

УДК 547.96:577.152.34

В. В. Цибанов, Т. А. Логинова, А. Д. Неклюдов

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТЕОЛИЗА В рН-СТАТИРУЕМЫХ БИОРЕАКТОРАХ. 1. ФОРМУЛИРОВКА КИНЕТИЧЕСКИХ УРАВНЕНИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ПАРАМЕТРОВ

ВНИИ антибиотиков, Москва

В последние годы в области ферментативного катализа и биотехнологии определилась тенденция к углубленному изучению реакций гидролиза полимерных субстратов – полисахаридов и белков [1, 8]. Практическая сторона дела в последнем случае связана с проблемами получения пищи из нетрадиционных источников сырья, создания новых эффективных и недорогостоящих препаратов парентерального белкового питания [10]. Успех промышленного внедрения новых процессов биокаталитического гидролиза белков во многом будет зависеть от правильного выбора условий проведения реакции, поэтому особенно важной становится разработка инженерных подходов к оптимизации протеолиза и к решению более частных задач расчета и сопоставления эффективности реакторов разного типа. Следует отметить, что хотя теоретический аппарат комплексной оптимизации биокаталитических процессов развит достаточно полно [6, 7], в практическом аспекте изучены в основном ферментативные реакции с формально-двухстадийным механизмом [12, 20, 23].

Известно лишь сравнительно небольшое число публикаций, касающихся моделирования и количественного описания интегральной кинетики биопротеолиза [2, 4, 16-19]. Из их рассмотрения следует, что для решения прикладных задач, связанных с расчетом реакторов, приходится пользоваться формализованными макрокинетическими концепциями, основанными на описании кинетики сложных процессов без детализации их механизма.

С этих позиций нами предпринята попытка моделирования кинетики гидролиза казеина нативным (далее – НФ) и иммобилизованным (ИФ) комплексом эндопептидаз (протосубтилин) для выбора условий получения смесей пептидов, предназначенных к дальнейшей переработке в аминокислотные препараты медицинского назначения [11]. Дополнительно был исследован гидролиз белка в рН-статируемых биореакторах трех типов: с перемешиванием периодического действия и проточных – с перемешиванием и с вытеснением, работающих в кинетическом режиме. Цель работы: 1) формулировка уравнений, описывающих действие реакторов, 2) оценка параметров кинетических уравнений из интегральных кинетических кривых, 3) нахождение оптимальных режимов протеолиза по одному управляемому параметру – концентрации субстрата и 4) сравнение различных реакторов по их производительности. Данное сообщение касается первых двух вопросов.

Следует отметить, что основные закономерности и математическое описание действия биореакторов в литературе рассматривались неоднократно [3, 13, 22]. Однако речь шла о реакциях, соответствующих модели Михаэлиса-Ментен. Нам представилось необходимым и удобным учесть, ввиду специфики задачи, более общие кинетические модели и, кроме того, представить конечные уравнения в таком виде, чтобы они отражали изменение непосредственно регистрируемого в ходе гидролиза параметра – объема титранта, подающегося в реактор.

О *понятии степени конверсии белка*. Физико-химические и биологические свойства белковых гидролизатов зависят прежде всего от аминокислотного состава исходного сырья, молекулярно-массового распределения и качественного состава продуктов гидролиза. Установлено, что многие физико-химические показатели гидролизатов одного и того же белка, полученных с помощью данного протеолитического препарата, определяются только степенью гидролиза пептидных связей независимо от того, при каких условиях она достигнута [16]. Таким образом, этот показатель, эквивалентный общепринятому в биокатализе понятию степени конверсии субстрата, должен рассматриваться как контролируемый параметр реакции. В дальнейшем под степенью конверсии (X) белкового субстрата будет пониматься доля пептидных связей, расщепленных в данный момент времени в данном объеме реакционной смеси.

Реактор с перемешиванием периодического действия (РППД). Если в реактор, содержащий V_0 (мл) раствора белка и некоторое количество фермента или гетерогенного биокатализатора, в ходе рН-статирования введен титрант (раствор основания) концентрации C_T (ммоль/мл) в объеме V (мл), то по определению

$$X = [C_S^0 \cdot V_0 - C_S \cdot (V_0 + V)] / (C_S^0 \cdot V_0), \quad (1)$$

где C_S^0 - начальная концентрация пептидных связей в реакторе, мг-экв/мл, $C_S = C_S(t)$ - концентрация пептидных связей, оставшихся нерасщепленными к моменту времени t . Здесь и далее учитывается возможность разбавления реакционной смеси титрантом. Если далее χ - доля продукта (протонированных α -аминогрупп), оттитровываемого при данном значении рН, то из уравнения материального баланса субстрата

$$C_S^0 V_0 = C_S \cdot (V_0 + V) + (C_T / \chi) \cdot V, \quad (2)$$

и формулы (1) следует, что

$$X = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{C_S^0 - C_S}{C_S^0 \cdot (C_T / \chi + C_S)} = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{1}{C_S^0} \cdot \frac{V}{V_0}. \quad (3)$$

Таким образом, задача описания гидролиза в РППД сводится к нахождению функции $V = V(t)$ (так называемой интегральной кривой рН-статического титрования) и зависимости ее параметров от условий реакции.

Проточный реактор с перемешиванием (ПРП). Данный тип реактора представляет собой емкость, содержащую гетерогенный биокатализатор и жидкость объемом V_0 , куда с постоянной скоростью ω (мл/мин) при перемешивании вводится раствор белка с концентрацией пептидных связей C_S^0 и одновременно для поддержания постоянства рН добавляется раствор титранта. Из реактора со скоростью $\omega + dV/dt$ отводится раствор, содержащий C_S остаточных пептидных связей.

