

УДК 543.866 : 541.11

## КИНЕТИКО-ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КАТАЛИЗА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

*И. В. Березин, А. М. Клибанов и К. Мартинек*

Обзор посвящен количественному анализу физико-химических закономерностей катализа иммобилизованными ферментами. Рассматривается роль таких факторов, как внешнEDIффузионное и внутрEDIффузионное торможение, а также особенности диффузии в полимерных носителях, природа носителя, изменение истинных кинетических параметров ферментативных реакций при иммобилизации, стерические ограничения при реакциях иммобилизованных ферментов с макромолекулярными субстратами.

Библиография — 152 наименования.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	17
II. Роль диффузии в катализе иммобилизованными ферментами . . . . .	18
III. Влияние природы носителя на кинетику катализа иммобилизованными ферментами . . . . .	39
IV. Изменение истинных кинетических параметров ферментативных реакций при иммобилизации . . . . .	42
V. Стерические ограничения при реакциях иммобилизованных ферментов с макромолекулярными субстратами . . . . .	43

### I. ВВЕДЕНИЕ

В последние годы количество работ по иммобилизованным (фиксированным) ферментам возрастает экспоненциально с периодом удвоения примерно в два года. По данным Американского химического общества<sup>1</sup> в 1972 г. исследования в области иммобилизованных ферментов вошли в число девяти самых ярких тем по химии.

Интерес к иммобилизованным ферментам объясняется двумя основными причинами. Во-первых, — широкие перспективы, которые открывает применение иммобилизованных ферментов в технологии и медицине. В связи с этим укажем, что уникальные свойства биологических катализаторов уже давно привлекают внимание ученых из разных областей науки и техники. К этим свойствам ферментов следует отнести, прежде всего, их высокую каталитическую эффективность (то есть способность достигать скоростей реакций, значительно, иногда в  $10^{10}$ — $10^{13}$  раз, превосходящих показатели небиологических катализаторов); далее, их непревзойденную избирательность (не только по типу катализируемой реакции, но и по отношению к структуре субстрата) и, наконец, высокую способность ферментов отзываться на регуляторное воздействие тонких изменений в свойствах и специфическом составе среды. Однако попытки использовать биологические катализаторы в качестве каталитических или регуляторных элементов в прикладной химии или физике наталкивались, как правило, на казалось бы непреодолимое препятствие в виде их исключительно низкой стабильности по отношению к денатурирующему влиянию «среды» (в первую очередь следует указать на термическое действие и воздействие микроорганизмов как на главные денатурирующие факторы в белковых системах *in vitro*). С другой стороны, уже

первые работы в области иммобилизованных ферментов наметили ряд путей к увеличению их стабильности<sup>2</sup>:

1. Ковалентное присоединение фермента к водонерастворимому (или водорастворимому) полимерному носителю (такому, как целлюлоза, стекло, полистирол, полиаминокислоты и т. д.).

2. Ковалентное присоединение молекул фермента друг к другу с помощью добавленного полифункционального реагента с образованием водонерастворимых (или водорастворимых) агрегатов.

3. Заключение фермента в трехмерную сетку геля или полимера.

4. Адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (например, на ионитах).

5. Заключение фермента в полупроницаемые микрокапсулы или полимерные волокна.

Очевидно, в результате подобного рода иммобилизации фермент приобретает еще одно важное для технологии свойство — его легко отделить от продуктов катализируемой реакции, что позволяет использовать его в проточном режиме или же повторно<sup>3</sup>.

В медицинской практике иммобилизация наряду с увеличением стабильности облегчает фиксацию ферментов (или других биологически активных веществ) в определенных участках организма<sup>4</sup>.

Иммобилизованные ферменты можно рассматривать как весьма реальные модели биологически активных систем, действующих *in vivo* внутри мембран или на их поверхности<sup>2, 5</sup>.

К настоящему времени существует ряд обзоров по иммобилизованным ферментам<sup>2, 3, 6-23</sup>. Опубликована сводка этих обзоров на русском языке<sup>24</sup>; поэтому мы не будем останавливаться на методических аспектах получения иммобилизованных препаратов (см., например,<sup>10, 16</sup>) или же на прикладных аспектах их использования в науке, технике и медицине<sup>3, 25</sup>. Основное внимание в обзоре уделено кинетико-термодинамическим закономерностям, отличающим катализ иммобилизованными ферментами от поведения гомогенных (нативных) систем. К этим новым специфическим чертам можно отнести: а) появление внешних и внутренних диффузионных затруднений при катализе; б) моменты, связанные с распределением субстратов, ингибиторов, ионов водорода и других факторов между водным раствором и полимерной матрицей (за счет электростатических или гидрофобных взаимодействий, водородных связей и пр.); в) возникновение стерических препятствий при реакциях с макромолекулярными субстратами. При рассмотрении этих аспектов мы будем стремиться к количественным обобщениям, которые позволили бы во многих случаях *a priori* предсказать кинетико-термодинамические свойства иммобилизованных ферментативных систем.

## II. РОЛЬ ДИФфуЗИИ В КАТАЛИЗЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

В сущности, к иммобилизованным ферментам приложимы основные положения, которые сформировались в теории гетерогенного катализа. Влияние диффузии на гетерогенно-каталитические процессы изучено весьма детально для реакций различного кинетического порядка<sup>26-30</sup>. Здесь будет рассмотрено влияние диффузионных факторов на ферментативную реакцию, скорость ( $v$ ) которой подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot C}{K_m + C} \quad (1)$$

где  $V_{\text{макс.}} = k_{\text{кат.}} \cdot [E]$ ,  $[E]$  и  $C$  — начальные концентрации фермента и субстрата, соответственно,  $k_{\text{кат.}}$  — каталитическая константа скорости пер-

вого порядка и  $K_m$  — константа Михаэлиса. При этом будем иметь в виду, что реагирующий фермент находится в иммобилизованном состоянии, будучи, например, ковалентно присоединенным к водонерастворимому пористому носителю, либо заключенным в матрицу геля или внутрь микрокапсулы. Для того, чтобы могла произойти ферментативная реакция, очевидно, молекула субстрата, во-первых, должна из раствора подойти к поверхности частицы, содержащей иммобилизованные ферменты, и, во-вторых, продиффундировать внутрь нее. Если же реакция в поверхностных слоях частицы протекает быстрее, чем идет подача субстрата из раствора к поверхности, то через некоторое время вокруг частицы образуется зона, обедненная субстратом. В результате валовая скорость ферментативного процесса будет определяться скоростью массопереноса субстрата к частице. По аналогии с гетерогенным катализом<sup>28</sup> скажем, что в этом случае процесс контролируется внешней диффузией. Представим себе, с другой стороны, что массоперенос субстрата происходит быстрее, чем идет ферментативная реакция на поверхности частицы. В этом случае может возникнуть другой тип диффузионных затруднений. А именно, если размер частицы носителя слишком велик или если фермент очень активен, то почти весь субстрат прореагирует уже в приповерхностных областях носителя, а глубинные его области будут обеднены субстратом. В таком случае принято говорить, что процесс контролируется внутренней диффузией<sup>26</sup>. Ниже дан анализ в рамках уравнения Михаэлиса (1) влияния обоих диффузионных факторов на эффективные кинетические показатели ферментативной реакции.

### 1. Внешнедиффузионное торможение

Массоперенос совершается за счет двух различных процессов — конвекции и молекулярной диффузии. В жидкостях обычно перенос вещества в результате конвекции значительно превышает скорость молекулярной диффузии<sup>30</sup>, поэтому последний процесс можно практически не учитывать. Однако при рассмотрении гетерогенных систем (например, взвешенных твердых частиц) следует принять во внимание, что непосредственно к поверхности раздела «фаз» примыкает перемешиваемый слой жидкости, в пределах которого перенос молекул или ионов происходит исключительно за счет молекулярной диффузии. Следовательно, если на поверхности частицы протекает ферментативная реакция, в которой расходуется субстрат, то внутри перемешиваемого слоя может возникнуть резкий перепад концентрации реагента, поскольку молекулярная диффузия в жидкостях протекает очень медленно (с коэффициентом диффузии  $10^{-5}$ — $10^{-6}$   $\text{см}^2/\text{сек}$ )<sup>30</sup>. В результате этого массоперенос может стать лимитирующей стадией гетерогенно-каталитического процесса независимо от скорости перемешивания.

Рассмотрим некоторые количественные закономерности для сферической частицы, полагая, что фермент иммобилизован либо на поверхности сферы, либо, если носитель пористый, также и внутри его, но в отсутствие внутридиффузионных затруднений. При этом примем, что коэффициент распределения субстрата между раствором и «фазой» носителя не отличается практически от единицы. Поверхность частицы будем считать равнодоступной<sup>26</sup>. В таком случае диффузионная скорость подачи субстрата  $j$ , отнесенная к единице поверхности частицы, равна\*

\* Это утверждение является приближенным. Как показано в работе<sup>30</sup>, диффузионный поток к поглощающей сфере в движущейся жидкости не распределен равномерно по ее поверхности. Он максимален в точке набегания жидкости и убывает на задней стороне сферы.

$$j = \beta (C_0 - C) \quad (2)$$

где  $C_0$  и  $C$  — концентрации субстрата в объеме раствора и на поверхности частицы, соответственно,  $\beta$  — коэффициент массоотдачи.

а. В частном случае, когда ферментативная реакция, которая протекает на поверхности частицы, подчиняется кинетике первого порядка, имеем в уравнении (1)  $K_m \gg C$ . В этих условиях стационарное состояние ферментативного процесса дается следующим уравнением:

$$\beta (C_0 - C) = (V_{\text{макс.}}/K_m) \cdot C \quad (3)$$

которое отражает тот факт, что удельная скорость подвода субстрата к поверхности частицы с иммобилизованным ферментом ( $j$ ) равна скорости ферментативной реакции ( $v$ ), отнесенной к единице поверхности. Из (3) для эффективной концентрации субстрата в зоне реакции имеем

$$C = \frac{\beta \cdot C_0}{\beta + V_{\text{макс.}}/K_m} \quad (4)$$

В результате приходим к выводу, что стационарная скорость ферментативной реакции, наблюдаемая на опыте:

$$v = (V_{\text{макс.}}/K_m) \cdot C = k_{\text{эфф.}} \cdot C_0 \quad (5)$$

характеризуется эффективной константой скорости первого порядка, равной

$$k_{\text{эфф.}} = \frac{(V_{\text{макс.}}/K_m) \cdot \beta}{\beta + V_{\text{макс.}}/K_m} = \frac{1}{\frac{1}{\beta} + \frac{1}{V_{\text{макс.}}/K_m}} \quad (6)$$

Возможны два крайних случая. При условии, что  $\beta \gg V_{\text{макс.}}/K_m$ , т. е. массоперенос осуществляется намного быстрее, чем идет химическая реакция, имеем  $k_{\text{эфф.}} = V_{\text{макс.}}/K_m$ . Если же, наоборот,  $\beta \ll V_{\text{макс.}}/K_m$ , т. е. химическая реакция протекает намного быстрее, чем идет массоперенос, то  $k_{\text{эфф.}} = \beta$ . В первом случае будем говорить, что реакция протекает в кинетической области, а во втором случае — в диффузионной области<sup>31</sup>.

б. В общем случае, когда ферментативный процесс идет не по первому, а по дробному порядку (то есть,  $K_m \sim C$ ), то, несмотря на более громоздкие выражения для скорости реакции, существование двух областей протекания процесса — диффузионной и кинетической — по-прежнему остается в силе<sup>26</sup>.

в. Исключение составляет второй крайний случай уравнения Михаэлиса (1), когда  $K_m \ll C$ , то есть, фермент насыщен субстратом. Поскольку кинетика ферментативной реакции характеризуется в данном случае нулевым порядком по субстрату, то, очевидно, процесс в принципе не может контролироваться диффузией и он протекает в кинетической области.

### *Теоретическая оценка границ диффузионной и кинетической областей*

В кинетической области реакция протекает, очевидно, в полном соответствии с теми законами, которые заданы ее механизмом. По-другому обстоит дело в диффузионной области, где кинетика реакции не может дать информации о химическом механизме, поскольку ее определяют лишь параметры массопередачи. Для выбора между этими областями необходимо оценить значение  $\beta$  и сравнить его, например, в случае (а) (см. выше) с величиной  $V_{\text{макс.}}/K_m$ . Для этой цели вслед за О'Нейллом<sup>32</sup> покажем, как это можно сделать, введя некоторые допущения. Из теории подобия<sup>26</sup> следует, что

$$\beta = \frac{Nu \cdot D}{d} \quad (7)$$

где  $Nu$  — критерий Нуссельта,  $D$  — коэффициент диффузии переносимого вещества,  $d$  — диаметр поглощающей частицы. В случае ламинарного потока жидкости, обтекающей сферическую частицу, при малых числах Рейнольдса имеем<sup>26, 28</sup>  $Nu=2$ . В качестве приближения примем, что это условие выполняется в нашей системе\*. Тогда из (7) имеем

$$\beta = \frac{2D}{d} \quad (8)$$

Это значение является нижним пределом. На самом деле, вследствие перемешивания системы,  $\beta$  может принять несколько более высокое значение<sup>26</sup>. Однако при работе с ферментами перемешивание обычно бывает не слишком интенсивным и поэтому такой эффект не очень значителен.

Зная  $D$  и  $d$ , из уравнения (8) можно вычислить значение  $\beta$ . Сравнив его (случай а) с величиной  $V_{\text{макс.}}/K_m$ , в принципе, можно сделать вывод о режиме протекания ферментативной реакции (см. уравнение (6)). Однако величину  $V_{\text{макс.}}/K_m$  приходится определять из экспериментальных данных, которые уже могут быть искажены влиянием диффузии и поэтому укажем на другой, более удобный подход. Вычислив  $\beta$ , можно рассчитать максимальную скорость массопереноса и сравнить ее с экспериментально найденным значением скорости реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом. Если эти две величины близки друг к другу, то это значит, что реакция протекает в диффузионной области. Если же наблюдаемая скорость ферментативной реакции намного меньше максимально возможной скорости массопереноса, то реакция, очевидно, протекает в кинетической области. Применение такого подхода правомочно в случае любого кинетического порядка ферментативной реакции; рассмотрим его подробнее.

