на начальную скорость реакции изомеризации. Величины $K_{м\text{ каж}}$ и $V_{\text{мах}}$ были рассчитаны по методу Лайнуивера — Берка.

В табл. 1 приведены значения $K_{м\text{ каж}}$ и $V_{\text{мах}}$ в зависимости от температуры реакции. Видно, что значения $K_{м\text{ каж}}$ для прямой реакции на-

Таблица 1

Зависимость кинетических констант и V_{\max} прямой и обратной реакций изомеризации от температуры

Температура °C	$K_{\text{равн.}}$	$K_{\text{Mг каж.}}$ М	$V_{\max} \cdot 10^{-4}$, М/мин·г	$K_{\text{Mг каж.}}$ М	$V_{\max} \cdot 10^{-4}$, М/мин·г
30	—	0,67	1,28	1,33	0,62
50	—	0,58	2,00	1,33	0,74
60	1,060	0,53	2,63	1,33	1,54
70	1,080	0,48	3,33	1,33	2,00
80	1,093	0,43	3,57	1,33	2,50
90	1,162	—	—	—	—

Таблица 2

Влияние ионов магния на кинетические константы реакции изомеризации

Концентрация ионов магния, М	$K_{\text{Mг каж.}}$ М	$V_{\max} \cdot 10^{-4}$, М/мин·г	$K_{\text{Mг каж.}}$ М	$V_{\max} \cdot 10^{-4}$, М/мин·г
0	0,60	2,50	0,80	2,22
$5 \cdot 10^{-4}$	0,56	2,75	1,07	2,00
10^{-3}	0,51	2,93	1,26	1,68
10^{-2}	0,49	3,22	1,45	1,50
10^{-1}	0,47	3,44	1,56	1,42

ходятся в пропорциональной зависимости от температуры, тогда как значения $K_{\text{Mг каж.}}$ обратной реакции не зависят от температуры. Максимальная скорость прямой и обратной реакции увеличивается с повышением температуры, причем скорость прямой реакции в 1,5—2,0 раза выше, чем обратной реакции при одних и тех же значениях температуры, что согласуется с литературными данными [4,8—10].

В табл. 2 приведены значения $K_{\text{Mг каж.}}$ и V_{\max} в зависимости от концентрации ионов магния в субстрате.

Приведенные данные показывают, что значения $K_{\text{Mг каж.}}$ прямой реакции уменьшаются с увеличением концентрации ионов магния, а обратной — возрастают. Максимальная скорость прямой реакции увеличивается с увеличением концентрации ионов магния, а обратной реакции — уменьшается. В литературе практически не встречаются данные о зависимости $K_{\text{Mг}}$ от концентрации ионов металлов-активаторов. Подробное исследование активирующего действия ионов магния и кобальта и расчет кинетических констант для различных концентраций указанных ионов представлены лишь в работе [11] для глюкозо-изомеразы из *Actinomyces, olivocinereus*.

Таким образом, энергия активации реакции изомеризации глюкозы, катализируемой препаратом иммобилизованной глюкозоизомеразы «Имфрузим», составляет 53,3 кДж; а энергия активации реакции инактивации иммобилизованного фермента — 117 кДж. Сопоставление вышеуказанных величин позволяет сделать заключение о возможности практического использования препарата «Имфрузим» в длительном непрерывном или многократном периодическом процессах изомеризации.

Значения константы равновесия в изученном диапазоне температуры (60—90°) составили 1,060—1,162, т. е. нельзя добиться существенного увеличения концентрации фруктозы в равновесной смеси увеличением температуры процесса.

Исследования кинетических констант в зависимости от температуры процесса и концентрации ионов магния показали, что скорость реакции изомеризации глюкозы во фруктозу можно повысить путем увеличения температуры и концентрации ионов магния.

Поступила 27.02.86

ЛИТЕРАТУРА

1. World Sugar Journal, 1984, v. 7, N 1, p. 14—16.
2. Головина Н. С., Месяйлова Н. И., Нахапетян Л. А и др.— Сахарная промышленность, 1985, № 3, с. 42—44.

3. McKay G. A., Talvarides L. L.— J. Molec. Catalysis, 1979, v. 6, p. 57—59.
4. Chen L. F., Gong C. S., Tsao G. T.— Starch / Stärke, 1981, v. 33, N 2, p. 58—63.
5. Tewari Y. B., Goldberg R. N.— Appl. Biochem. Biotechnol. 1985, v. 11, N 1, p. 17—24.
6. Starch conversion technology / Ed G. M. A., van Beynum., J. A. Roels.— N.-Y., Basel, 1985, p. 205.
7. Makkee M., Kieboom A. P. G., van Bekkum H.— Starch / Stärke, 1985, v. 37, N 7, p. 232—241.
8. Lee Y. Y., Fratzke A. R., Wun K. et al.— Biotechnol. Bioeng., 1976, v. 18, p. 389—413.
9. Chen F.-S., Weng H.-Sh., Zai Ch.-L.— Biotechnol. Bioeng., 1983, v. 25, p. 725—733.
10. Ching C. B., Ho Y. Y., Rathor M. N.— Biotechnol. Bioeng., 1984, v. 26, p. 820—823.
11. Ананичев А. В. и др.— Биохимия, 1983, т. 48, вып. 1, с. 111—118.

The Properties of Immobilized Glucose Isomerase Preparation "Imfruzim"

Ye. G. POLISHCHYUK, I. I. MENYAILOVA, L. A. NAKHAPETYAN
All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow

The activity of immobilized glucose isomerase preparation has been measured to be 240 U/g, which corresponds to that of the Novo Co. (Denmark) preparation. Activation energies of isomerization and inactivation have been found to be 53,3 and 117 kJ respectively. Equilibrium constants for the direct and the reverse isomerization reactions have been observed to vary with temperature from 1,060 to 1,162. For $K_{M \text{ apparent}}$ and V_{max} temperature and magnesium ions concentration dependences have been determined.

ПО СТРАНИЦАМ ПЕЧАТИ

На рынке аминокислот и их производных

Потребление лизина в качестве кормовой добавки сильно зависит от цен на сою. Снижение цен на соевую муку в июле 1985 г. до 120 долл./т привело к уменьшению спроса на лизин. Однако в сентябре того же года цена на соевую муку поднялась до 146 долл./т, а в январе 1986 г. составила 155 долл./т. Это привело к восстановлению спроса на лизин. Осенне-зимнее повышение цен на соевую муку связывают с засухой в Бразилии, а также снижением покупательной способности доллара и увеличением экспортных поставок сои [1].

Согласно исследованию фирмы Eldib Engineering and Research (США) получение фенилаланина микробиологическим путем является наиболее экономичным способом производства этой аминокислоты. Рынок фенилаланина возрастет с 3125 т в 1985 г. по крайней мере до 8000 т в 1990 г. благодаря расширению его использования для производства аминокислотного подсластителя аспартама. По расчетам указанной фирмы, себестоимость фенилаланина, полученного путем культивирования микроорганизмов на среде, содержащей углеводы, может составить от 14,5 до 15,5 долл./кг. Фирма Searle (США) прекратила закупку дорогостоящего фенилаланина у фирм Genex и Purification Engineering, производящих его химическим способом соответственно из коричной кислоты и гидантона [2].

1. Chemical Marketing Reporter, 1986, v. 229, N 4, p. 19.
2. Ibid., 1986, v. 229, N 1, p. 4.