Степень конверсии субстрата в ПРП в любой момент времени удобно определить как долю расщепленных пептидных связей в бесконечно малой порции исходного субстрата, введенного в реактор:

$$X = \frac{C_T}{\chi \omega \cdot C_S^0} \cdot \frac{dV}{dt}. \quad (4)$$

В стационарном режиме, когда концентрация субстрата в реакторе C_S перестает изменяться, скорость титрования dV/dt постоянна. Тогда за время подачи V_0 мл субстрата, $t = V_0 / \omega$, в реактор поступит объем титранта $V_{cm} = (dV/dt) \cdot t = (dV/dt) \cdot V_0 / \omega$. Отсюда

$$\frac{dV}{dt} = \omega \cdot \frac{V_{cm}}{V_0} \quad (5)$$

Подстановкой (5) в (4) получается выражение для стационарной степени конверсии в ПРП

$$X_{cm} = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{1}{C_S^0} \cdot \frac{V_{cm}}{V_0}, \quad (6)$$

которое совпадает с формулой (3) для X в РППД.

В то же время ясно, что скорость потребления титранта должна определяться интенсивностью взаимодействия фермента с субстратом в объеме реактора. Скорость же ферментативной реакции однозначно определяется степенью конверсии или, согласно (3, 6), соотношением объемов V/V_0 титранта и субстрата, введенных в систему к данному моменту времени. Таким образом, если известно дифференциальное уравнение кинетики ферментативной реакции, то его можно представить в виде

$$\frac{dV}{dt} = f(V/V_0). \quad (7)$$

Сравнивая (7) с (5), видим, что величина V_{cm} для ПРП должна находиться решением алгебраического уравнения

$$f(V_{cm}/V_0) = \omega \cdot V_{cm}/V_0. \quad (8)$$

Требуемая для этого дифференциальная зависимость (7) может быть получена из интегральной кривой $V(t)$ в периодическом реакторе.

Проточный реактор с вытеснением (ПРВ). Колоночный реактор с неподвижной твердой фазой (иммобилизованным ферментом), работающий в кинетическом режиме при отсутствии градиента рН вдоль слоя, теоретически эквивалентен каскаду малых по объему ПРП. На практике такой "идеально рН-статируемый" реактор с вытеснением, конечно, не реализуется. Градиент рН, если он нежелателен, устраняется последовательным соединением звеньев, каждое из которых состоит из ПРВ и проточной ячейки рН-стата (смесителя). Но для описания реактора удобно каждое звено представить как идеально рН-статируемый ПРВ. Выделим в нем бесконечно малый слой с объемом жидкой фазы dV_0 . Согласно материальному балансу субстрата, при подаче в слой порции раствора с концентрацией C_S со скоростью dV/dt (принято, что $dV/dt \ll \omega$, т.к. фактически титрант подается не в слой, а в смеситель) изменение концентрации субстрата

$$-dC_S = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{1}{\omega} \cdot \frac{dV}{dt} = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{dV}{dV_0}, \quad (9)$$

где dV/dV_0 - отношение объемов титранта и субстрата, поступающих в слой за время контакта с катализатором $dt = dV_0/\omega$. Если $dV(l)$ - объем титранта, поданного в весь реактор с длиной слоя l (в смеситель) при поступлении в колонку dV_0 мл субстрата, то изменение его концентрации в ПРВ находится интегрированием (9) по длине слоя:

$$C_S^0 - C_S(l) = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{dV(l)}{dV_0} = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{1}{\omega} \cdot \frac{dV(l)}{dt}.$$

Отсюда степень конверсии в любой момент времени на выходе колонки

$$X = \frac{C_S^0 - C_S(l)}{C_S^0} = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{1}{\omega C_S^0} \cdot \frac{dV(l)}{dt}. \quad (10)$$

В стационарном режиме, когда устанавливается градиент концентрации субстрата вдоль слоя, $C_s(l)$ и $dV(l)/dt$ постоянны, а $C_s^0 - C_s(l) = (C_T/\chi) \cdot V(l)/V_0$. Здесь $V(l)$ – объем титранта, подающегося в смеситель при поступлении в реактор V_0 мл субстрата. Соответственно стационарная степень конверсии

$$X_{cm} = \frac{C_T}{\chi} \cdot \frac{1}{C_s^0} \cdot \frac{V(l)}{V_0}. \quad (11)$$

Найденные выражения (10, 11) совпадают с аналогичными соотношениями (4, 6) для X в ПРП.

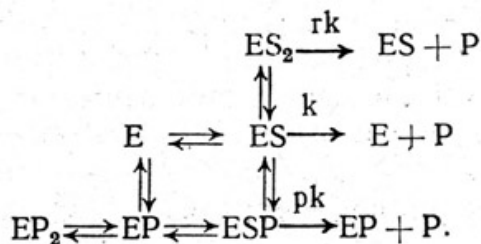
Согласно (8), стационарный режим работы слоя, как бесконечно малого по объему ПРП, должен описываться дифференциальным уравнением $f(V_{cm}/V_0) = \omega \cdot dV_{cm}/dV_0$, интегрирование которого по всему объему реактора дает кинетическое уравнение действия ПРВ:

$$\int_0^{V(l)} \frac{dV_{cm}}{f(V_{cm}/V_0)} = \frac{V_0}{\omega}. \quad (12)$$

Здесь V_0/ω есть время контакта раствора с катализатором в колонке. Таким образом, зная зависимость (7), можно предсказать также и ход реакции гидролиза в стационарном кинетическом режиме ПРВ. При этом $V(l)$ находится аналитическим или численным решением уравнения (12), а стационарная степень конверсии – из формулы (11).