Скорость массопереноса  $R$  к данной частице катализатора, равная диффузионному потоку, помноженному на поверхность частицы  $A$ , определяется в соответствии с уравнениями (2) и (8) следующим выражением:

$$R = j \cdot A = \frac{2D}{d} \cdot A \cdot (C_0 - C) \quad (9)$$

Поскольку для сферы  $A = \pi d^2$ , то

$$R = 2\pi D d (C_0 - C) \quad (10)$$

Входящий в уравнение (10) коэффициент диффузии субстрата в жидкости  $D$ , можно определить экспериментально в отдельном опыте или оценить из различных эмпирических корреляций, если концентрация субстрата не превышает 10 мол. %<sup>37</sup>. Если же форма частицы, содержащей иммобилизованный фермент, отличается от сферической, то значение  $d$  принимают обычно равным диаметру такой сферы, поверхность которой равна поверхности используемой частицы.

Максимально возможное значение скорости массопереноса  $R_{\text{макс.}}$  следует из (10) при  $C_0 \gg C$

$$R_{\text{макс.}} = 2\pi D d C_0 \quad (11)$$

\* В литературе часто используют эмпирические формулы для определения  $\beta$  в различных гетерогенных системах при разных условиях<sup>33–35</sup>. Принятое нами приближение должно выполняться при не очень больших скоростях потоков и имеет то преимущество, что позволяет легко оценить  $\beta$  численно. В некоторых работах по иммобилизованным ферментам  $\beta$  определяют, исходя из иных, чем здесь уравнений<sup>35, 36</sup>.

где  $R_{\text{макс.}}$  дается обычно в *молях/сек. частицу*. Согласно рекомендации международной комиссии по иммобилизованным ферментам, скорость реакции следует выражать в *мкмольх субстрата /мин. мг сухого препарата иммобилизованного фермента*<sup>38</sup>. В таком случае уравнение (11) нужно преобразовать к следующему виду:

$$R_{\text{макс.}}^{\text{общ.}} = 7,2 \cdot 10^3 \cdot \frac{D \cdot C_0}{\rho \cdot d^2} \quad (12)$$

где  $\rho$  — плотность препарата иммобилизованного фермента дана в *г/см<sup>3</sup>*;  $D$  выражено в *см<sup>2</sup>/сек*;  $C_0$  в *моль/л* и  $d$  в *см*.

### Некоторые экспериментальные критерии

а. Как уже отмечалось выше (стр. 20), при достаточно высоких концентрациях субстрата (то есть, при насыщении иммобилизованного фермента, когда наблюдаемая скорость реакции обнаруживает нулевой порядок по субстрату) ферментативный процесс в принципе не может контролироваться диффузией субстрата и, следовательно, реакция протекает в кинетической области. В свою очередь, вероятность перехода реакционной системы в диффузионную область повышается при уменьшении концентрации субстрата. Такое поведение каталитической системы иллюстрирует рис. 1, где в координатах Лайнуивера — Берка пред-

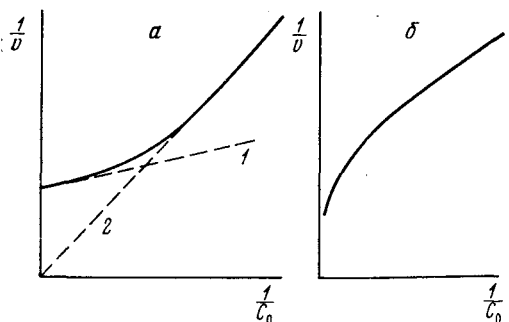


Рис. 1. *а* — Теоретическая зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера — Берка, искаженная внешн-диффузионным торможением; *б* — экспериментальная кривая в тех же координатах, полученная в работах<sup>39, 40</sup>, соответствующая, по-видимому, наличию двух кинетически различающихся форм иммобилизованного фермента

ставлена теоретическая кривая для реакции, протекающей при высоких концентрациях субстрата (пунктирная прямая 1) в кинетической области (где, следовательно, результаты эксперимента можно описать с помощью уравнения (1)), а при низких концентрациях субстрата (пунктирная кривая 2) — в диффузионной области, где зависимость измеряемой на опыте скорости процесса  $v$  от  $C_0$  подчиняется фактически уравнению (12). Если же при работе с иммобилизованным ферментом в координатах  $1/v \div 1/C_0$  получена именно такая картина (то есть, имеется криволинейное отклонение от обычной прямолинейной зависимости Лайнуивера — Берка), то это первое указание на то, что диффузия играет в процессе существенную роль. При этом, однако, следует обращать внимание на характер криволинейности. Так, в работах<sup>39, 40</sup> при исследовании каталитических свойств  $\alpha$ -химотрипсина и глюкоамилазы, иммобилизованных на производных целлюлозы, была получена в координатах Лайнуивера — Берка кривая другого вида, изображенная на рис. 1, б. Наблюдаемое искривление зависимости  $1/v \div 1/C_0$  авторы также объясняют с точки зрения диффузионного торможения. Однако в данном случае такая трактовка результатов неверна, поскольку из теории вытекает, что диффузионное торможение должно проявляться

особенно сильно при низких концентрациях субстрата (рис. 1, а). Из опыта (рис. 1, б) следует как раз обратная зависимость, а именно, при низких концентрациях субстрата процесс ускоряется. Более того, с точки зрения теории, процесс, контролируемый диффузией, при низких концентрациях субстрата должен подчиняться кинетическому закону первого порядка по субстрату (уравнение (12)), а это также не выполняется на опыте, поскольку (см. рис. 1, б) экстраполяция прямолинейного участка на кривой  $1/v \div 1/C_0$ , соответствующего низким значениям  $C_0$ , не проходит через начало координат. Поэтому нам представляется более вероятным, что искривление зависимости  $1/v \div 1/C_0$ , наблюдаемое на опыте<sup>39, 40</sup> (типа кривой на рис. 1, б), обусловлено, по-видимому, наличием нескольких кинетически различающихся форм иммобилизованного фермента.

б. Ферментативные реакции обычно характеризуются энергиями активации порядка 10—30 ккал/моль. В то же время скорость ферментативного процесса, протекающего в диффузионной области, должна слабо зависеть от температуры, поскольку единственный чувствительный к температуре параметр  $D$  в уравнении (12) имеет в воде энергию активации  $\sim 4\text{--}5$  ккал/моль<sup>41</sup>. Следовательно, характер температурной зависимости реакции вполне может служить критерием для определения границ кинетической и диффузионной областей. В связи с этим, следует иметь в виду, однако, что с повышением температуры реакция может переходить из кинетической в диффузионную область (как это следует, например, из анализа уравнения (6), если принять во внимание указанные различия в температурной зависимости величин  $\beta$ , уравнение (8) и  $V_{\text{макс.}}/K_m$ ).

в. В диффузионной области скорость реакции не должна очевидно, зависеть от изменения удельной концентрации иммобилизованного фермента (как это следует, например, из уравнений (5) и (6)), полагая, что в диффузионной области  $V_{\text{макс.}}/K_m \gg \beta$ . Более того, если реакция протекает в диффузионной области, то на ее скорость не должны оказывать влияния такие специфические факторы, как изменение рН, ионной силы, добавление ингибиторов или активаторов; в общем, те факторы, которые связаны с ферментативным механизмом и влияние которых, в принципе, может быть прослежено для нативного катализатора. В связи с этим, однако, следует учесть, что для одного и того же препарата иммобилизованного фермента реакция с одним субстратом (высокореакционноспособным) может протекать в диффузионной области, а с другим субстратом (с низкой реакционной способностью) — в кинетической области. Все эти положения, рассмотренные в настоящем параграфе, вытекают, например, из анализа уравнений (5) и (6), если учесть, что границы диффузионной и кинетической областей определяет соотношение параметров  $\beta$  и  $V_{\text{макс.}}/K_m$ .

г. Скорость реакции в кинетической области не должна зависеть от степени измельчения частиц, содержащих иммобилизованный фермент (если только отсутствуют внутридиффузионные затруднения для субстрата). С другой стороны, однако, если реакция протекает в диффузионной области, ее скорость по мере измельчения ферментативного препарата будет возрастать, поскольку уменьшение диаметра частиц  $d$  приводит к увеличению диффузионного показателя  $\beta$ , см. уравнение (8).

д. Влияние диффузионных факторов можно ослабить, если ускорить массоперенос субстрата за счет перемешивания. Это связано с тем, как мы уже отмечали, касаясь уравнения (7), что показатель  $\beta$  в принципе зависит от скорости потока<sup>30</sup>. К весьма простому соотношению между скоростью реакции и скоростью перемешивания можно прийти, если

встать на позиции представления о неперемешиваемом слое, как физической реальности, к которой приложим первый закон Фика (см., однако, возражения против такого подхода в <sup>30</sup>, стр. 51 и <sup>27</sup>, стр. 113). При условии, что концентрация субстрата в диффузионном слое убывает линейно, для удельной скорости массопереноса  $j$  имеем  $(C_0 - C) \cdot D/\delta$ , где  $\delta$  — эффективная толщина неподвижного слоя. Если сравнить последнее выражение с уравнением (2), то видно, что показатель  $\beta$ , который определяет характер (диффузионный или кинетический) уравнения (6), можно записать как  $\beta = D/\delta$ . В свою очередь, из гидродинамики следует, что толщина диффузионного слоя уменьшается при увеличении скорости потока жидкости  $u$  вокруг частицы <sup>30</sup>:

$$\delta \sim u^{-n} \quad (13)$$

где  $n$  изменяется от  $1/3$  до 1 в зависимости от условий (например, для сферических частиц или для потока внутри цилиндра  $n = 1/3$ ). Сказанное справедливо не только для отдельной частицы, но и для слоев частиц. Таким образом, увеличение скорости оборотов мешалки в реакторе или же повышение скорости протока субстрата через колонку должно ослабить диффузионный контроль. В свою очередь, зависимость наблюдаемой скорости ферментативной реакции от скорости перемешивания или же от скорости протока, указывает на существенную роль диффузии в исследуемом процессе. Следует полагать, что существенное повышение числа оборотов мешалки может реакцию вывести из диффузионной области в кинетическую. Однако сам по себе тот факт, что при малых числах оборотов мешалки наблюдаемая скорость реакции зависит от перемешивания, а при больших — такая зависимость отсутствует, не может еще служить доказательством перехода из диффузионной области в кинетическую, поскольку, как было показано при исследовании гетерогенных реакций <sup>42</sup>, при больших оборотах мешалки наблюдается так называемый эффект скольжения, т. е. мешалка перестает увлекать за собой жидкость и, следовательно, истинная скорость потоков в системе не изменяется при дальнейшем увеличении числа оборотов.

#### *Применение теоретических положений для анализа экспериментальных данных*

Предсказанные эффекты подтверждены опытом. В работе <sup>39</sup> показано, что при увеличении числа оборотов мешалки в суспензии ковалентно присоединенного к КМ-целлюлозе  $\alpha$ -химотрипсина возрастает скорость ферментативного гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина. В свою очередь, каталитическая активность колонок с иммобилизованным ферментом повышается при увеличении скорости протока через них растворов субстратов <sup>35, 36, 40, 43</sup>. На рис. 2 представлена подобная зависимость для реакции иммобилизованного на пористом стекле трипсина с *p*-нитроаналидом N-бензоил-D,L-аргинина <sup>35</sup>. Эксперимент <sup>40</sup> подтверждает также вывод о большей вероятности перехода реакции в диффузионную область при низких концентрациях субстрата: так, при низких концентрациях крахмала (5%) скорость его реакции с иммобилизованной глюкоамилазой сильно зависит от скорости протока через колонку, а при высоких концентрациях (30%) — практически не зависит. В работе <sup>44</sup> показано, что реакция трипсина, ковалентно присоединенного к внутренней поверхности найлоновой трубки, с этиловым эфиром N-бензоил-L-аргинина полностью контролируется диффузией (даже при  $C_0 > 1000K_m$ ), причем скорость реакции пропорциональна кубическому корню из скорости протока раствора субстрата через трубку, как



это следует из теории (уравнение (13)). Пробулькивание через поток субстрата пузырьков газа, что улучшает перемешивание внутри трубки, значительно увеличивает наблюдаемую скорость ферментативной реакции.

