

## Некоторые кинетические свойства $\beta$ -фруктофуранозидазы из *Asp. awamori* 16

Г. М. Добролинская, Ю. З. Серова, В. Ф. Суходол, А. М. Куц  
ВНИИПрБ

Действию дрожжевой  $\beta$ -фруктофуранозидазы на сахарозу с целью гидролиза посвящен ряд исследований. Показано, что скорость гидролиза сахарозы зависит от концентрации фермента, концентрации реагирующих веществ, а также от температуры [4,8]. Установлено, что реакция гидролиза сахарозы дрожжевой  $\beta$ -фруктофуранозидазой является реакцией второго порядка.

Представляло интерес изучить действие, на сахарозу грибной  $\beta$ -фруктофуранозидазы в зависимости от дозы фермента и температуры.

Используемый препарат  $\beta$ -фруктофуранозидазы получен из глубинной культуры плесневого гриба *Asp. awamori* 16 осаждением этанолом. Активность препарата определялась по содержанию инвертного сахара, образующегося при инкубации фермента с сахарозой и составляла 4 500 ед./г [2].

В качестве субстрата использовали 10%-ный раствор сахарозы. Гидролиз субстрата проводили внесением ферментного препарата  $\beta$ -фруктофуранозидазы в количестве 1, 2, 4 ед. активности фермента на 1 г сахарозы с последующей инкубацией реакционной смеси при температурах 30, 40, 50° С. Редуцирующие сахара определяли по Бертрану. Экспериментальные данные динамики гидролиза показаны на рис. 1. Как видно из рис. 1 скорость гидролиза сахарозы с повышением температуры увеличивается.

Определение порядка реакции проводили графическим методом путем построения графика  $\lg(C_0 - C) = f(\tau)$  [5].

Получены различные порядки реакции гидролиза в зависимости от температуры. Для всех испытуемых растворов при температуре 30° С получены линейная зависимость и соответственно первый порядок реакции.

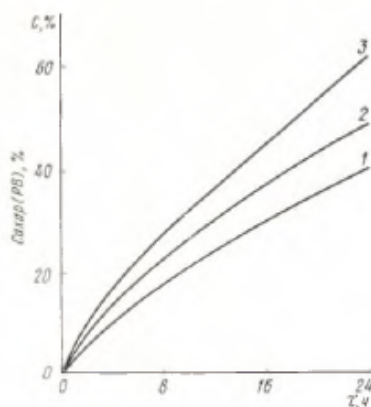


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза 10%-ного раствора сахарозы от температуры:  
1 — при 30° С; 2 — 40° С; 3 — 50° С.

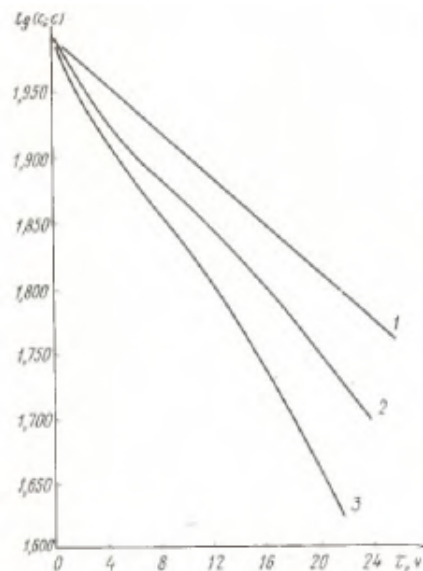


Рис. 2. Зависимость  $\lg(C_0 - C)$  от  $f(\tau)$  для определения порядка реакции:  
1 — при 30° С; 2 — 40° С; 3 — 50° С.

Характерно, что при температуре гидролиза 40° С ход реакции подчиняется первому порядку только в течение первых четырех часов, а при 50° С — только на протяжении первых двух часов (рис. 2).

Далее зависимость  $\lg (C_0 - C) = f(\tau)$  не линейна, а представляет собой ветвь параболы, которая описывается уравнением второго порядка.

В связи с тем что при 30° С ферментативный гидролиз сахарозы протекает по закону мономолекулярной реакции, константа скорости реакции определяется из выражения

$$K = \frac{1}{\tau} \ln \frac{C_0}{C_0 - C}, \quad (1)$$

где  $C_0$  — исходное количество сахарозы;

$C$  — количество прогидролизованной сахарозы.

По данным опытов, для различных количеств ( $\beta$ -фруктофуранозидазной активности на 1 г сахарозы и при различной температуре гидролиза рассчитаны средние скорости гидролиза (см. таблицу).

В связи с изменением порядка реакции на второй константы скорости гидролиза определяли из уравнения

$$\frac{dC}{d\tau} = K_2 C^2, \quad (2)$$

После интегрирования уравнения в пределах между  $\tau = 0$  (когда  $C = C_0$ ) и данным моментом времени  $\tau$  (когда  $C = C_\tau$ ) и преобразования получим

$$K_2 = \frac{1}{\tau} \frac{C_0 - C_\tau}{C_0 C_\tau}. \quad (3)$$

Величина константы скорости гидролиза зависит от выбора единиц, в которых берется концентрация сахарозы. При выражении концентрации сахарозы по инвертному сахару (в г/л) и введении фермента в количестве 1 ед. активности на 1 г сахарозы имеем:

$$\begin{aligned} \text{при } 40^\circ \text{С } K_2 &= \frac{1}{24} \cdot \frac{105,0 - 50,6}{105,0 \cdot 50,6} = \\ &= 0,424 \cdot 10^{-3} (\text{г/л})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1} \\ \text{при } 50^\circ \text{С } K_2 &= \frac{1}{24} \cdot \frac{105,0 - 65,6}{105,0 \cdot 65,6} = \\ &= 0,238 \cdot 10^{-3} (\text{г/л})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1} \end{aligned}$$