Видно, что информация о ходе гидролиза в РППД является при некоторых допущениях достаточной для описания проточных реакторов, поэтому имеется возможность оценивать режим и эффективность их работы на основании моделирования и экспериментального изучения обычной интегральной кинетики гидролиза в рН-стате.

Выбор кинетической модели. В приведенных выше соотношениях вид кинетических функций (моделей) $V = V(t)$ и $dV/dt = f(V/V_0)$ пока не оговаривался. В практическом отношении безразлично, являются ли они эмпирическими или детерминированными (отвечающими конкретным представлениям о механизме реакции). Но последние предпочтительнее, т.к. только они допускают содержательную трактовку результатов подгонки к опытным данным. В качестве модели такого рода было опробовано ранее полученное обобщенное уравнение рН-статной кривой гидролиза в РППД. В основе уравнения лежит следующая (базисная) схема взаимодействия фермента E с субстратом S [11, 15]:



Примененная к протеолизу схема предполагает наличие в реакционной смеси набора в основном равнодоступных пептидных связей с близкой реакционной способностью, а любое отклонение хода реакции от предсказанного моделью Михаэлиса – Ментен формально приписывается образованию активных или пассивных комплексов ES_iP_j . Соответствующее кинетическое уравнение

$$\frac{dV}{dt} = \alpha \cdot V_0 \frac{1 + A \cdot V/V_0 + C \cdot (V/V_0)^2}{1 + D \cdot V/V_0 + E \cdot (V/V_0)^2} \quad (13)$$

включает 5 варьируемых параметров – макрокинетические псевдоконстанты A, C, D, E и α , которые связаны с элементарными кинетическими константами отдельных стадий, константами устойчивости комплексов и начальной концентрации субстрата [15].

Для придания общности уравнениям и сведения к минимуму числа входящих в них параметров вводятся безразмерные величины: $W = V/V_0$ – объем титранта, $S = C_s \cdot \chi / C_T$ – концентрация субстрата, $T = \alpha \cdot t$ – время реакции, $\Omega = \omega / (\alpha \cdot V_0)$ – скорость подачи раствора субстрата. Балансные и кинетические уравнения действия реакторов, записанные в безразмерных величинах, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Основные уравнения действия рН-стативируемых биореакторов

Группа уравнений	Тип реактора		
	РППД	ПРП	ПРВ
Интегральный баланс	$W = \frac{S_0 - S}{1 + S}$	$W = \Omega S_0 - S - \int_0^T \left(\Omega + \frac{dW}{dT} \right) S dT$	–
Дифференциальный баланс	$\frac{dW}{dT} = - \frac{1 + S_0}{(1 + S)^2} \cdot \frac{dS}{dT}$	$\frac{dS}{dT} = \Omega(S_0 - S) - (S + 1) \cdot \frac{dW}{dT}$	$-dS = \frac{1}{\Omega} \cdot \frac{dW}{dT}$ (а)
Дифференциальный баланс в стационарном режиме	–	$\left. \frac{dW}{dT} \right _{cm} = \Omega \cdot \frac{S_0 - S_{cm}}{1 + S_{cm}}$	$\left. \frac{dW}{dT} \right _{cm} = \Omega \cdot \frac{S_0 - S_{cm}}{1 + S_{cm}}$ (б)
Определение X	$X = \frac{S_0 - S}{(1 + S)S_0} = \frac{W}{S_0}$	$X = \frac{1}{\Omega S_0} \cdot \frac{dW}{dT}$	$X = \frac{S_0 - S}{S_0}$ (в)
X в стационарном режиме	–	$X_{cm} = \frac{S_0 - S_{cm}}{(1 + S_{cm})S_0} = \frac{W_{cm}}{S_0}$ (з)	$X_{cm} = \frac{1}{\Omega S_0} \left. \frac{dW}{dT} \right _{cm} = \frac{W_{cm}}{S_0}$
Кинетика	$\frac{dW}{dT} = F(W);$ $F(W) \equiv \frac{1 + AW + CW^2}{1 + EW + DW^2}$	$\frac{dW}{dT} = (1 + W)[F(W) - \Omega W]$	–
Стационарная кинетика	–	$F(W_{cm}) = \Omega W_{cm}$	$\int_0^{W_{cm}} \frac{dW}{F(W)} = \Omega^{-1}$

Примечание. (а) – в элементарном объеме dV_0 ; (б) – в смесителе; (в) – на выходе из колонки; (з) – $W = (V_i') \cdot \omega^{-1}$.

Цель и постановка эксперимента. Всего имеется 9 характеристик системы, из них два – управляемые параметры (S_0 и Ω), один – контролируемый (W или $X = W/S_0$), T – независимая переменная; остальные 5 коэффициентов уравнения (13) являются функциями факторов эксперимента – S_0 , температуры, концентрации фермента, рН и т.д. Исчерпывающее описание системы включает формулировку целевой функции с последующим нахождением ее зависимости от всех факторов (интерполяционная задача) либо поиск совокупности значений факторов, при которых целевая функция достигает экстремума (задача оптимизации). В данном случае ставилась более узкая задача оценки влияния одного фактора (S_0) на ход реакции протеолиза в широком диапазоне конверсий субстрата с последующим поиском оптимального значения S_0 . Для этого определялись коэффициенты уравнения (13) из экспериментальных данных $V = V(t)$ при различных

начальных концентрациях субстрата, затем находились функциональные зависимости вида $A = A(S_0)$, $C = C(S_0)$, ..., $\alpha = \alpha(S_0)$ – так называемые интерполирующие функции. Этим достигалась цель иметь аналитическое или графическое представление кинетических данных $V = V(t)$ и $dV/dt = f(V/V_0)$ при любом S_0 , лежащем внутри исследованной области начальных концентраций субстрата, и количественно описать кинетику действия рН-статируемых реакторов трех типов.