Уравнение (12) может быть использовано не только для качественных, но и для количественных оценок роли внешней диффузии в катализе иммобилизованными ферментами<sup>32</sup>. Так, в работах<sup>39, 45</sup> исследовано

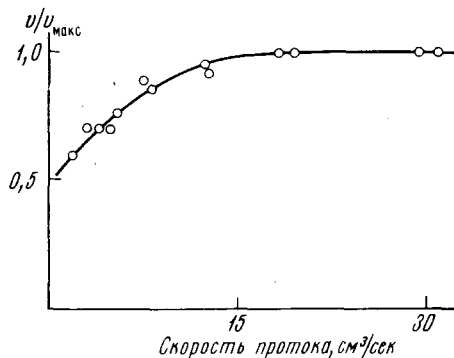


Рис. 2. Зависимость эффективной каталитической активности колонки, заполненной иммобилизованным трипсином, от скорости протока раствора субстрата (*p*-нитроанилид *N*-бензоил-*D,L*-аргинина);<sup>35</sup>  $v$  — наблюдаемая скорость реакции при данной скорости протока  $Q$ ;  $v_{\text{макс}}$  — максимальная скорость реакции при достаточно больших значениях  $Q$

взаимодействие  $\alpha$ -химотрипсина, иммобилизованного на КМ-целлюлозе и ДЭАЭ-целлюлозе, с этиловым эфиром *N*-ацетил-*L*-тирозина. В табл. 1 приведены кинетические параметры этих реакций. В обоих случаях размер частиц, содержащих иммобилизованный фермент, составляет, примерно 40 микрон и их плотность можно считать равной 1 г/см<sup>3</sup>. Коэффициент диффузии субстрата, оцененный с помощью эмпирических корреляций<sup>46</sup>, примем равным  $5 \cdot 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/сек. Тогда из уравнения (12) для  $R_{\text{макс}}^{\text{общ.}}$  следует величина  $2,25 \cdot 10^2 C_0$ . Следовательно, в случае  $\alpha$ -химотрипсина, иммобилизованного на ДЭАЭ-целлюлозе, максимальная скорость массопереноса  $R_{\text{макс}}^{\text{общ.}}$  становится меньше рассчитанной скорости реакции при  $C_0 < 5 \cdot 10^{-2}$  М (как это следует из данных в табл. 1) и поэтому

ТАБЛИЦА 1

Кинетические параметры реакции гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина, катализируемого иммобилизованным  $\alpha$ -химотрипсином

Носитель	$V_{\text{макс.}}$ мкмоль	$K_m$ , мМ
	мин·мг препарата	
ДЭАЭ-целлюлоза <sup>45</sup>	12	5
КМ-целлюлоза <sup>39</sup>	0,5	1

снимает диффузионные затруднения<sup>45</sup>. В случае  $\alpha$ -химотрипсина, иммобилизованного на КМ-целлюлозе, теоретически рассчитанная величина  $R_{\text{макс.}}^{\text{общ.}}$  (уравнение (12)) становится равной расчетной величине  $v$  (табл. 1) при  $C_0 \approx 10^{-3}$  М. Как было показано экспериментально<sup>39</sup>, при таких концентрациях субстрата внешняя диффузия действительно играет заметную роль.

диффузия должна стать существенным фактором в ферментативном процессе. Действительно, эксперимент<sup>45</sup> показал, что реакция полностью контролируется диффузией при  $C_0 < 10^{-2}$  М и что влияние диффузии менее существенно при  $C_0 > 10^{-2}$  М. Видно, что теория хорошо согласуется с опытом. Как и следовало ожидать, диффузионное влияние исчезает при понижении скорости ферментативной реакции, проводя опыт вдали от рН-оптимума (при рН < 5). В свою очередь, размельчение частиц, содержащих иммобилизованный фермент, также

Ферменты иногда иммобилизуют в мембранах<sup>47-50</sup> или пришивают их к листам из целлюлозы<sup>51, 52</sup>. На поверхности мембраны также существует неподвижный слой, который в некоторых случаях может перевести реакцию в диффузионную область. Такая система подробно проанализирована Качальским с сотр.<sup>48</sup>. Из кинетических свойств этой системы можно найти толщину диффузионного слоя, равную  $\approx 50$  микронам. Это значение согласуется с полученными ранее данными по определению  $\delta$  из зависимости проницаемости различных мембран от эффективности перемешивания<sup>53</sup>.

Отметим, что приведенные примеры в достаточной мере указывают на то, что внешнедиффузионные факторы действительно могут играть важную роль в катализе иммобилизованными ферментами. В свою очередь, рассмотренные теоретические закономерности позволяют наметить методические пути, по которым экспериментатор может вывести реакцию из диффузионной области в кинетическую (если, например, повысить концентрацию субстрата или, наоборот, уменьшить удельную концентрацию иммобилизованного фермента, или же усилить перемешивание, размельчить частицы, содержащие иммобилизованный фермент и т. п.).

## 2. Внутридиффузионное торможение

Реакция фермента, заключенного в трехмерную сетку геля или полимера, или же фермента, химически присоединенного к пористому носителю, может оказаться чувствительной к торможению за счет внутренней диффузии, т. е. диффузии субстрата внутрь геля, полимера или

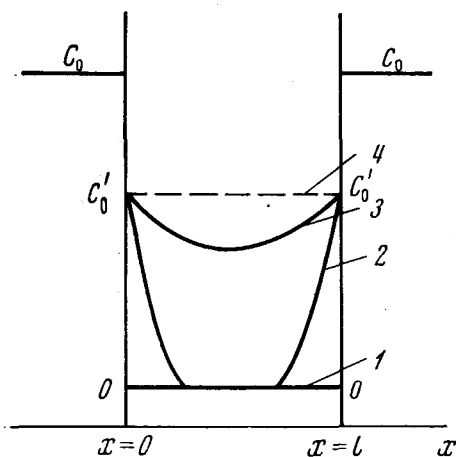


Рис. 3. Диффузия субстрата в мембрану (пояснения даны в тексте): 1 — распределение субстрата при  $t=0$ ; 2 — при  $t>0$ ; 3 — стационарное состояние при наличии ферментативной реакции; 4 — равновесное состояние в отсутствие ферментативной реакции

в порах носителя. Рассмотрим этот вопрос на примере мембраны (например, полиакриламидной<sup>50</sup> или коллодиевой<sup>47-49</sup>) или полимерного диска (диаметр которого много больше толщины), содержащих иммобилизованный фермент. Проблему внутренней диффузии в таких системах анализировали Качальский с сотр.<sup>49</sup> для низких концентраций субстрата и Лейдлер и Сундарам<sup>7, 54</sup> в общем случае.

Здесь и далее мы будем исходить из модели простой диффузии по Фику. Если между мембраной и диффузантом существует взаимодействие (например, электростатическое<sup>55</sup>), то первый закон Фика следует записать в виде

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \left[ \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{C}{kT} \cdot \frac{\partial U}{\partial x} \right]$$

где  $m$  и  $C$  — количество, и, соответственно, концентрация переносимого вещества,  $t$  — время,  $D$  — коэффициент диффузии,  $A$  — площадь, через которую протекает диффузия,  $k$  — константа Больцмана,  $T$  — абсолютная температура,  $x$  — координата направления диффузии,  $U$  — потенциальная энергия диффундирующей частицы, зависящая от ее расположения по отношению к мембране. Решение этого уравнения зависит от вида функции  $U(x)$ . В случае простого электростатического взаимодействия  $U(x)$  определяется законом Кулона.

Поместим мембрану толщиной  $l$  с иммобилизованным в ней ферментом в раствор субстрата, концентрация которого  $C_0$  (рис. 3) <sup>7</sup>. В начальный момент времени ( $t=0$ ) концентрация субстрата в мембране, естественно, равна нулю. Затем она во времени возрастает и достигает равновесного значения, равного в отсутствие ферментативной реакции  $C_0' = P \cdot C_0$ , где  $P$  — коэффициент распределения субстрата между мембранной и водной «фазами» (пунктирная линия на рис. 3). Если же в мембране протекает ферментативная реакция, потребляющая субстрат, то при наличии внутренних диффузионных затруднений стационарная концентрация субстрата в мембране может быть меньше  $C_0'$  и должна зависеть от  $x$ , как это показано на рис. 3.

#### Время установления стационарного состояния

Для практических целей важно оценить время установления стационарного состояния, когда скорость диффузионного потока становится равной скорости ферментативной реакции, и следовательно, концентрация диффундирующего к ферменту субстрата сохраняет постоянное (стационарное) значение (при  $C_0 = \text{const}$ ). В общем аналитическое решение этого вопроса невозможно и поэтому необходимо применить численные методы. В связи с этим в качестве первого приближения проанализируем случай, когда в мембране отсутствует ферментативная реакция. Если принять  $P=1$ , то зависимость концентрации в мембране  $C$  от времени  $t$  запишется следующим образом <sup>56</sup>:

$$C = C_0 \left[ 1 - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1 - \cos n\pi}{n} \cdot \sin \frac{n\pi x}{l} \cdot \exp \left( -\frac{Dn^2\pi^2 t}{l^2} \right) \right] \quad (14)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии субстрата в мембранной среде. При достаточно больших временах, сумма ряда в уравнении (14) определяется главным образом первым членом ( $n=1$ ):

$$C = C_0 \left[ 1 - \frac{4}{\pi} \cdot \sin \frac{\pi x}{l} \cdot \exp \left( -\frac{D\pi^2 t}{l^2} \right) \right] \quad (15)$$

Естественно, что концентрация субстрата всегда будет минимальной в середине мембраны ( $x = \frac{l}{2}$ ). Временем практического установления равновесия будем считать время  $\tau$ , по прошествии которого концентрация субстрата в середине мембраны составит 90% от исходной концентрации субстрата в растворе, т. е. примем  $C = 0,9 \cdot C_0$ . Тогда из уравнения (15) имеем

$$\frac{4}{\pi} \cdot \exp \left( -\frac{D\pi^2 \tau}{l^2} \right) = 0,9 \quad (16)$$

откуда \*

$$\tau = 0,035 \cdot \frac{l^2}{D} \quad (17)$$

\* В работах Лейдера и Сундарамы <sup>7, 54</sup> при переходе от (16) к (17) вкралась арифметическая ошибка, вследствие чего дается неверное выражение для определения  $\tau$ , превышающее истинное в 7,3 раза.

ТАБЛИЦА 2

Коэффициенты диффузии  $D$  сахарозы в различных средах

Среда	$D \cdot 10^6, \text{ см}^2/\text{сек}$	Ссылки на литературу
Водный раствор	5,0	58
9,5% полиакриламидный гель (95% акриламида + 5% сшивки <sup>a</sup> )	$2,5 \pm 0,7$	59
9,9% полиакриламидный гель (90% акриламида + 10% сшивки <sup>a</sup> )	$1,9 \pm 0,7$	59
7,2% полиакриламидный гель (99% акриламида + 1% сшивки <sup>a</sup> )	$3,5 \pm 0,2$	59
7% гель желатины	$1,5 \pm 0,2$	60
0,8% гель агар-агара	$2,5 \pm 0,5$	61
Коллодиевая мембрана, содержащая 90% воды	2,8	47

<sup>a</sup> Сшивка —N, N'-метиленисакриламид.

Из уравнения (17) легко оценить время практического установления стационарного состояния. Толщину мембраны  $l$  можно измерить. Что же касается коэффициентов диффузии различных (низкомолекулярных) веществ в мембране, то можно полагать, что при не слишком большом содержании полимера в геле (а именно такие мембраны и применяются для иммобилизации ферментов<sup>47-50</sup>) значение  $D$  мало отличается от коэффициента диффузии, измеренного в воде. Так, в табл. 2 на примере сахарозы показано, что ее коэффициент диффузии уменьшается в разбавленном геле всего лишь в 2—3 раза по сравнению с водной средой. В итоге, если принять  $D \approx 3 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{сек}$ , что характерно<sup>57</sup> для веществ с молекулярным весом до  $10^3$ , из (17) для мембраны толщиной 1 мм следует  $\tau \approx 2$  мин.

Когда же в мембране одновременно с диффузией идет ферментативная реакция, концентрация субстрата в центре мембраны может и не достигать столь высоких значений, как в отсутствие реакции. Следовательно, время установления стационарного состояния по субстрату в мембране с иммобилизованным в ней ферментом не должно превышать, по-видимому, значения  $\tau$ , справедливого для равновесного состояния мембраны без фермента\*. Поэтому величину  $\tau$ , найденную из уравнения (17), можно рассматривать как верхний предел для времени установления диффузионного стационарного состояния в ферментативных мембранных системах.

*Определение кинетических параметров ферментативной реакции в отсутствие внутريدиффузионных затруднений*

Если же реакция с иммобилизованным ферментом протекает медленнее, чем может идти диффузия (за счет того, что либо фермент не очень активен, либо мала его удельная концентрация) и, следовательно, не нарушается равновесное распределение субстрата между водным раствором и частицами носителя, тогда удельную скорость реакции, отнесенную к единице объема носителя, следует представить согласно (1) в виде

$$v_{\text{уд.}} = \frac{k'_{\text{кат.}} \cdot [E]_m \cdot C_0}{K'_m + C_0} \quad (18)$$

\* Если, конечно, сам фермент или изменения, вызванные им в мембране, не оказывают существенного влияния на коэффициент диффузии субстрата.

где  $C_0' = P \cdot C_0$ ,  $[E]_m$  — концентрация фермента в объеме носителя, и  $k'_{кат.}$ ,  $K'_m$  — истинные кинетические параметры ферментативного процесса внутри носителя, которые, в принципе, могут отличаться от соответствующих параметров для реакции в воде, хотя бы за счет того, что фермент в результате иммобилизации может принять иную конформацию, чем в воде, или же за счет влияния среды. Отсюда общую скорость реакции, отнесенную ко всему объему носителя ( $v_{общ.}$ , моль/сек), можно записать следующим образом:

$$v_{общ.} = \frac{k'_{кат.} \cdot E \cdot C_0}{K'_m (набл.) + C_0} \quad (19)$$

где  $K'_m (набл.) = K'_m / P$ ,  $E$  — общее количество фермента в носителе, равное в случае мембраны  $[E]_m \cdot A \cdot l$ ,  $A$  — площадь стороны мембраны и  $l$  — толщина мембраны. Как видно из (19), значения кинетических параметров  $k'_{кат.}$  и  $K'_m$  могут быть найдены обычным способом, применяемым в ферментативной кинетике при анализе уравнения Михаэлиса, если определить в независимом эксперименте значение  $P$ .

#### *Влияние внутренней диффузии на эффективные значения кинетических параметров ферментативной реакции в мембране*

Однако далеко не всегда можно быть уверенным, что протекание ферментативной реакции не нарушает равновесное распределение субстрата между водой и носителем. В общем случае величина концентрации субстрата  $C$  в заданной точке мембраны (с координатой  $x$ , см. рис. 3) определяется условием стационарности:

$$D \cdot \frac{d^2 C}{dx^2} = \frac{k_{кат.} \cdot [E]_m \cdot C}{K'_m + C} \quad (20)$$

которое отражает фактически равенство градиента диффузионного потока через единицу поверхности, определяемого вторым законом Фика, и скорости ферментативной реакции. Задача состоит в нахождении вида функции  $C(x)$ . Уравнение (20), вообще говоря, может быть решено лишь численно, за исключением двух случаев.