Для характеристики зависимости скорости ферментативного гидролиза сахарозы от температуры нами рассчитаны коэффициенты Вант-Гоффа [5].

$$Q_{10} = \frac{K_{40}}{K_{30}} \cdot \frac{K_{50}}{K_{40}}$$

(см. таблицу), показывающие, что с увеличением температуры на 10° С скорость гидролиза возрастает в среднем в 1,74 раза. Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными (рис. 1), а также находятся в соответствии с обычным интервалом температурных коэффициентов (1,0—2,0) для большинства ферментативных реакций [6, 7].

ЗАВИСИМОСТЬ КОНСТАНТ СКОРОСТИ ГИДРОЛИЗА САХАРОЗЫ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И КОЛИЧЕСТВА ФЕРМЕНТА

Количество фермента, единиц активности на 1 г сахарозы	Среднее значение констант скорости гидролиза сахарозы при температуре (в °С) $K_{\text{ср}} \cdot \text{ч}^{-1}$			Температурные коэффициенты	
	30°С	40°С	50°С	$Q_{10} = \frac{K_{40}}{K_{30}}$	$Q_{10} = \frac{K_{50}}{K_{40}}$
	1	0,0244	0,0419	0,0724	1,72
2	0,0358	0,0648	0,1120	1,81	1,72
4	0,0450	0,0808	0,1345	1,80	1,60

Константы скорости гидролиза сахарозы при температурах 40 и 50° С в таблице даны для участков, подчиняющихся закону мономолекулярной реакции.

Среднеарифметическая величина  $K_{cp}$  отличалась от частных значений  $K$  не более чем на 6—8%, что, по-видимому, вызвано погрешностью применяемой методики анализа. Такие колебания вполне допустимы при исследовании кинетических зависимостей [3].

Зная константы скорости реакции при различных температурах, можно рассчитать энергию гидролиза сахарозы  $\beta$ -фруктофуранозидазой из *Asp. awamori* 16.

Энергия активации определяется по формуле Аррениуса

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{E}{RT^2} \quad (4)$$

После интегрирования и преобразования получим

$$E = R \ln \frac{K_2}{K_1} \left( \frac{T_2 T_1}{T_2 - T_1} \right), \quad (5)$$

где  $K_1$  и  $K_2$  — константы скорости реакции при абсолютных температурах  $T_1$  и  $T_2$ ;  $R$  — газовая постоянная (1,987 кал/моль X град.).

Применительно к нашим данным (при 4 ед. активности  $\beta$ -фруктофуранозидазы на 1 г сахарозы) :

$$E = 1,987 \ln \frac{0,0808}{0,0450} \left( \frac{313 \cdot 303}{313 - 303} \right) = 10,080 \text{ кал/моль} = \\ = 10,08 \text{ ккал/моль} (42,23 \text{ кДж/моль}).$$

Величина энергии активации для грибной  $\beta$ -фруктофуранозидазы равна 10,08 ккал/моль, т. е. имеет тот же порядок, что и дрожжевая  $\beta$ -фруктофуранозидаза [4, 8].

## ВЫВОДЫ

Гидролиз сахарозы под действием  $\beta$ -фруктофуранозидазы из *Aspergillus awamori* 16 при 30° С осуществляется по закону мономолекулярной реакции. При температурах 40 и 50° С реакция сначала идет по первому порядку, но в дальнейшем процесс гидролиза переходит на второй порядок и основное время идет по законам реакции второго порядка.

Полученные константы скорости гидролиза при различных температурах и концентрациях фермента, температурные коэффициенты и величина энергии активации этой реакции позволяют рекомендовать применение грибной  $\beta$ -фруктофуранозидазы в производстве спирта из мелассы и в кондитерской промышленности.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диксон М., Уэббе. Ферменты. М., ИЛ., 1961, 728 с.
2. Добролинская Г. М., Серова Ю. 3. Биосинтез  $\beta$ -фруктофуранозидазы грибами из рода *Aspergillus*.— «Прикладная биохимия и микробиология», 1974, т. X, вып. 5, с. 717-720.
3. Курс физической химии. М., «Химия», 1966, 547 с. Авт.: Я. И. Герасимова, В. А. Древинг, Е. Н. Еремин и др.
4. Мендельсон Л. Н. Разработка технологии получения из пивных дрожжей комплексного ферментного препарата для хлебопекарной и кондитерской промышленности. Автореферат на соискание кандидатской диссертации. Киев, 1971, с. 25.
5. Фичини Ж, Ламброзо-Бадер Дезде Ж. К. Основы физической химии. М., «Мир», 1972, с. 133—140.
6. Britt V. Studies on yeast  $\beta$ -fructofuranosidase (invertase). «Arkiv Kenu», 1970, v. 31, № 6, p. 555—563.

7. Gascon S., Neumann N. P., Zampen J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. «J. Biol. Chem.», 1968, v. 243, № 7, p. 1573—1577.

8. Myrbäck K. «The Enzymes», Academic Press, New York, 1960, v. 4, № 4, p. 379