Материал и методы

Снимали кинетические кривые гидролиза казеината натрия ("Merck", ФРГ) в присутствии нативного или иммобилизованного комплекса протеиназ – протосубтилина Г20Х (производитель – Bacillus Subtilis 103) на автоматическом титраторе ТТТ-60 ("Radiometer", Дания). Условия гидролиза: температура 40⁰С, начальное содержание ферментного препарата по белку – 0.07 мг/мл (в случае ИФ – соответственно 50⁰С и 0.02 мг/мл), рН 8.0 ($\chi = 0.9$ [10]), $V_0 = 20$ мл, $C_T = 12 \div 13$ мкмоль/мл (NaOH), начальные концентрации казеината – от 2 до 25 мг/мл, $\mu = 0.1$ М (KCl). Концентрацию пептидных связей в исходной реакционной смеси, C_S^0 , рассчитывали из данных об аминокислотном составе полного кислотного гидролизата белка. Гидролиз проводили 6 н. HCl по методике [21], аминокислотный состав определяли на автоматическом анализаторе D-500 ("Durrum", США) по стандартной трехбуферной программе. Найденный коэффициент пересчета массового содержания казеината натрия на молярное содержание пептидных связей составил 7.60 мкмоль/мг.

Иммобилизацию ферментного комплекса осуществляли путем ковалентного связывания белков с аминсилилированной поверхностью окиси алюминия глутаровым альдегидом [24]. Активность исходного ферментного препарата, измеренная по Ансону, составляла 20 Ед/мг белка, иммобилизованного – 4 Ед/г носителя при содержании белка 0.4 мг/г сухого катализатора.

Из интегральных кинетических кривых $V = V(t)$, полученных на титраторе, находили зависимости $dV/dt = f(V/V_0)$ пользуясь процедурой численного дифференцирования данных, описанной в [15]. Коэффициенты кинетического уравнения (13) оценивали путем подгонки линеаризованной модели

$$V_t' = \alpha V_0 + \alpha AV + \alpha C/V_0 \cdot V^2 - D/V_0 \cdot V_t'V - E/V_0^2 \cdot V_t'V^2 \quad (14)$$

и ее частных вариантов к экспериментальным значениям $V_t'(V)$. Для компенсации смещения оценок, возникающих при выравнивании модели (13), вводились весовые множители согласно рекомендациям работы [14]. Расчеты выполнялись по программе итерационного линейного МНК на ЭВМ PDP 8/m ("Digital", США). Адекватность описания экспериментальных данных моделью проверяли путем сравнения по F-критерию Фишера дисперсии воспроизводимости значений V_t' из двух параллельных опытов с дисперсией остаточных отклонений средних значений производной от предсказанных моделью. Константы интерполирующих функций оценивали с помощью стандартных процедур линейного МНК и нелинейного МНК по Гауссу-Зайделю. Для проверки гипотезы адекватности сравнивали объединенную дисперсию оценки параметра кинетической модели с дисперсией остаточных отклонений.

Результаты и обсуждение

Выбор адекватной модели и оценивание параметров. При исключении некоторых стадий из базисной схемы (1) могут быть получены многочисленные частные варианты уравнения (1), более простые, содержащие меньшее число параметров. Так в

случае, когда координационное число фермента не превышает единицы, в правой части (13) исчезают квадратичные члены, и получается модель, которая отвечает кинетике Михаэлиса – Ментен с ингибированием фермента продуктом [15].

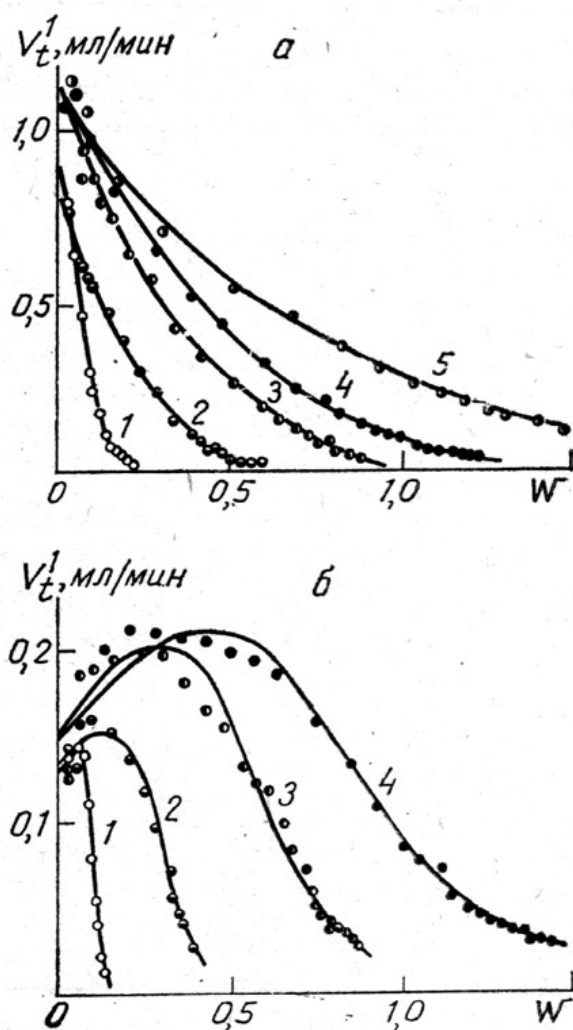


Рис. 1. Некоторые из дифференциальных кривых гидролиза казеината натрия нативным (а) и иммобилизованным (б) протосубтилином; экспериментальные точки и зависимости, предсказанные моделью (13) при различных значениях начальной концентрации белка.