а. Если  $C \ll K'_m$  (а это справедливо, например, при низких концентрациях субстрата, когда  $C'_0 = C_0 \cdot P \ll K'_m$ ), то

$$\frac{d^2 C}{dx^2} = \alpha^2 \cdot C \quad (21)$$

где

$$\alpha = \sqrt{\frac{k'_{кат.} \cdot [E]_m}{K'_m \cdot D}} \quad (22)$$

Решение уравнения (21) по методу Эйлера с граничными условиями  $x = 0, C = C'_0$  и  $x = l, C = C'_0$  дает

$$C = C'_0 \cdot \frac{\text{sh } \alpha x + \text{sh } \alpha (l - x)}{\text{sh } \alpha l} \quad (23)$$

Стационарная скорость расходования субстрата в системе должна быть равной диффузионному потоку через обе стороны мембраны, то есть,

$$v'_{общ.} = 2A \cdot D \cdot \left. \frac{dC}{dx} \right|_{x=0, l} \quad (24)$$

где градиент концентрации субстрата на границе мембраны следует из уравнения (23) и равен:

$$\left. \frac{dC}{dx} \right|_{x=0} = \left. \frac{dC}{dx} \right|_{x=l} = \pm \alpha \cdot C'_0 \cdot \frac{\operatorname{ch} \alpha l - 1}{\operatorname{sh} \alpha l} \quad (25)$$

Тогда из (24) и (25) после несложных преобразований общую скорость реакции, отнесенную ко всему объему носителя ( $v'_{\text{общ.}}$ ), или же ее удельное значение ( $v'_{\text{уд.}}$ ) на единицу объема носителя можно записать в следующем виде:

$$v'_{\text{уд.}} = \frac{v'_{\text{общ.}}}{A \cdot l} = \frac{k'_{\text{кат.}} \cdot [E]_{\text{м}} \cdot C'_0}{K'_m} \cdot F \quad (26)$$

где

$$F = \frac{2}{\alpha \cdot l} \cdot \frac{\operatorname{ch} \alpha l - 1}{\operatorname{sh} \alpha l} \equiv \frac{\operatorname{th} \gamma}{\gamma} \quad (27)$$

и  $\gamma = \frac{\alpha \cdot l}{2}$ . Видно, что выражение (26) отличается от выражения (18)

для скорости реакции в отсутствие диффузионных затруднений (при ус-

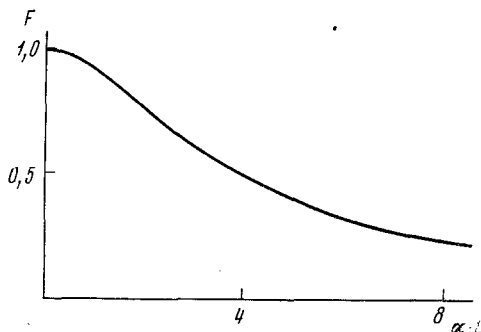


Рис. 4. Теоретическая зависимость критерия  $F$  от  $\alpha \cdot l$  (уравнение (27))

ловии  $C'_0 \ll K'_m$ ) лишь множителем  $F$ , который и отражает влияние внутренней диффузии. Величину  $F$  называют фактором эффективности; подробно его свойства будут рассмотрены ниже. Здесь только укажем на рис. 4, где представлен график зависимости  $F$  от  $\alpha l$ , рассчитанный на основании уравнения (27). При  $\alpha l \rightarrow 0$  (что выполняется при очень малой активности фермента  $k'_{\text{кат.}} \cdot [E]_{\text{м}} / K'_m$  или же при малой толщине мембраны) имеем  $F \rightarrow 1$ , как и следовало ожидать из общих соображений. С увеличением толщины мембраны  $l$  или же с увеличением активности иммобилизованного фермента ( $k'_{\text{кат.}} \cdot [E]_{\text{м}} / K'_m$ , см. уравнение (22)) значение  $F$  падает, что указывает на возрастающую роль диффузионных затруднений.

б. Если  $C \gg K'_m$  (а это реализуется при условии, что значение  $C'_0$  так велико, что в любой точке мембраны стационарная концентрация субстрата гораздо больше  $K'_m$ ), то из (20) имеем

$$\frac{d^2 C}{dx^2} = \omega \quad (28)$$

где  $\omega$  равно  $k'_{\text{кат.}} \cdot [E]_{\text{м}} / D$ . Решение уравнения (28), при граничных условиях  $x=0$ ,  $C=C'_0$  и  $x=l$ ,  $C=C'_0$  принимает вид

$$C = C'_0 - \frac{1}{2} \omega x (l - x) \quad (29)$$

Как уже отмечалось выше, в условиях стационарности общая скорость расходования субстрата, отнесенная ко всему объему носителя, должна быть равной диффузионному потоку через обе стороны мембраны (см. уравнение (24)). Поскольку градиент концентрации субстрата на границе мембраны, который следует из (29), равен:

$$\left. \frac{dC}{dx} \right|_{x=0} = \left. \frac{dC}{dx} \right|_{x=l} = \pm \frac{1}{2} \omega l \quad (30)$$

то (24) можно записать следующим образом:

$$v_{\text{общ.}} = \omega \cdot A \cdot D \cdot l = k'_{\text{кат.}} \cdot [E]_m \cdot A \cdot l \quad (31)$$

Как видно, последнее выражение совпадает с уравнением (18) (при  $C'_0 \gg K'_m$ ), справедливым для скорости реакции в отсутствие диффузионных затруднений. Это означает, что диффузия не играет никакой роли в ферментативной реакции при достаточно высоких концентрациях субстрата,  $C \gg K'_m$ .

в. Рассмотрим теперь общий случай, когда  $C \approx K'_m$ . Как уже указывалось, в общем случае уравнение (20) можно решить только численно. Однако характер зависимости скорости ферментативной реакции  $v'_{\text{общ.}}$  от концентрации субстрата в растворе  $C_0$  качественно можно представить себе на основании соотношений (26) и (31), характеризующих случаи (а) и (б). Если скорость реакции во всем исследуемом диапазоне концентраций субстрата подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен:

$$v'_{\text{общ.}} = \frac{k'_{\text{кат. (набл.)}} \cdot E \cdot C_0}{K'_{m \text{ (набл.)}} + C_0} \quad (32)$$

то можно полагать, основываясь на (26) и (31), что

$$k'_{\text{кат. (набл.)}} = k'_{\text{кат.}} \quad \text{и} \quad K'_{m \text{ (набл.)}} = \frac{K'_m}{P \cdot F} \quad (33)$$

Хотя приведенное рассуждение является не вполне строгим, его выводы удовлетворительно подтверждаются результатами численного интегрирования уравнения (20) <sup>7</sup>.

Из (33) видно, что внутренняя диффузия никак не сказывается на эффективной величине каталитической константы скорости, а влияет лишь на наблюдаемую константу Михаэлиса. Расчет, проведенный на основании уравнения (27), показывает, что при  $\alpha l < 1$  величина  $F$  отличается от 1 не более, чем на 10%, т. е.  $K'_{m \text{ (набл.)}} \approx K'_m/P$ , как это следует из (33), и, следовательно, диффузия не оказывает заметного влияния на реакцию. Если же  $\alpha l > 1$ , то  $F$  существенно меньше единицы, то есть,  $K'_{m \text{ (набл.)}} > K'_m/P$  и, следовательно, диффузия субстрата играет значительную роль. Таким образом, чтобы заранее оценить возможное влияние внутренней диффузии на катализ иммобилизованным в мембране ферментом, полезно вычислить значение  $F$  (уравнение (27)), от которого зависит эффективное значение константы Михаэлиса (уравнение 33) и сравнить его с единицей. При  $\alpha l > 3$  можем приближенно положить

$$F \approx \frac{2}{\alpha l} \quad (34)$$

(см. также рис. 4). Для приближенной оценки удобно принять, что значения  $k'_{\text{кат.}}$  и  $K'_m$ , которые определяют значения  $\alpha$  (уравнение (22)), мало отличаются от кинетических параметров реакции, протекающей в воде. Проведенная в лабораториях Лейдлера <sup>50</sup> и Качальского <sup>49</sup> проверка рассмотренной теории полностью ее подтвердила.

#### *Некоторые особенности внутридиффузионных затруднений, отличные от внешедиффузионного контроля*

а. При очень больших значениях  $\alpha \cdot l$ , когда  $F \ll 1$  (уравнение (34)), и, следовательно, реакция существенно замедлена диффузией (уравне-

ния (32) и (33)), имеем  $K'_{m(\text{набл.})} \gg C_0$ . В этом случае из (26), (34) и (22) для общей скорости ферментативного процесса, отнесенной ко всему объему носителя, имеем следующее выражение:

$$v'_{\text{общ.}} = 2P \cdot C_0 \cdot \sqrt{\frac{k'_{\text{кат.}} \cdot [E]_{\text{ж.}} \cdot D}{K'_m}} \quad (35)$$

Из уравнения (35) видно, что в отличие от внешнелиффузионного контроля, где скорость реакции в диффузионной области вообще не зависит от каталитических свойств фермента (см., например, уравнения (5) и (6)), при внутрелиффузионных затруднениях скорость реакции пропорциональна корню квадратному из концентрации фермента и его активности.

б. В отличие от внешнелиффузионного контроля, где температурная зависимость скорости реакции в диффузионной области отражает лишь энергию активации для коэффициента диффузии (см. стр. 23), при внутрелиффузионных затруднениях (уравнение (35)) кажущееся значение энергии активации  $\epsilon_{\text{каж.}}$  зависит от температурного хода не только кинетического и диффузионного параметров ( $\sqrt{k'_{\text{кат.}}/K'_m}$  и  $\sqrt{D}$  соответственно), но также и коэффициента распределения субстрата между водой и носителем  $P$  следующим образом  $\epsilon_{\text{каж.}} = \frac{1}{2}(\epsilon + \epsilon_D + 2\Delta H_p)$ ,

где  $\epsilon$  — энергия активации ферментативной реакции,  $\epsilon_D$  — энергия активации диффузии субстрата и  $\Delta H_p$  — энтальпия его переноса из воды в среду носителя.

в. Интересно отметить, что ингибирование ферментативной реакции уменьшает влияние внутренней диффузии в катализе<sup>62</sup>. Это следует из анализа уравнения (34), если принять во внимание, что при ингибировании значения  $k'_{\text{кат.}}$  и  $K'_m$ , определяющие  $\alpha$  (уравнение (22)), — на самом деле эффективные величины, которые обычным образом зависят от концентрации ингибитора.

#### *Зависимость внутренней диффузии от геометрических свойств частицы*

Выше было рассмотрено влияние внутренней диффузии на реакцию субстрата с ферментом, иммобилизованным в мембране. Однако частицы, содержащие иммобилизованный фермент, часто имеют сферическую, цилиндрическую или иную форму. Разумеется, в принципе возможно провести соответствующий анализ в каждом из этих случаев<sup>62, 63</sup>. Нам кажется, однако, более целесообразным рассмотреть сразу универсальный случай.

Пусть мы имеем частицу, в которой молекулы фермента равномерно распределены по матрице (гель, полимер или пористый носитель). Субстрат должен продиффундировать в частицу (внешнюю диффузию здесь, как и ранее, будем считать учтенным фактором) и там прореагировать. Решение этой задачи аналогично проблеме, которую в гетерогенном катализе рассматривали Зельдович<sup>64</sup>, Тиле<sup>65</sup> и Дамкелер<sup>66</sup>. Они показали, что наблюдаемая скорость каталитической реакции, контролируемой диффузией, равна

$$v_{\text{набл.}} = \eta \cdot v \quad (36)$$

где  $v$  — скорость реакции в отсутствие диффузионных затруднений и  $\eta$  — фактор эффективности<sup>65</sup>, который зависит от параметра  $\Phi$

$$\Phi = a \cdot \sqrt{\frac{v}{C_0 \cdot D}} \quad (37)$$



(модуль Тиле), где  $a$  — размер частиц (в случае сферы соответствующий радиусу),  $C_0$  — концентрация реагирующего вещества в объеме,  $D$  — его коэффициент диффузии в частице катализатора. Конкретный вид функции  $\eta$  зависит от формы частицы и порядка реакции по субстрату\*. Однако, как было показано Арисом<sup>67</sup>, форма частиц слабо влияет на функцию  $\eta$ . Во всех случаях кривая зависимости  $\eta$  от  $\Phi$ , весьма схожа с аналогичной кривой для зависимости  $F$  от  $\alpha l$  (см. рис. 4). При повышении порядка реакции от нулевого до третьего, кривая на рис. 4 в координатах  $\eta \div \Phi$  лишь несколько сдвигается влево и слегка деформируется. Однако непреложным остается факт: если  $\Phi < 1$ , то  $\eta$  близок к единице и, следовательно, диффузия не существенна для процесса; если же  $\Phi > 1$ , то  $\eta < 1$  и реакция тормозится диффузией. Поэтому можно полагать, что параметр  $\alpha l$ , характеризующий внутреннюю диффузию в мембране, является частным случаем модуля Тиле. Следовательно, чтобы заранее оценить роль внутренней диффузии в иммобилизованной ферментативной системе<sup>68</sup>, необходимо, просто вычислить  $\Phi$  и сравнить соответствующее значение  $\eta$  с единицей.

При вычислении  $\Phi$  (уравнение (37)) следует учесть, что коэффициент диффузии субстрата в пористой частице (например, в пористом стекле)<sup>28</sup> равен  $D = D_{\text{ист.}} \cdot q$ , где  $D_{\text{ист.}}$  — истинный коэффициент диффузии субстрата в жидкости, заполняющей поры частицы,  $q$  — доля объема пор (т. е. свободного для диффузии пространства) по сравнению с общим объемом частицы. Так, например, при диффузии растворенного в воде кислорода в поры пористого стекла<sup>36</sup>  $D_{\text{ист.}} = 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{сек}$ , а  $D = 0,93 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{сек}$ , т. е.  $q = 0,39$ .

#### Применение теоретических соотношений на практике

Представленная теория позволяет указать пути уменьшения внутридиффузионного торможения в катализе иммобилизованными ферментами, см. например, уравнения (32) — (34) или (36) — (37). Для этого есть два основных приема: первый, наиболее эффективный, это уменьшение размера частиц иммобилизованного фермента; второй — уменьшение удельной концентрации фермента в частице. В качестве примера, на рис. 5 приведена экспериментальная зависимость  $\eta$  от  $\Phi$  для иммо-

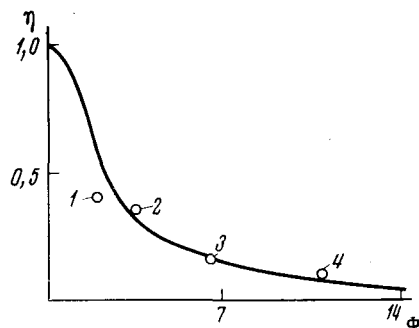


Рис. 5. Зависимость  $\eta$  от  $\Phi$ . Кривая вычислена теоретически, а точки соответствуют экспериментально определенным значениям при указанном размере (микроны) частиц<sup>36</sup>: 1 — 125—250; 2 — 250—500; 3 — 500—1000; 4 — >1000

билизованной на пористом стекле глюкозооксидазы<sup>36</sup>, наблюдаемая при изменении размера частиц. Оказывается, что  $\eta$  достигает значения  $\sim 0,95$ , лишь при размере частиц  $\sim 30$  микрон.

\* Например, для мономолекулярной реакции в случае пластины имеем  $\eta = \frac{1}{\Phi} \cdot \text{th } \Phi$ ,

а в случае сферы  $\eta = \frac{1}{\Phi} \cdot \left( \frac{1}{\text{th } 3\Phi} - \frac{1}{3\Phi} \right)^{27, 28}$ .

С помощью изложенной теории можно предсказать наиболее выгодные (с точки зрения отсутствия внутридиффузионных затруднений) способы иммобилизации. Так, анализ<sup>69</sup> показал, что при заданном размере частиц носителя и постоянном количестве нанесенного фермента величина  $\Phi$  меньше (и, следовательно,  $\eta$  ближе к единице), если фермент не распределен равномерно по объему носителя, а образует поверхностную пленку на каталитически инертном зерне. Такой метод иммобилизации ферментов действительно успешно применяется<sup>70, 71</sup>.

Интересно отметить, что как показано теоретически<sup>72, 73</sup> и подтверждено экспериментально<sup>74, 75</sup>, в полиферментных иммобилизованных системах, когда продукт реакции одного фермента является субстратом для другого, наличие внутридиффузионных затруднений может привести к увеличению суммарной скорости реакции. Это связано с тем, что в результате внутридиффузионных затруднений происходит «концентрирование» продукта (то есть, субстрата последующей реакции) в объеме носителя по сравнению с равновесным распределением.

### 3. Диффузия в простых жидкостях и в полимерах

При иммобилизации ферментов в полимерных носителях, а также при заключении ферментов в полимерные (чаще всего полиамидные) микрокапсулы<sup>76-86</sup> или полые волокна<sup>87-89</sup>, возникает проблема диффузии субстрата через полимерную среду.

Согласно развитой в последние годы теории Лейба и Штейна<sup>90-92</sup>, диффузионное поведение неэлектролитов в простых жидкостях и в полимерах коренным образом различается. При диффузии в простых жидкостях размер молекул диффузанта, как правило, больше размера молекул диффузионной среды, которую поэтому можно считать непрерывной и изотропной по вязкости. При диффузии молекул в полимерах, наоборот, размер молекул диффузанта меньше размера молекул диффузионной среды. Поскольку диффузия в полимерах происходит за счет движения сегментов полимерных молекул среды, то ее нельзя считать однородной и изотропной по вязкости.

Для сферического диффузанта радиусом  $a$  в простой жидкости коэффициент диффузии определяется уравнением Стокса — Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi \cdot a \cdot \nu} \quad (38)$$

где  $k$  — константа Больцмана,  $T$  — абсолютная температура,  $\nu$  — вязкость диффузионной среды. Если считать диффундирующие молекулы сферами с постоянной плотностью, то уравнение (38) можно преобразовать к следующему виду:

$$D \cdot M^n = \text{const} \quad (39)$$

где  $M$  — молекулярный вес диффузанта,  $n$  — численный коэффициент, равный  $1/3$  для сферических молекул. Это приближение справедливо для многих больших белковых молекул, однако обычно молекулы нельзя считать сферами и поэтому  $n$  несколько отличается от  $1/3$ . В качестве примера в табл. 3 приведены значения коэффициентов диффузии различных неэлектролитов в воде<sup>41</sup>. Из этих данных в координатах  $\lg D \div \div \lg M$  следует значение  $n$ , равное 0,43. Анализ большого количества данных<sup>91</sup> показал, что в простых жидкостях значение  $n$  колеблется от 0,3 до 0,5, т. е. коэффициент диффузии довольно слабо зависит от молекулярного веса диффузанта.

В полимерах диффузия протекает через случайно образующиеся в результате теплового движения полимерных сегментов «дыры»<sup>93</sup>. Для

ТАБЛИЦА 3

Диффузия различных неэлектролитов в воде<sup>41</sup>

Диффузент	$D_{25^{\circ}} \cdot 10^9, \text{ см}^2/\text{сек}$	Энергия активации диффузии, $\epsilon_D$ , ккал/моль
Мочевина, $M = 60$	13,78	4,470
Глицин, $M = 75$	10,55	4,627
Аланин, $M = 89$	9,097	4,783
Декстроза, $M = 180$	6,728	4,959
Циклогептаамилоза, $M = 1134$	3,224	4,931
Бычий сывороточный альбумин, $M = 68\ 000$	0,65	4,969

ТАБЛИЦА 4

Зависимость коэффициентов диффузии углеводов в полиизобутилене от геометрии их молекул<sup>99</sup>.

Диффузент	<i>n</i> -Пентан	изо-Пентан	нео-Пентан
$D_{35^{\circ}\text{C}} \cdot 10^9, \text{ см}^2/\text{сек}^*$	2,64	1,32	0,62

\* Значение  $D$  определяли, экстраполируя получаемые данные к нулевой концентрации диффузанта

того, чтобы диффузент мог пройти через дыру, она, очевидно, должна быть подходящего размера. Маленькие диффузенты могут проходить и через малые и через большие дыры, а большие диффузенты — только через большие дыры. Поскольку образование больших дыр требует больших энергий, их будет намного меньше, чем маленьких дыр; это качественное рассуждение подтверждает количественный расчет<sup>91</sup>. По этой причине следует ожидать, что коэффициенты диффузии малых и больших молекул в полимерных средах должны сильно различаться, т. е. значение  $n$  велико. И действительно, например, для полиметилметакрилатной диффузионной среды при 65° имеем<sup>90, 94</sup>  $n = 3,8$ . В то время, как при диффузии в обычных жидкостях удвоение молекулярного веса приводит к ~1,4-кратному уменьшению  $D$ <sup>41</sup>, то при диффузии в полиметилметакрилате это приведет к 14-кратному падению  $D$ ! Для различных полимерных сред  $n$  меняется от 2 до 8<sup>95—97</sup>.

Анализ влияния формы молекулы на коэффициент диффузии показал, что, например, в воде при отклонении формы молекулы от сферической происходит уменьшение  $D$ , причем значение  $D$  коррелирует с наибольшим изменением молекулы<sup>98</sup>. В полимерных же средах, наоборот, коэффициент диффузии веществ коррелирует с наименьшим изменением их молекул (см. табл. 4), что также связано, по-видимому, с «дырочной» природой процесса диффузии в полимерах.

Как следует из табл. 3, а также работ<sup>57, 91, 100</sup>, коэффициент диффузии, во-первых, слабо зависит от температуры (например, энергия активации диффузии  $\epsilon_D \approx 4—5$  ккал/моль в воде), и, во-вторых,  $\epsilon_D$  практически не зависит от молекулярного веса диффузанта. Эти факты вполне понятны, поскольку процесс диффузии в простых жидкостях определяется в основном свойствами диффузионной среды, а не диффузанта<sup>101</sup> (см. также уравнение Стокса — Эйнштейна). В то же время для диффузии в полимерах значения  $\epsilon_D$  существенно превышают величины, характерные для растворов<sup>102</sup> и, кроме того,  $\epsilon_D$  сильно увеличивается при повышении

ТАБЛИЦА 5

Диффузия различных веществ в пленку поливинилацетата<sup>97</sup>.

Диффузент	$D_{40^\circ} \cdot 10^{12}$ , см <sup>2</sup> /сек*	$\varepsilon_D$ , ккал/моль
Вода	$1,2 \cdot 10^5$	$15 \pm 1$
Метанол	$1,5 \cdot 10^3$	$21 \pm 2$
Ацетон	$1,3 \cdot 10^1$	$39 \pm 3$
1-Пропанол	$4,8 \cdot 10^{-1}$	$41 \pm 4$

\* Значение  $D$  определяли, экстраполируя получаемые результаты к нулевой концентрации диффузанта

ТАБЛИЦА 6

Влияние различных параметров на  $s$ - и  $p$ -типы диффузии<sup>92</sup>

Параметр	$s$ -Тип диффузии	$p$ -Тип диффузии
Размер диффузанта	Увеличение размера приводит лишь к слабому уменьшению коэффициента диффузии ( $n = 0,3-0,5$ )	Увеличение размера приводит к резкому уменьшению коэффициента диффузии ( $n = 2-8$ )
Форма диффузанта	Коэффициент диффузии коррелирует в основном с наибольшим измерением молекулы диффузанта	Коэффициент диффузии коррелирует в основном с наименьшим измерением молекулы диффузанта
Температура	Повышение температуры приводит к слабому увеличению коэффициента диффузии как для больших, так и малых молекул	Повышение температуры приводит к значительному увеличению коэффициентов диффузии; это увеличение тем больше, чем больше размер диффузанта
Пластификаторы	Почти не влияют	Добавление их в полимерную среду приводит к повышению коэффициентов диффузии других молекул

молекулярного веса диффузанта (см. табл. 5). Все это легко объяснить в рамках «дырочной» концепции диффузии в полимерах, поскольку образование больших дыр, необходимых для диффузии больших молекул, требует больших энергий, чем образование маленьких дыр. Таким образом, в отличие от диффузии в жидкостях, в полимерах значение  $D$  сильно зависит от температуры.

Наконец, отметим, что при не слишком больших концентрациях диффузентов, их совместная диффузия в простых жидкостях протекает взаимонезависимо. В то же время при диффузии в полимерах добавка небольших количеств некоторых веществ (называемых пластификаторами) приводит к резкому повышению коэффициентов диффузии других веществ<sup>97, 103, 104</sup>, по-видимому, вследствие улучшения их растворимости в полимере<sup>104</sup>. Так, например, добавление 2% воды в образец поливинилацетата при 40° приводит к 75-кратному увеличению коэффициента диффузии для четыреххлористого углерода<sup>103</sup>.

На основании приведенных данных видно, что диффузионные процессы в простых жидкостях и в полимерах принципиально различны. По предложению Лейба и Штейна<sup>97</sup> диффузию в жидкостях называют  $s$ -типом (от английского слова simple), а в полимерах —  $p$ -типом (от английского слова polymer). Как уже нами указывалось,  $s$ - и  $p$ -типы диффузии существенно различаются между собой по четырем признакам, сводка которых дана в табл. 6. Совокупность этих четырех признаков дает кри-

терий для определения типа диффузии в данной среде. Оказалось<sup>91, 92</sup>, что безмедиаторная диффузия неэлектролитов через биологические мембраны полностью относится к  $p$ -типу диффузии.

В катализе ферментами, иммобилизованными в полимерных матрицах или микрокапсулах, при диффузии субстратов (даже низкомолекулярных) через полимерную среду, по-видимому, также может иметь место не только  $s$ -, но и  $p$ -тип диффузии. Например, лишь с этой точки зрения можно объяснить результат, полученный в работе<sup>105</sup>, согласно которому проницаемость для перекиси водорода микрокапсулы из нитрата целлюлозы более чем в 20 раз превосходит проницаемость этой микрокапсулы для мочевины. В связи с этим подчеркнем, что в случае  $p$ -типа диффузии следует ожидать резкой зависимости наблюдаемой эффективности катализа от молекулярных весов субстратов и от температуры.

#### 4. Зависимость константы скорости реакции от диффузионных свойств среды

Даже если учесть роль внешней и внутренней диффузии в ферментативной реакции, ее скорость может зависеть от диффузионных свойств реакционной среды. Вопрос о влиянии диффузии на константы скоростей химических реакций решен в работах Смолуховского<sup>106</sup>, Дебая<sup>107</sup> и Нойеса<sup>108</sup>. Очевидно, что диффузия не должна играть никакой роли в мономолекулярной реакции. Для биомолекулярной реакции между двумя незаряженными частицами, наблюдаемая константа скорости  $k_{\text{набл.}}$  в общем случае равна:

$$k_{\text{набл.}} = \frac{k}{1 + \frac{k}{4\pi \cdot D_{\Sigma} \cdot \sigma}} \quad (40)$$

где  $k$  — истинная константа скорости реакции,  $D_{\Sigma}$  — сумма коэффициентов диффузии реагентов,  $\sigma$  — равновесное расстояние взаимодействия. Если  $1 \gg k/4\pi D_{\Sigma} \cdot \sigma$ , то  $k_{\text{набл.}} = k$  и диффузия не существенна для реакции; если же, наоборот,  $1 \ll k/4\pi \cdot D_{\Sigma} \cdot \sigma$ , то  $k_{\text{набл.}} = 4\pi D_{\Sigma} \cdot \sigma$  (т. е. не зависит от  $k$ )\* и реакция полностью контролируется диффузией. Уравнение (40) справедливо при условии, что молекулы не взаимодействуют друг с другом, если расстояние между ними ( $r$ ) больше, чем  $\sigma$ .