По оси абсцисс – безразмерный объем титранта, V/V_0 , по оси ординат – скорость подачи титранта, мл/мин. Начальные концентрации белка для а.: 1 – 2.95, 2 – 7.7, 3 – 13.27, 4 – 17.14, 5 – 24.24; для б.: 1 – 2.41, 2 – 8.8, 3 – 15.77, 4 – 21.23 мг/мл.

При испытании частных вариантов формулы (13) было установлено, что для адекватного описания зависимостей $V_t^1 = f(V/V_0)$ для НФ (рис. 1, а) во всей области значений X и S_0 достаточно постулировать модель с параметром $C = 0$, т.е. из пяти параметров один исключить.

Кинетические кривые с ИФ более сложны (рис. 1, б), поэтому потребовалась полная пятипараметрическая формула (13). Область значений степени конверсии X , в которой достигнуто адекватное представление опытных данных, во многом определялась величиной S_0 : чем она меньше, тем протяженнее область адекватности. Так при $S_0 \leq 5.14$ удается описать дифференциальную кинетику при любых достигнутых значениях X , а при $S_0 = 12.45$ эта область ограничивается снизу значением $X \approx 0.02$. Рассчитанные оценки параметров кинетических кривых даны в табл. 2, соответствующие им "теоретические" кривые показаны на рис. 1.

Интерполяция зависимости параметров от начальной концентрации субстрата. Оценки параметров кинетических кривых есть случайные величины, зависящие от наблюдений V_t^1 , и поэтому также подвержены ошибкам. Процедура подбора интерполирующих функций для зависимостей макрокинетических псевдоконстант от

начальной концентрации субстрата преследовала тем самым двоякую цель: собственно интерполяцию и сглаживание данных табл. 2.

Если бы механизм реакции отвечал базисной схеме, в качестве интерполирующих функций следовало бы взять теоретические соотношения – формулы (9) в работе [15], которые устанавливают взаимосвязь макрокинетических псевдоконстант с элементарными константами отдельных стадий реакции и начальной концентрацией субстрата. Таким путем можно было бы в принципе оценить и сами элементарные константы. Но для протеолиза кинетическая базисная схема является приближенной (см. ниже), и теоретические соотношения не обязательно должны выполняться. Поэтому для интерполяции в основном выбирались эмпирические формулы, а из совокупности пригодных функций в конечном итоге использовались те, что обеспечивали минимальную дисперсию остаточных отклонений.

Таблица 2

Результаты оценивания параметров кинетического уравнения (13)

S_0	$\alpha \cdot 10^3, \text{ мин}^{-1}$	$-\alpha \cdot A \cdot 10^2, \text{ мин}^{-1}$	$\alpha \cdot C \cdot 10^2, \text{ мин}^{-1}$	D	E
<i>Нативный протосубтилин</i>					
1.20	24 ± 3	15.1 ± 2.2	—	-14 ± 5	280 ± 40
1.80	40 ± 5	17.1 ± 2.1	—	-5 ± 4	130 ± 20
2.39	31 ± 2	10.4 ± 0.5	—	-3.4 ± 0.9	52 ± 6
3.56	38 ± 4	8.3 ± 1.0	—	-2.2 ± 1.7	26 ± 7
4.70	36 ± 2	6.3 ± 0.3	—	0.4 ± 0.8	12 ± 3
5.85	55 ± 3	8.1 ± 0.4	—	2.1 ± 0.7	4 ± 2
8.08	54 ± 3	6.0 ± 0.5	—	2.0 ± 0.7	0.7 ± 1.5
10.22	53 ± 3	4.4 ± 0.4	—	1.3 ± 0.6	1 ± 1
10.46	54 ± 2	4.4 ± 0.2	—	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.6
14.80	48 ± 2	2.6 ± 0.1	—	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.3
<i>Иммобилизованный протосубтилин</i>					
1.41	6.6 ± 0.2	7.6 ± 1.4	19 ± 11	14 ± 1	82 ± 5
2.73	6.0 ± 1.0	3.5 ± 4.5	4.3 ± 2.1	10 ± 5	40 ± 20
5.14	5.8 ± 0.3	2.5 ± 1.3	2.5 ± 0.3	5 ± 2	12 ± 3
9.21	5.7 ± 0.3	1.1 ± 1.1	0.5 ± 0.2	3 ± 1	4 ± 1
12.45	5.4 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.2 ± 0.2	2.5 ± 0.6	3.1 ± 0.5

В табл.3 приведены результаты подбора интерполирующих функций и расчета их коэффициентов. Таблица компактно представляет всю информацию о кинетике гидролиза казеината в данных системах в изученной области значений S_0 . Некоторые из зависимостей для примера показаны на рис. 2.