В общем справедливо уравнение Дебая:

$$k_{\text{набл.}} = \frac{k}{1 + \frac{k \int_{\sigma}^{\infty} \exp\left(\frac{U}{kT}\right) \cdot \frac{dr}{r^2}}{4\pi D_{\Sigma}}} \quad (41)$$

где  $U$  — энергия взаимодействия между реагирующими частицами. Если при  $r > \sigma$   $U=0$ , то уравнение (41) превращается в уравнение (40). Обычно вид функции  $U(r)$  неизвестен и поэтому (41) нельзя представить в аналитической форме. Однако если принять, что между частицами действует электростатическое кулоновское взаимодействие, то  $U = z_1 \cdot z_2 e^2 / \chi \cdot \sigma$ , где  $z_1 \cdot e$  и  $z_2 \cdot e$  — заряды реагирующих частиц ( $e$  — заряд

\* Это выражение справедливо с точностью до стерического фактора, так как уравнения (40) — (41) выводились в предположении, что каждое столкновение реагентов приводит к химической реакции.

электрона),  $\kappa$  — диэлектрическая постоянная среды. В этом случае для константы скорости диффузионно-контролируемой реакции имеем следующее выражение:

$$k_{\text{набл.}} = 4\pi D_{\Sigma} \cdot \sigma \cdot \frac{\theta}{\exp \theta - 1} \quad (42)$$

$\theta = \frac{z_1 \cdot z_2 \cdot e^2}{\kappa \cdot \sigma \cdot k \cdot T}$ . Следовательно, зная соответствующие параметры среды и реакции, можно оценить границы диффузионного контроля.

Самой быстрой стадией ферментативных реакций следует считать образование комплекса Михаэлиса: константы скоростей этой стадии иногда приближаются к величинам, характерным для диффузионно-контролируемых процессов даже в воде<sup>109</sup>. Поэтому следует ожидать, что в очень вязких средах, где значение  $D$  исключительно мало, реакция может полностью контролироваться диффузией<sup>110</sup> (причем, а это следует особо подчеркнуть, значение  $k_{\text{набл.}}$  может быть очень малым, поскольку в этом случае  $k_{\text{набл.}}$  пропорциональна  $D_{\Sigma}$ , см. уравнение (40)).

Рассмотрим реакцию фермента с субстратом в геле, полагая, что данный процесс в растворе не контролируется диффузией. При увеличении концентрации геля его поры будут уменьшаться и должен наступить такой момент, когда они станут соизмеримы с размером белковой глобулы фермента, что приведет к резкому падению ее коэффициента диффузии (переход от  $s$ - к  $p$ -типу диффузии). Такое явление было установлено экспериментально<sup>111</sup>. Однако в случае реакции с низкомолекулярным суб-

стратом это не приведет к диффузионному торможению, даже если фермент совсем «остановится», поскольку в уравнения (40) — (42) входит сумма коэффициентов диффузии и, кроме того, для низкомолекулярных соединений значение  $D$  слабо изменяется при повышении концентрации геля даже до очень больших величин<sup>59</sup>. Другое дело, если субстрат — это высокомолекулярное соединение. Тогда повышение концентрации геля в конце концов должно привести такую реакцию в диффузионно-контролируемую область, а при дальнейшем повышении концентрации геля (что приведет к падению  $D$ ) к резкому уменьшению наблюдаемой скорости реакции. Эти эффекты были предсказаны и обнаружены экспериментально в нашей лаборатории<sup>111, 112</sup>. На рис. 6 представлены данные по зависимости наблюдаемой скорости реакции трипсина с химотрипсиногеном (для обоих белков  $M \approx 25\,000$ ) в полиакриламидном геле от

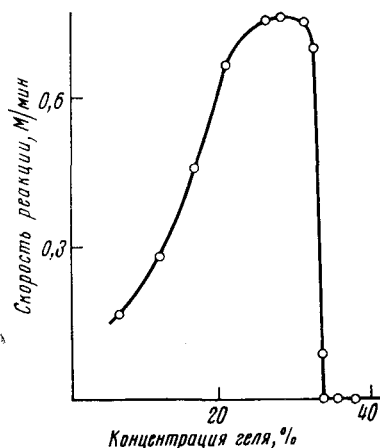


Рис. 6. Зависимость наблюдаемой скорости реакции ( $\times 10^6$ ) трипсина с химотрипсиногеном в полиакриламидном геле от его концентрации<sup>112</sup>

концентрации геля<sup>112</sup>. Видно, что при увеличении концентрации геля примерно до 32% наблюдаемая скорость реакции даже несколько увеличивается (что связано с ее спецификой), а затем на протяжении лишь 2% падает практически до нуля за счет диффузионных затруднений.

В заключение отметим, что скорость ферментативной реакции, протекающей в полимере, может контролироваться диффузией даже для низкомолекулярного субстрата, если только он диффундирует по  $p$ -типу. В свою очередь, следует указать, что эффекты диффузионного торможения ферментативных реакций в полимерных (гелевых) средах могут быть использованы для изучения тонкой структуры полимерной матрицы.

### III. ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ НОСИТЕЛЯ НА КИНЕТИКУ КАТАЛИЗА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

Основная идея этого и двух последующих разделов настоящего обзора состоит в том, что при иммобилизации ферментов у них фактически появляется новый тип специфичности, по сравнению с нативным биокатализатором. Этот феномен обусловлен влиянием носителя на катализ. В первую очередь следует отметить, что реакционную систему (состоящую из фермента, иммобилизованного на (или в) носителе, помещенном в водный раствор) можно считать двухфазной. Именно с двухфазным характером реакционной системы связано то обстоятельство, что компоненты реакции (субстраты, кофакторы, ингибиторы, ионы водорода и др.) равномерно распределены между водным раствором и эффективным объемом носителя (к которому следует отнести в общем случае и некоторый прилегающий слой раствора). Разумеется, такое распределение оказывает влияние на кинетику ферментативного процесса. На этом вопросе остановимся несколько подробнее.

#### 1. рН-эффекты

При иммобилизации фермента на заряженном носителе следует ожидать, что концентрация ионов водорода в фазе носителя будет меньше, чем в растворе, если носитель заряжен положительно, и, наоборот, больше, чем в растворе в случае отрицательно заряженного носителя. Это следует из количественной теории, развитой в<sup>113</sup>. Так, отношение концентраций ионов водорода в носителе  $[H^+]$  и в растворе  $[H^+]$  определится больцмановским фактором:

$$P_{H^+} = \frac{[H^+]' }{[H^+]} = \exp \left( -\frac{e\psi}{kT} \right) \quad (43)$$

где  $P_{H^+}$  — коэффициент распределения,  $e$  — абсолютная величина заряда электрона,  $\psi$  — электростатический потенциал заряженной частицы иммобилизованного фермента,  $k$  — константа Больцмана,  $T$  — абсолютная температура. В результате разность в рН между носителем и раствором дается следующим выражением:

$$\Delta pH \equiv pH' - pH = 0,43 \cdot \frac{e\psi}{kT} \quad (44)$$

В свою очередь, возникающий сдвиг рН может оказать влияние на скорость ферментативной реакции, если только механизм ее связан с диссоциацией какой-либо ионогенной группы фермента или других компонентов реакции (см. общую теорию рН-эффектов в ферментативном катализе<sup>114</sup>). Константа диссоциации ионогенной группы  $BH^+$  нативного фермента  $K = [B][H^+]/[BH^+]$  — это по определению такое значение  $[H^+]$ , при котором ионогенная группа диссоциирована наполовину. Следовательно, на основании (44) сдвиг  $pK$ , обусловленный носителем, равен

$$\Delta pK \equiv pK' - pK = -0,43 \cdot \frac{e\psi}{kT} \quad (45)$$

где  $K'$  — константа диссоциации ионогенной группы  $BH^+$  в ферменте, присоединенном к заряженному носителю. Из уравнения (45) видно, что для носителя, заряженного положительно ( $\psi > 0$ ), имеем  $pK' < pK$ , а если носитель заряжен отрицательно ( $\psi < 0$ ), то  $pK' > pK$ .

Эксперимент подтверждает приведенные рассуждения. Так, полианионные производные трипсина при низких ионных силах обнаруживают рН-зависимость каталитической активности, сдвинутую в щелочную

ТАБЛИЦА 7

Зависимость  $\Delta pK$  и  $\psi$  от ионной силы раствора для трипсина, иммобилизованного на полианионном носителе<sup>113</sup>

Ионная сила, $M$	$\Delta pK \equiv pK' - pK$	$\psi$ , мв	Ионная сила, $M$	$\Delta pK \equiv pK' - pK$	$\psi$ , мв
0,006	-2,4	-150	0,2	-1,3	-80
0,010	-2,0	-120	1,0	-0,4	-30
0,035	-1,6	-100			

область, а поликатионные производные трипсина — сдвинутую в кислую область<sup>13, 113</sup>. Аналогичным образом, значение  $pK$  имидазола гистидина-57, входящего в активный центр  $\alpha$ -химотрипсина, равно  $6,70 \pm \pm 0,02$  в случае нативного фермента, для полианионного производного  $\alpha$ -химотрипсина оно равно  $7,82 \pm 0,05$ , а для поликатионного —  $6,10 \pm \pm 0,05$ <sup>115</sup>. Перечень подобного рода фактов можно продолжить. Так, при иммобилизации на отрицательно заряженных носителях (бентоните или каолине)  $\alpha$ -химотрипсина<sup>116, 117</sup>, фосфатазы<sup>118</sup> и уреазы<sup>119</sup> наблюдается сдвиг рН-оптимума в щелочную область. В то же время при иммобилизации на положительно заряженной ДЭАЭ-целлюлозе рН-оптимумы аминоксилазы<sup>120</sup> и инвертазы<sup>121</sup> сдвигаются в кислую область. Аналогично ведут себя производные других ферментов: папаина<sup>9</sup>, фицина<sup>122</sup>, субтилопептидазы А<sup>9</sup>.

Описанные сдвиги кривых «скорость реакции — рН» достигают значительного масштаба лишь при низкой ионной силе раствора. Этот факт объясняется тем, что увеличение ионной силы, также как и увеличение диэлектрической постоянной, уменьшает электростатическое взаимодействие между заряженными частицами и, следовательно, отталкивание между заряженными носителем и эффектором (в данном случае ионами водорода)<sup>123</sup>. В табл. 7 приведены значения сдвигов  $pK$  для контролирующей каталитическую активность ионогенной группы трипсина, иммобилизованного на полианионном носителе (сополимер этилена и малеиновой кислоты) при разных значениях ионной силы раствора<sup>113</sup>.

Подобного рода рН-эффекты могут иметь место и при иммобилизации фермента на (или в) незаряженном носителе, где также можно ожидать распределения ионов водорода между раствором и объемом носителя, а именно  $[H^+] = P_{H^+} \cdot [H^+]$ . Отсюда  $\Delta pK = -\lg P_{H^+}$ . Это соотношение позволяет заранее определить знак и величину рН-эффектов в указанных системах, зная коэффициент распределения  $P_{H^+}$ .

Приведенная элементарная теория описывает сдвиги рН-профилей не только для истинно иммобилизованных биокатализаторов, но также и для водорастворимых модифицированных ферментов, например для ацетилированных и сукцинированных производных трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина, у которых вследствие ацилирования аминогрупп произошло увеличение отрицательного заряда глобулы<sup>13, 17, 113, 124, 125</sup>. В некоторых случаях наблюдаемый сдвиг рН-оптимума реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом, не является равновесным и обусловлен тем, что образующиеся в результате реакции кислота или основание не успевают диффундировать из носителя<sup>47, 49, 126</sup>.

## 2. Распределение субстрата между носителем и раствором

Простую картину можно наблюдать в случае электростатического взаимодействия между субстратом и носителем. Действительно, если но-



ТАБЛИЦА 8

Наблюдаемые константы Михаэлиса для различных иммобилизованных ферментов<sup>7</sup>

Фермент	Носитель	Заряд носителя	Субстрат	Заряд субстрата	$K_m(\text{набл.})$ , М	Ссылки на литературу
АТФ-креатинтрансфосфорилаза	Нет		АТФ	—	$6,5 \cdot 10^{-4}$	127
	<i>p</i> -Аминобензилцеллюлоза	0	АТФ	—	$8,0 \cdot 10^{-4}$	
	КМ-целлюлоза	—	АТФ	—	$7,0 \cdot 10^{-3}$	
Фицин	Нет		БАЭЭ <sup>a</sup>	+	$2,0 \cdot 10^{-2}$	122
	КМ-целлюлоза	—	БАЭЭ	+	$2,0 \cdot 10^{-3}$	
Трипсин	Нет		БАА <sup>b</sup>	+	$6,8 \cdot 10^{-3}$	113
	Сополимер этилена и маленной кислоты	—	БАА	+	$2,0 \cdot 10^{-4}$	
Папаин	Нет		БАЭЭ	+	$1,9 \cdot 10^{-2}$	128
	Сополимер <i>p</i> -аминофенилаланина и <i>L</i> -лейцина	0	БАЭЭ	+	$1,9 \cdot 10^{-2}$	
Бромелаин	Нет		БАЭЭ	+	0,11	129
	КМ-целлюлоза	—	БАЭЭ	+	0,049	

<sup>a</sup>БАЭЭ — этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-аргинина.<sup>b</sup>БАА — *N*-бензоил-*L*-аргининамид.

ситель и субстрат заряжены, то концентрация субстрата на (в) носителе  $C'_0$  определится из следующего соотношения:

$$P = \frac{C'_0}{C_0} = \exp\left(-\frac{z \cdot e \cdot \psi}{kT}\right) \quad (46)$$

аналогично (43), где  $P$  — коэффициент распределения,  $C_0$  — концентрация субстрата в растворе,  $z \cdot e$  — заряд субстрата. Тогда скорость катализируемой иммобилизованным ферментом реакции в фазе носителя можно представить в виде (19), где физический смысл коэффициента  $P$  раскрыт уравнением (46). Следовательно, эффективное значение константы Михаэлиса, наблюдаемое на опыте, дается следующим соотношением  $K_m(\text{набл.}) = K'_m \cdot \exp\left(\frac{z \cdot e \cdot \psi}{kT}\right)$ . Видно, что в случае одноименно заряженных носителя и субстрата ( $z \cdot e$  и  $\psi$  одного знака)  $K_m(\text{набл.}) > K'_m$ ; если же они заряжены разноименно ( $z \cdot e$  и  $\psi$  разного знака), то  $K_m(\text{набл.}) < K'_m$ . Из (19) следует, что при  $C_0 \gg K_m(\text{набл.})$  электростатическое взаимодействие субстрата и носителя не проявляется.

\* Необходимо отметить, что в основополагающую работу Гольдштейна, Левина и Качальского<sup>113</sup> вкралась ошибка, которая затем, к сожалению, перенесена как в последующие работы этих авторов, так и в другие обзоры<sup>8, 9</sup>. Справедливо приводя уравнение (44), авторы<sup>113</sup> затем, в качестве сдвига рН между средой носителя и раствором принимают наблюдаемый сдвиг рН-профиля каталитической активности фермента, который, очевидно, имеет противоположный знак. Это приводит к тому, что отрицательно заряженный носитель должен был бы характеризоваться положительным потенциалом  $\psi$ ! Далее на основании этого ошибочного положения авторы дают неверное уравнение для распределения заряженного субстрата между заряженным носителем и раствором (ср. с уравнением (46)):

$$C' = C_0 \cdot \exp\left(\frac{z \cdot e \cdot \psi}{kT}\right)$$

Отметим, что указанная ошибка отнюдь не носит терминологический характер, поскольку последнее уравнение и уравнение для сдвига рН между носителем и раствором (44), приведенные в работе<sup>113</sup>, являются взаимоисключающими.

В табл. 8 представлены значения  $K_{m(\text{набл.})}$  для некоторых реакций заряженных субстратов с ферментами, иммобилизованными на заряженных носителях. Видно, что в ряде систем за счет электростатических взаимодействий субстрата с носителем значение  $K_{m(\text{набл.})}$  может отличаться от  $K'_m$  более, чем на порядок. Как и следовало ожидать, при высоких значениях ионной силы раствора указанные эффекты становятся незначительными. Так, для реакции трипсина с этиловым эфиром *N*-бензоил-*L*-аргинина в растворе найдено  $K_m = 6,9 \cdot 10^{-3}$  мМ; для трипсина, иммобилизованного на сополимере этилена и малеиновой кислоты,  $K_{m(\text{набл.})} = 0,2 \cdot 10^{-3}$  мМ при ионной силе 0,04 М и  $K_{m(\text{набл.})} = 5,2 \cdot 10^{-3}$  мМ при ионной силе 0,50 М<sup>113</sup>.

Взаимодействие между субстратом и носителем, в принципе, может быть и другим, чем электростатическим. В общем случае, если значение  $P$  нельзя предсказать теоретически, его можно измерить в отдельном эксперименте (взяв носитель без фермента).

Так, например, в случае гидрофобного субстрата следует ожидать  $P > 1$  для гидрофобного носителя и  $P < 1$  для гидрофильной матрицы. В реакции с гидрофильным субстратом картина должна быть обратной. В свою очередь, характер распределения (значение  $P$ ) сказывается соответствующим образом на величине наблюдаемой константы Михаэлиса (уравнение (19)). В качестве примера укажем на реакцию иммобилизованной холинэстеразы с гидрофобным субстратом бензоилхолином, где наблюдаемая константа Михаэлиса уменьшается примерно в 10 раз при переходе от гидрофильной матрицы к гидрофобной<sup>130</sup>. В работе<sup>131</sup> показано, что при адсорбции липазы на гидрофобном носителе (силиконизированное стекло) резко повышается скорость ее реакции с трипропионином, что обусловлено концентрированием гидрофобного субстрата у поверхности носителя.

### 3. Распределение ингибиторов и кофакторов между носителем и раствором

При взаимодействии фермента с ингибитором или кофактором, их влияние на скорость реакций определяется, как известно<sup>114</sup>, соотношением  $K_G/[G]_0$ , где  $[G]_0$  — концентрация ингибитора или кофактора,  $K_G$  — его константа связывания с ферментом. В случае иммобилизованных ферментов имеем аналогичное соотношение  $K'_G/[G]_0$ , где  $[G]_0$  — концентрация эффектора на (в) носителе и  $K'_G$  — константа связывания иммобилизованного фермента с эффектором. Однако в кинетическом опыте можно найти лишь эффективный фактор  $K_{G(\text{набл.})} \cdot [G]_0$ , где  $K_{G(\text{набл.})} = K'_G \times P_G$  и  $P_G$  — коэффициент распределения, равный  $[G]_0/[G]_0$ . По отношению к коэффициенту распределения  $P_G$  приложимы, очевидно, все выкладки, которые даны выше для распределения субстрата между носителем и раствором.

В качестве примера укажем на иммобилизацию β-фруктофуранозидазы на гидрофобном носителе полиаминоستيrole, где наблюдаемая константа ингибирования анилином увеличивается в три раза по сравнению с реакцией нативного фермента<sup>132</sup>.

## IV. ИЗМЕНЕНИЕ ИСТИННЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ

Под истинными кинетическими параметрами следует понимать величины, не осложненные влиянием диффузионных факторов или распределением реагентов между фазой носителя и раствором.

Существуют, по крайней мере, две основные причины, вызывающие изменение истинных кинетических параметров при иммобилизации. Во-первых, иммобилизованный фермент может иметь конформацию, отличную от нативной. Такого рода объяснение часто можно встретить в литературе. Однако его практически невозможно ни подтвердить, ни опровергнуть экспериментально. В настоящее время нет достоверных экспериментальных данных, которые указывали бы на существование подобного рода эффектов. Вторая причина — это возможное изменение среды ферментативной реакции при иммобилизации. В некоторых случаях эффект среды на ферментативный процесс можно удовлетворительно объяснить в рамках влияния диэлектрической постоянной или же ионной силы, особенно для реакций между заряженными частицами<sup>133, 134</sup>.

Согласно концепции Лаурента<sup>135</sup>, при введении в раствор нейтральных полимеров происходит изменение химических потенциалов находящихся там макромолекул, за счет исключения их из части объема растворителя. Теоретический анализ (который нашел подтверждение на опыте) показал, что подобное явление должно приводить к уменьшению наблюдаемого значения константы Михаэлиса (или же наблюдаемой константы ингибирования белком). Возможно, при иммобилизации ферментов также имеют место сходные явления.

#### V. СТЕРИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ РЕАКЦИЯХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ С МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ СУБСТРАТАМИ

Иммобилизованные (особенно в пористых носителях) ферменты сохраняют, как правило, высокую каталитическую активность по отношению к низкомолекулярным субстратам, однако теряют при этом во многих случаях способность катализировать реакции с участием высокомолекулярных соединений. Так, в работе<sup>136</sup> найдено, что иммобилизованный в силикагеле трипсин реагирует с этиловым эфиром *N*-бензоил-*L*-аргинина, почти как нативный фермент, но вовсе не гидролизует казеин. Водонерастворимые производные политрипсина и политрипсина<sup>138</sup> расщепляют казеин со скоростями, составляющими всего 15% или, соответственно, 30% от тех значений, которые можно было бы ожидать на основании свойственной им активности по отношению к низкомолекулярному субстрату. Аналогичные результаты были получены также и для КМ-целлюлозных производных фицина<sup>43, 122</sup>, бромелаина<sup>139</sup>, трипсина<sup>140</sup>,  $\alpha$ -химотрипсина<sup>137, 140</sup>, а также для полиспиртовых, полианионных и поликатионных производных папаина<sup>8</sup> и субтилопептидазы *A*<sup>9</sup>. Во всех этих случаях понижение протеолитической активности связано, по-видимому, со стерическими затруднениями, при подходе белкового субстрата к иммобилизованному ферменту<sup>13, 14, 17, 137</sup>. Эти же стерические причины обуславливают, по-видимому, и другой факт, что иммобилизованный трипсин на 92% ингибируется сравнительно небольшим белковым панкреатическим ингибитором трипсина и вовсе не ингибируется более объемным соевым ингибитором трипсина<sup>141</sup>.

В работе<sup>142</sup> были прослежены некоторые количественные закономерности. Пусть  $\chi$ -специфическая активность проназы, иммобилизованной на водонерастворимом сополимере *p*-аминофенилаланина и лейцина, отнесенная к специфической активности нативного фермента. Найдено, что величина  $\sqrt[3]{\chi}$  зависит от  $\sqrt{M}$  линейно, где *M* — молекулярный вес субстрата. В этой связи авторы<sup>142</sup> обратили внимание на данные<sup>143, 144</sup> по распределению различных белков между водным раствором и сефадексом. Для этой системы было показано, что не весь продиффундировавший в сефадекс растворитель доступен для белков, а лишь некоторая его доля

$N(N < 1)$ , причем зависимость между  $N$  и  $M$  хорошо описывается следующим уравнением:

$$\sqrt[3]{N} = \text{const}_1 - \text{const}_2 \cdot \sqrt{M} \quad (47)$$

Поэтому авторы<sup>140</sup> полагают, что в описанной ими иммобилизованной ферментативной системе может иметь место аналогичный эффект, то есть белковым субстратам доступна лишь некоторая объемная доля пористой частицы, содержащей иммобилизованный фермент, причем величина этой доли зависит от  $M$  таким же образом, как это следует из уравнения (47).

Стерические затруднения для реакции с иммобилизованным ферментом могут сочетаться с электростатическим взаимодействием высокомолекулярных субстратов с заряженным носителем. Иммобилизованный на анионном носителе трипсин расщепляет в пепсиногене (а также в восстановленном карбоксиметилированном пепсиногене) лишь 10 пептидных связей, в то время как нативный фермент — 15 связей<sup>145</sup>. То же производное трипсина расщепляет миозин ~ в 50 раз медленнее нативного трипсина, причем по иным, чем нативный фермент, пептидным связям<sup>146, 147</sup>. Нативная и иммобилизованная на стекле ДНК-азы расщепляют ДНК на неодинаковые олигонуклеотиды<sup>148</sup>. Сходные эффекты были отмечены и в других работах<sup>149-151</sup>.

В итоге, на основании данных, которые приведены в разделах III — V, можно заключить, что субстратная специфичность иммобилизованного фермента может сильно зависеть от природы носителя и, следовательно, существенно отличаться от специфичности нативного биокатализатора.

\* \* \*

В настоящем обзоре дано объяснение с физико-химических позиций лишь некоторым кинетико-термодинамическим особенностям катализа иммобилизованными ферментами. Многие проблемы остались за рамками данного рассмотрения. Это связано с тем, что ряд научных направлений в области исследования катализа иммобилизованными ферментами не имеет пока какой бы то ни было количественной теории. Укажем на наиболее важные из них.

1. Исследование зависимости каталитической активности и субстратной специфичности иммобилизованных ферментов от природы носителя (особенно в приложении к индивидуальным стадиям ферментативного катализа). Необходимо создать критерии выбора оптимального носителя для данной ферментативной системы.

2. Объяснение причин стабилизации ферментов при иммобилизации. В этой области делаются лишь первые шаги<sup>152</sup>.

3. Разработка методов иммобилизации ферментов с кофакторами и полиферментных систем.

4. В технологическом плане следует обратить большее внимание на возможность применения «естественно» иммобилизованных систем, в частности, микроорганизмов.

5. Вопросы связанные с выбором оптимального типа реактора для данного процесса.

Основные усилия в исследованиях иммобилизованных ферментов должны быть направлены на решение прежде всего этих задач.