Трактовка моделей. Как уже отмечалось, механизм биопроотеолиза остается недостаточно изученным для построения точной кинетической схемы реакции. Можно отметить, что она должна отражать разветвленную цепь последовательных актов расщепления белковой макромолекулы под воздействием нескольких ферментов, входящих в состав ферментного препарата, и учитывать возможность побочных реакций ингибирования исходным субстратом, конечными продуктами и метаболитами. Точная модель была бы слишком сложна для использования в рамках инженерного подхода.

Использованная базисная схема может претендовать лишь на соответствие довольно узкому набору элементарных актов расщепления близких по характеристикам пептидных связей либо для ее более общего обоснования потребуется известный постулат о том, что в биокаталитических многостадийных процессах скорость суммарной реакции в стационарном режиме определяется одной–двумя наиболее медленными стадиями [3].

Во всяком случае имеется возможность выполнить лишь ограниченную или "формальную" трактовку моделей.

Таблица 3

Интерполирующие функции и значения их коэффициентов

Смысл переменной J	Интерполирующая функция $J(S_0)$	Значения коэффициентов			Метод расчета
		a	b	c	
<i>Нативный протосубтилин</i>					
α	$J = aS_0 / (1 + bS_0 + cS_0^2)$	0.0183 ± 0.0041	0.11 ± 0.10	0.0137 ± 0.0035	н
$-1/A$	$J = aS_0$	0.1193 ± 0.0013	—	—	л
D	$J = a(S_0 - 1.2)^b e^{c(S_0 - 1.2)} - 14$	10.61 ± 0.42	0.366 ± 0.055	0.046 ± 0.011	н
$\lg E$	$J = a + bS_0 + cS_0^2$	2.92 ± 0.16	-0.498 ± 0.052	0.0193 ± 0.0035	л
<i>Иммобилизованный протосубтилин</i>					
$\alpha \cdot 10^3$	$J = aS_0^b + c$	1.66 ± 0.36	-0.71 ± 0.54	5.22 ± 0.50	н
A	$J = aS_0^b + c$	-17.5 ± 2.2	-0.87 ± 0.24	0.6 ± 1.5	н
C	$J = aS_0^b + c$	108 ± 23	-1.96 ± 0.25	0.49 ± 0.87	н
D	$J = aS_0^b + c$	-18.8 ± 2.9	-0.44 ± 0.27	5.4 ± 7.7	н
E	$J = aS_0^b + c$	147 ± 19	-1.04 ± 0.20	8.3 ± 6.7	н

Примечание. н – нелинейный МНК; л – линейный МНК.

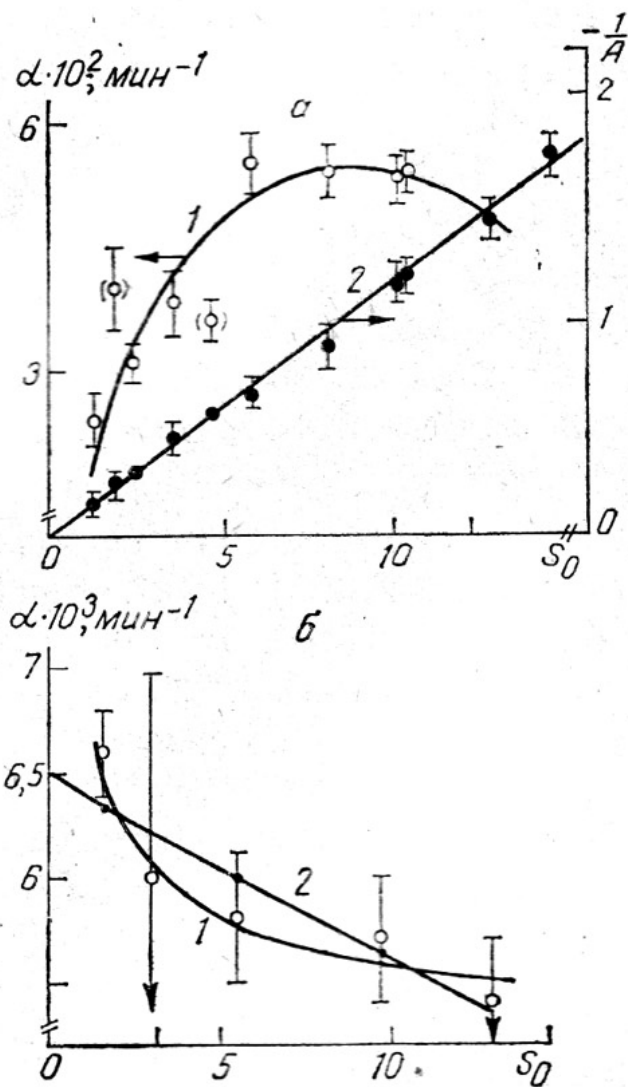
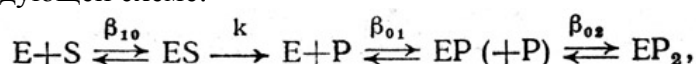


Рис. 2. Интерполяция зависимости оценок параметров модели (13) кинетики гидролиза казеината нативным (а) и иммобилизованным (б) протосубтилином от начальной концентрации субстрата.

По оси абсцисс – безразмерная концентрация пептидных связей C_s^0/C_T , по оси ординат: для а слева – оценка параметра α ; справа – обратная величина оценки параметра A , для б – оценка параметра α .

Для а: 1 – $\alpha(S_0)$; 2 – $A(S_0)$; внутри скобок – точки, не включенные в расчет, для б: 1 – функция $J = aS_0^b + c$; 2 – теоретическая модель (16).

Если говорить о феноменологическом описании кинетических кривых, то прежде всего следует отметить две общие закономерности, присущие интегральной кинетике биопроотеолиза. Это отсутствие линейного начального участка на кривых $X(t)$, который предсказывается моделью Михаэлиса–Ментен для прочных фермент-субстратных комплексов, и медленное приближение функции $X(t)$ к асимптотическому значению X_∞ при больших t . Действительно, как видно из рис. 1, на котором изображена зависимость $V'_t = f(V/V_0)$, скорость гидролиза уменьшается с самого начала реакции, т.е. как только в системе появляются продукты. В то же время удается наблюдать очень медленный гидролиз спустя несколько часов после почти стократного замедления реакции. Не удивительно, что подгонка модели Михаэлиса–Ментен к кинетическим данным биопроотеолиза всегда приводит к выводу о наличии сильного ингибирования фермента продуктом реакции [2]. В данной системе модель (13) с параметром $C = 0$ соответствует приблизительно следующей схеме:



т.е. гидролизу с двухступенчатым ингибированием фермента продуктом. Здесь, согласно [15], β_{10} , β_{01} и β_{02} – суммарные ступенчатые константы устойчивости комплексов ES, EP и EP₂, соответственно. Хотя ингибирование протеиназ пептидами в ряде случаев действительно показано прямыми методами (см. библиографию в [2]), нельзя забывать о том, что часто мы имеем дело с явлением кажущегося ингибирования, которое как раз свойственно реакциям расщепления высокомолекулярных субстратов ([8], с. 29).

В случае с ИФ интегральные кривые $V(t)$ имеют другую интересную особенность: они демонстрируют S-образную форму, тем более заметную, чем больше начальная концентрация белка. Соответственно зависимости $V'_t = f(V/V_0)$ имеют экстремум (рис. 2). Если начальное содержание белка превышает величину приблизительно 15 мг/мл, то гидролиз ИФ задерживается и на рН-статных кривых возникает горизонтальный начальный участок – лаг-фаза. В этой области наблюдается также некоторое подщелачивание раствора. Аналогичные явления отмечались, например, в работе [9].

Можно предложить несколько гипотез о механизме появления лаг-фазы в реакции протеолиза с ИФ, например:

- адсорбция компонентов (субстрата и продуктов) на носителе (наличие лаг-фазы в таком случае предсказывается теоретически);
- субстратное торможение реакции за счет повышения локальной концентрации белка при адсорбции;
- протекание обратной реакции синтеза типа пластеиновой [5] на начальных стадиях процесса.

Одно лишь субстратное торможение, хотя оно весьма вероятно, не объясняет защелачивания раствора в области лаг-фазы. Поэтому возможно, что в действительности имеют место все три указанных механизма.

Дополнительные сведения о "кажущемся" механизме протеолиза в рассматриваемой системе могут быть получены путем анализа интерполирующих функций (см. табл. 3). Две из них – $\alpha(S_0)$ и $A(S_0)$ для НФ – соответствуют теоретическим предпосылкам модели. Так, согласно [15], при $r = 0$ (комплекс ES₂ непродуктивен) теоретическая зависимость $\alpha(S_0)$ отвечает формуле:

$$\alpha = \frac{kC_E^0}{C_T} \cdot \frac{B_{10}S_0}{1 + B_{10}S_0 + B_{20}S_0^2}, \quad (15)$$

где C_E^0 – начальная концентрация фермента в реакторе, $B_{ij} = \beta_{ij}C_T^{(i+j)}$ – безразмерная константа устойчивости комплекса ES_iP_j. Видно, что (15) совпадает с интерполирующей

функцией $J = a S_0 / (1 + b S_0 + c S_0^2)$, в которой $a = k C_E^0 \beta_{10}$, $b = \beta_{10} C_T$ и $c = \beta_{20} C_T^2$. Используя оценки коэффициентов a , b и c , нетрудно рассчитать значения "кажущихся" элементарных констант:

- константа устойчивости фермент-субстратного комплекса ES –

$$\beta_{10} = 1 / K_S^{(каж)} = 8.5 \pm 7.1 \text{ М}^{-1};$$

- константа устойчивости комплекса ES₂ –

$$\beta_{20} = 88 \pm 21 \text{ М}^{-2};$$

- максимальная скорость реакции

$$k C_E^0 = V_{\max}^{(каж)} = (2.2 \pm 1.9) \cdot 10^{-3} \text{ М} \cdot \text{мин}^{-1};$$

Отсюда среднее значение бимолекулярной константы

$$V_{\max}^{(каж)} / K_S^{(каж)} = 0.018 \text{ мин}^{-1}.$$

Наибольшая начальная скорость реакции, соответствующая максимуму масштабного множителя времени α , достигается при $S_0 \approx 8.6$, т.е. при концентрации белка 14 мг/мл, и составляет 0.054 мин^{-1} . Отсюда легко найти активность НФ: $A_E = \alpha C_T / g_E = 9.6$ Ед на 1 мг белка, где $g_E = 0.07$ мг/мл – начальная концентрация фермента в реакторе.