## ЛИТЕРАТУРА

1. T. H. Maugh, *Science*, **179**, 554 (1973).
2. R. Goldman, L. Goldstein, E. Katchalski, в книге *Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports* (G. R. Stark, ed.), Acad. Press, N. Y., 1971, стр. 1.
3. S. P. O'Neill, *Revs. Pure and Appl. Chem.*, **22**, 133 (1972).
4. А. Д. Вурник, *Усп. химии*, **42**, 547 (1973).
5. T. W. Goodwin, O. Lindberg, eds., *Biological Structure and Function*, **2**, Acad. Press, N. Y., 1961.
6. E. Katchalski, в книге *Symmetry and Function of Biological Systems at the Macromolecular Level* (A. Engstroem, B. Strandberg, eds.), Wiley, 1968, стр. 283.
7. K. J. Laidler, P. V. Sundaram, в книге *Chemistry of the Cell Interface, Part A* (H. D. Brown, ed.), Acad. Press, New York — London, 1971, стр. 255.
8. A. D. McLaren, L. Packer, *Adv. Enzymol.*, **33**, 245 (1970).
9. L. Goldstein, *Meth. Enzymol.*, **19**, 935 (1970).
10. E. M. Crook, K. Brocklehurst, C. W. Wharton, Там же, **19**, 963 (1970).
11. B. Alexander, A. M. Engel, Там же, **19**, 978 (1970).
12. J. Gryszkiewicz, *Folia Biol.*, **19**, 119 (1971).
13. L. Goldstein, E. Katchalski, *Ztschr. analyt. Chem.*, **243**, 375 (1968).
14. I. H. Silman, E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 873 (1966).
15. E. Brown, A. Racois, *Bull. soc. chim. France*, **1971**, 4613.
16. H. H. Weetall, *Polytechn. tijdschr.*, **P28**, 443 (1973).
17. L. Goldstein, в книге *Fermentation Advances* (D. Perlman, ed.), Acad. Press, N. Y., 1969, стр. 391.
18. E. Katchalski, I. H. Silman, R. Goldman, *Adv. Enzymol.*, **34**, 445 (1971).
19. P. Pihar, *Chem. Listy*, **65**, 713 (1971).
20. H. O. Hultin, J. R. Kittrell, R. L. Laurence, *Enz. Technol. Dig.*, **1**, 16 (1972).
21. R. Carbonell, M. D. Kostin, *Amer. Ind. Chem., Eng. J.*, **18**, 1 (1972).
22. H. D. Orth, W. Brümmer, *Angew. Chem.*, **84**, 319 (1972).
23. L. B. Wingard, мл., в кн. *Advances in Biological Engineering* (T. K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, eds.), vol. 2, Berlin — Heidelberg — New York, 1972, стр. 1.
24. А. И. Кёстнер, *Усп. химии*, **43**, 1480 (1974).
25. D. A. Gough, J. D. Andrade, *Science*, **180**, 380 (1973).
26. Д. А. Франк-Каменецкий, *Диффузия и теплопередача в химической кинетике*. Изд. АН СССР, М., 1947.
27. И. И. Иоффе, Л. М. Письмен, *Инженерная химия гетерогенного катализа*, «Химия», М., 1965.
28. C. N. Satterfield, *Mass Transfer in Heterogeneous Catalysis*, M. I. T. Press, Cambridge — Massachusetts — London, 1970.
29. O. Levenspiel, *Chemical Reaction Engineering*, Wiley, N. Y., 1962.
30. В. Г. Левич, *Физико-химическая гидродинамика*, Физматгиз, М., 1959.
31. Д. А. Франк-Каменецкий, *ЖФХ*, **13**, 756 (1939).
32. S. P. O'Neill, *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 675 (1972).
33. A. J. Karabelos, T. H. Wegner, T. J. Handratty, *Chem. Eng. Sci.*, **26**, 1581 (1971).
34. E. J. Wilson, C. J. Geankoplis, *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **5** (1), 9 (1966).
35. J. R. Ford, A. H. Lambert, W. Cohen, R. P. Chambers, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **1972**, No. 3, 267.
36. B. J. Rovito, J. R. Kittrell, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 143 (1973).
37. M. A. Lysis, *Chem. Process. Eng.*, **5**, 27 (1971).
38. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **1972**, No. 3, 15.
39. M. D. Lilly, A. K. Sharp, *Chem. Eng.*, **215**, CE 12 (1968).
40. H. H. Weetall, N. B. Havewala, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **1972**, No. 3, 241.
41. L. G. Longworth, *J. Phys. Chem.*, **58**, 770 (1954).
42. Х. Я. Бубен, Д. А. Франк-Каменецкий, *ЖФХ*, **20**, 225 (1946).
43. M. D. Lilly, W. E. Hornby, E. M. Crook, *Biochem. J.*, **100**, 718 (1966).
44. C. Horvath, A. Sardi, B. A. Solomon, *Physiol. Chem. Physics*, **4**, 125 (1972).
45. G. Kay, M. D. Lilly, *Biochim. biophys. acta*, **198**, 276 (1970).
46. C. R. Wilke, P. Chang, *AIChE J.*, **1**, 264 (1955).
47. R. Goldman, I. H. Silman, S. R. Caplan, O. Kedem, E. Katchalski, *Science*, **150**, 758 (1965).
48. R. Goldman, O. Kedem, E. Katchalski, *Biochemistry*, **10**, 165 (1971).
49. R. Goldman, O. Kedem, E. Katchalski, Там же, **7**, 4518 (1968).
50. P. S. Bunting, K. J. Laidler, Там же, **11**, 4477 (1972).
51. R. J. H. Wilson, G. Kay, M. D. Lilly, *Biochem. J.*, **108**, 845 (1968).
52. G. Kay, M. D. Lilly, A. K. Sharp, R. J. H. Wilson, *Nature*, **217**, 641 (1968).
53. B. Z. Ginzburg, A. Katchalski, *J. Gen. Physiol.*, **47**, 403 (1963).
54. P. V. Sundaram, A. Tweedale, K. J. Laidler, *Canad. J. Chem.*, **48**, 1498 (1970).
55. M. L. Shuler, R. Aris, H. M. Tsuchiya, *J. Theor. Biol.*, **35**, 67 (1972).

56. R. M. Barrer, *Diffusion in and through Solids*, p. 15, Cambridge Univ. Press, London, 1951.
57. N. E. Dorsey, в книге *International Critical Tables* (E. W. Washburn, ed.), vol. 5, McGraw-Hill, N. Y., 1929.
58. L. J. Gosting, M. S. Morris, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1998 (1949).
59. M. L. White, G. H. Dorion, *J. Polymer Sci.*, **55**, 731 (1961).
60. L. Friedman, E. O. Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 1295 (1930).
61. L. Friedman, Там же, **52**, 1311 (1930).
62. M. Moo-Young, T. Kobayashi, *Canad. J. Chem. Eng.*, **50**, 162 (1972).
63. T. Kobayashi, K. J. Laidler, *Biochim. biophys. acta*, **302**, 1 (1973).
64. Я. Б. Зельдович, *ЖФХ*, **13**, 163 (1939).
65. W. Thiele, *Ind. Eng. Chem.*, **31**, 916 (1939).
66. G. Damköhler, *Deut. Chem. Ing.*, **3**, 430 (1937).
67. R. Aris, *Chem. Eng. Sci.*, **6**, 265 (1957).
68. P. B. Weisz, *Science*, **179**, 433 (1973).
69. C. Horvath, J.-M. Ergasser, *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **12**, 229 (1973).
70. R. Haynes, K. A. Walsh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 235 (1969).
71. D. L. Marshall, J. L. Walter, R. D. Falb, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **1972**, No. 3, 195.
72. R. Goldman, E. Katchalski, *J. Theor. Biol.*, **32**, 243 (1971).
73. R. L. Lawrence, V. Okay, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 217 (1973).
74. K. Mosbach, B. Mattiasson, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2093 (1970).
75. B. Mattiasson, K. Mosbach, *Biochim. biophys. acta*, **235**, 253 (1971).
76. T. M. S. Chang, *Science*, **146**, 524 (1964).
77. T. M. S. Chang, F. C. McIntosh, S. G. Mason, *J. Physiol. Pharmacol.*, **44**, 115 (1966).
78. T. M. S. Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1531 (1971).
79. T. M. S. Chang, M. J. Poznansky, *Nature*, **218**, 243 (1968).
80. T. M. S. Chang, *Nature*, **229**, 117 (1971).
81. T. M. S. Chang, F. C. McIntosh, *Pharmacologist*, **6**, 1968 (1964).
82. T. M. S. Chang, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **1972**, No. 3, 395.
83. A. C. Janik, R. C. Boguslaski, *Federation Proc.*, **30**, 1132 (1971).
84. T. M. S. Chang, *Enzyme*, **14**, 95 (1972—1973).
85. J. C. W. Østergaard, S. C. Martiny, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 561 (1973).
86. P. V. Sundaram, *Biochim. biophys. acta*, **321**, 319 (1973).
87. P. R. Rony, *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 431 (1971).
88. D. Dinelli, *Proc. Biochem.*, **7**, 9 (1972).
89. S. Giovenco, F. Mcriisi, P. Pansolli, *FEBS Letters*, **36**, 57 (1973).
90. W. R. Lieb, W. D. Stein, *Nature*, **224**, 240 (1969).
91. W. R. Lieb, W. D. Stein, в книге *Current Topics in Membranes and Transport*, **2**, 1 (F. Bronner, A. Kleinzeller, eds.), Acad. Press, New York — London, 1971.
92. W. R. Lieb, W. D. Stein, *Nature New Biol.*, **234**, 220 (1971).
93. C. A. Kumins, T. K. Kwei, в книге *Diffusion in Polymers* (J. Crank, G. S. Park, eds.), Acad. Press, London, 1968, стр. 107.
94. H. Fujita, Там же, стр. 75.
95. В. К. Громов, Р. М. Васенин, А. Е. Чалых, С. С. Воюцкий, *ДАН*, **165**, 347 (1965).
96. A. Aitken, R. M. Barrer, *Trans. Faraday Soc.*, **51**, 116 (1955).
97. R. J. Kokes, F. A. Long, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 6142 (1953).
98. A. H. Soll, *J. Gen. Physiol.*, **50**, 2565 (1967).
99. S. Prager, F. A. Long, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4072 (1951).
100. J. H. Wang, C. V. Robinson, I. S. Edelman, Там же, **75**, 466 (1953).
101. С. Глассстон, К. Лейдлер, Г. Эйринг, *Теория абсолютных скоростей реакций*, гл. 9, ИЛ, М., 1948.
102. P. Meares, *Polymers: Structure and Bulk Properties*, Van Nostrand, London, 1965.
103. F. A. Long, L. J. Thompson, *J. Polymer Sci.*, **14**, 321 (1954).
104. P. Doty, *J. Chem. Phys.*, **14**, 244 (1946).
105. A. O. Mogensson, W. R. Vieth, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 467 (1973).
106. M. von Smoluchowski, *Ztschr. phys. Chem.*, **92**, 129 (1917).
107. P. Debye, *Trans. Am. Electrochem. Soc.*, **82**, 265 (1942).
108. R. M. Noyes, в книге *Progress in Reaction Kinetics*, **1** (G. Porter, ed.), 1961, стр. 128.
109. M. Eigen, G. G. Hammes, *Adv. Enzymol.*, **25**, 1 (1963).
110. A. D. McLaren, *Enzymologia*, **26**, 237 (1963).
111. И. В. Березин, А. М. Клибанов, В. С. Гольдмахер, К. Мартинек, *ДАН*, **218**, 367 (1974).
112. I. V. Berezin, A. M. Klivanov, K. Martinek, *Biochim. biophys. acta*, **364**, 193 (1974).
113. L. Goldstein, Y. Levin, E. Katchalski, *Biochemistry*, **3**, 1913 (1964).
114. М. Диксон, Э. Уэбб, *Ферменты*, «Мир», М., 1966.
115. L. Goldstein, *Biochemistry*, **11**, 4072 (1972).
116. A. D. McLaren, E. F. Esterman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **68**, 157 (1957).
117. A. D. McLaren, G. H. Peterson, в книге *Soil Nitrogen* (W. V. Bartholomew, F. E. Clark, eds.), Amer. Soc. Agr., Madison, Wisc., 1965, стр. 259.

118. J. R. Ramirez, A. D. McLaren, *Enzymologia*, **31**, 23 (1966).
119. G. Durand, *С. г.*, 259, 3397 (1964).
120. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Enzymologia*, **32**, 153 (1967).
121. H. Suzuki, Y. Ozawa, H. Maeda, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 807 (1966).
122. W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook, *Biochem. J.*, **98**, 420 (1966).
123. A. Katchalski, *Bicphys. J.*, **4**, 9 (1964).
124. J. Sri Ram, L. Terminiello, N. Bier, F. F. Nord, *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 464 (1954).
125. J. Sri Ram, N. Bier, P. H. Maurer, *Adv. Enzymol.*, **24**, 105 (1962).
126. S. Gestrelus, B. Mattiasson, K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.*, **36**, 89 (1973).
127. W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook, *Biochem. J.*, **107**, 669 (1968).
128. I. H. Silman, M. Albu-Weissenberg, E. Katchalski, *Biopolymers*, **4**, 441 (1966).
129. C. W. Wharton, E. M. Crook, K. Brocklehurst, *Eur. J. Biochem.*, **6**, 572 (1968).
130. K. Mosbach, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 1972, № 3, 189.
131. H. L. Brockman, J. H. Low, F. J. Kezdy, *J. Biol. Chem.*, **248**, 4965 (1973).
132. H. Filippusson, W. E. Hornby, *Biochem. J.*, **120**, 215 (1970).
133. K. J. Laidler, *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Chapter 7, Oxford Univ. Press (Clarendon), London — New York, 1958.
134. Л. Узбб, Ингибиторы ферментов и метаболизма, «Мир», М., 1966, тл. 15.
135. T. C. Laurent, *Eur. J. Biochem.*, **21**, 498 (1971).
136. P. Johnson, T. L. Whateley, *J. Coll. Interface Sci.*, **37**, 557 (1971).
137. А. М. Клубанов, Г. П. Самохин, К. Мартинек, И. В. Березин, ДАН, **218**, 715 (1974).
138. A. Bar Eli, E. Katchalski, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1690 (1963).
139. C. W. Wharton, E. M. Crook, K. Brocklehurst, *Eur. J. Biochem.*, **6**, 565 (1968).
140. M. A. Mitz, L. J. Summari, *Nature*, **189**, 576 (1961).
141. Y. Levin, M. Pecht, L. Goldstein, E. Katchalski, *Biochemistry*, **3**, 1905 (1964).
142. P. Cresswell, A. R. Sanderson, *Biochem. J.*, **119**, 447 (1970).
143. J. Porath, *Pure Appl. Chem.*, **6**, 233 (1963).
144. P. Andrews, *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
145. Eng Bee Ong, Y. Tsang, G. E. Perlmann, *J. Biol. Chem.*, **241**, 5661 (1966).
146. S. Lowey, L. Goldstein, S. M. Luck, *Biochem. Ztschr.*, **345**, 248 (1966).
147. S. Lowey, L. Goldstein, C. Cohen, S. M. Luck, *J. Mol. Biol.*, **23**, 287 (1967).
148. A. R. Neurath, H. H. Weetall, *FEBS Letters*, **8**, 253 (1970).
149. T. L. Westman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 313 (1969).
150. H. S. Slayter, S. Lowey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **58**, 1611 (1967).
151. S. Lowey, H. S. Slayter, A. G. Weeds, H. Baker, *J. Mol. Biol.*, **42**, 1 (1969).
152. D. Gabel, *Eur. J. Biochem.*, **33**, 348 (1973).

МГУ им. М. В. Ломоносова  
Межфакультетская лаборатория  
биоорганической химии и  
Кафедра химической кинетики