Интересно, что в случае ИФ также допустимо использовать "теоретическое" соотношение для аппроксимации зависимости $\alpha(S_0)$. Если в (15) положить, что $B_{10} S_0 + B_{20} S_0^2 \gg 1$, т.е. допустить, что реакция подвержена очень сильному субстратному торможению, то зависимость $\alpha(S_0)$ предсказывается моделью

$$J = a / (1 + b S_0), \quad (16)$$

где $J = \alpha$, $a = k C_E^0 / C_T$, $b = B_{20} / B_{10}$. Подгонка модели к данным $\alpha(S_0)$ дает следующие оценки коэффициентов: $a = (6.50 \pm 0.20) \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, $b = 0.0170 \pm 0.0052$, но качество аппроксимации получается несколько хуже, чем в случае эмпирической функции (рис. 2, б). Отсюда $V_{\max}^{(каж)} = a \cdot C_T = (8.46 \pm 0.26) \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{мин}^{-1}$. Максимальное значение α предсказывается при $S_0 = 0$ и равна a , следовательно, активность иммобилизованного протосубтилина ($g_E = 0.02$ мг/мл) $A_E = 4.2$ Ед на 1 мг белка, т.е. составляет около 40% от активности НФ при 40°C.

Наконец, дополнительная информация о глубине гидролиза белка получается из анализа зависимости $A(S_0)$ для НФ. Можно показать, что модель (13) с параметром $C = 0$ при допущении $V \ll V_0$ приводит к следующему выражению для макрокинетической псевдоконстанты: $A = -1/S_0$. Так как использовано преобразование $J = -1/A$, то J есть фактическая концентрация субстрата (реакционноспособных пептидных связей) в реакторе при $t = 0$. Отсюда в формуле $J = a \cdot S_0$ коэффициент равен доле расщепляемых протосубтилином пептидных связей в молекуле казеината, или предельной степени конверсии (X_∞) субстрата. Согласно табл. 3, $a = 0.119 \pm 0.002$, т.е. независимо от S_0 , $X_\infty \approx 12\%$. Для ИФ величина X_∞ , оцениваемая как W_∞ / S_0 , в целом несколько меньше ($X_\infty \approx 9\%$) и тоже не зависит от начальной концентрации белка.

Выводы

1. Получены в обобщенном виде уравнения действия рН-статируемых биореакторов, работающих в кинетическом режиме.

2. На основании экспериментальных данных о кинетике гидролиза казеината натрия препаратами протосубтилина в периодическом реакторе оценены параметры приближенных кинетических моделей и найдены аналитические зависимости псевдоконстант от начальной концентрации субстрата.
3. Рассмотрение протеолиза как формально-двухстадийной реакции приводит к выводу о наличии в изученной системе действительных или "кажущихся" процессов ингибирования фермента продуктами реакции и субстратом, причем последнее сильнее проявляется в случае иммобилизованного препарата. Оценены значения некоторых кинетических и равновесных элементарных констант, активности ферментных препаратов и достигаемой предельной глубины гидролиза субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К. Химия протеолиза. — М., 1983.
2. Беликов В. М., Антонова Т. В., Квасов Б. А. // Биоорган. Химия. — 1979. — Т. 5. — С. 449–457.
3. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. — М., 1979.
4. Воробьев М. М., Слободяникова Л. С., Пасконова Е. А. и др. // Всесоюзное совещание по аминокислотам, 3-е: Тезисы докладов. — Ереван, 1984. — С. 101–102.
5. Голобов М. Ю. Транспептидация и образование пластеинов: Автореф. дис. канд. хим. наук. — М., 1984.
6. Кёстнер А. И. // Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Пущино, 1978. — С. 64–80.
7. Кёстнер А. И. // Труды Таллин. политехн. ин-та. — 1980. — № 499. — С. 3–13.
8. Клёсов А. А. Ферментативный катализ. Ч. 2. Ферментативная деструкция полимеров (полимерные субстраты). — М., 1984.
9. Лянгузов А. Ю., Брицына Н. С., Самарцев М. А. // Инженерная энзимология. — М., 1983. — Ч. 2. — С. 104.
10. Неклюдов А. Д., Навашин С. М. // Прикл. биохим. — 1985. — Т. 21. — С. 3–17.
11. Неклюдов А. Д., Навашин С. М., Бартошевич Ю. Э., Цибанов В. В. // Антибиотики. — 1985. — № 4. — С. 243–249.
12. Ныс П. С., Эрдман И. Э., Бирюков В. В. // Хим. фарм. журн., 1984. — № 1. — С. 76–80.
13. Сиймер Э. Х. // Труды Таллин. политехн. ин-та. — 1981. — № 510. — С. 15–23.
14. Цибанов В. В., Заборенко К. Б., Богатырев И. О. // Заводская лаборатория. — 1974. — Т. 40. — С. 72–76.
15. Цибанов В. В., Логинова Т. А., Неклюдов А. Д. // Журн. физ. химии. — 1982. — Т. 56. — С. 1183–1188.
16. Adler-Nissen J. // J. chem. Technol. Biotechnol. — 1982. — Vol. 32. — P. 138–156.
17. Adu-Amankwa B., Constantinides A. // Biotechnol. and Bioeng. — 1984. — Vol. 26. — P. 156–166.
18. Constantinides A., Adu-Amankwa B. // Ibid. — 1980. — Vol. 22. — P. 1543–1565.
19. Deesle W. D., Cheryan M. // Ibid. — 1981. — Vol. 23. — P. 2257–2271.
20. Ho L., Humphry A. E. // Ibid. — 1970. — Vol. 12. — P. 291–311.
21. Lucas B., Sotelo A. // Analyt. Biochem. — 1970. — Vol. 12. — P. 291–311.
22. Siimer E. // Biotechnol. and Bioeng. — 1978. — Vol. 20. — P. 1853–1864.
23. Suga K., Chen K. C., Taguchi H. // J. Ferment. Technol. — 1981. — Vol. 59. — P. 137–147.
24. Tochikazu N., Rikimaru H. // Arch. Biochem. — 1984. — Vol. 229. — P. 304–311.