



УДК 577.156; 577.150.3

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОРБИРОВАННОГО  
НА АНИОНТАХ МОДИФИЦИРОВАННОГО  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА \**Янушаускайте В. Б., Козлов Л. В., Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Получен  $\alpha$ -химотрипсин, модифицированный хлортриазиновым красителем — активным ярко-оранжевым КХ и сорбированный на DEAE-целлюлозе и амберлите CG-400. Исследована pH-зависимость гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина сорбированным ферментом и сделаны выводы о влиянии заряженных групп матрицы носителя на кинетические свойства фермента. Изучены каталитические свойства ферментных колонок, содержащих иммобилизованный адсорбцией модифицированный  $\alpha$ -химотрипсин, в отношении гидролиза синтетического субстрата — *n*-нитроанилида *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина, белка — казеина и свертывания молока в процессах непрерывного гидролиза на колонках.

Ранее [1, 2] мы описали получение  $\alpha$ -химотрипсина, модифицированного хлортриазиновым красителем — активным ярко-оранжевым КХ—ТС-химотрипсина. ТС-химотрипсин содержит три сульфогруппы, принадлежащие молекуле красителя, и обладает способностью достаточно прочно сорбироваться на анионитах. Способность катализировать реакции гидролиза низко- и высокомолекулярных субстратов в условиях «реактора с перемешиванием» была нами исследована в работе [2]. В технологическом отношении наиболее удобно осуществлять процесс непрерывно с использованием ферментных колонок. При этом не должно происходить, во-первых, падения активности фермента в результате десорбции, ингибирования субстратом или продуктом, пространственного блокирования вследствие изменения физических характеристик системы и, во-вторых, сорбции на матрице субстрата или продукта реакции, поскольку адсорбция может привести к уменьшению выхода продукта или к пространственному блокированию катализатора.

В связи с тем, что матрица носителя во всех препаратах сорбированного ТС-химотрипсина несет положительный заряд, а сам фермент фиксирован путем нековалентной сорбции, возможно нарушение обоих указанных требований. Кроме того, положительно заряженная матрица может влиять на ферментативные свойства самого сорбированного белка. Поэтому было целесообразно изучить кинетические свойства сорбированного ТС-химо-

\* Сокращения: ТС-химотрипсин —  $\alpha$ -химотрипсин, модифицированный молекулой красителя, содержащей три сульфогруппы, АТЭЭ — этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина, СФНА — *n*-нитроанилид *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина.

Кинетические константы гидролиза АТЭЭ ТС-химотрипсином, сорбированным на амберлите CG-400 I, (3,85 мг препарата на 1 мк раствора) при 25°

pH	(S), мМ	V, мкМ·с <sup>-1</sup>	K <sub>m</sub> (каж), мМ	V·10 <sup>3</sup> /K <sub>m</sub> (каж), с <sup>-1</sup>
5,5	1,01—2,23 (4) *	0,69±0,02	1,92±0,42	0,36±0,08
6,1	0,61—4,07 (4)	2,12±0,26	2,28±0,31	0,93±0,05
7,0	0,61—2,23 (7)	6,20±0,94	3,05±0,49	2,03±0,10
8,0	1,04—2,87 (6)	6,77±1,40	3,26±0,75	2,08±0,20
8,5	0,61—2,64 (7)	7,70±1,27	3,00±0,52	2,56±0,15
9,0	0,61—2,64 (5)	4,90±0,58	4,31±0,53	1,14±0,03
9,4	1,42—3,86 (5)	3,33±0,40	6,26±0,08	0,53±0,02
10,0	1,17—4,06 (5)	1,23±0,03	4,44±0,10	0,28±0,03

\* В скобках указано количество опытов с различными концентрациями субстрата.

трипсина в широком диапазоне pH в условиях «реактора с перемешиванием», а также исследовать гидролитическую, казеинополитическую и молокоосвертывающую активности ферментных колонок с ТС-химотрипсином, сорбированным на анионитах.

Как было показано в работе [1], с введением в молекулу фермента трех сульфогрупп несколько изменяются каталитические свойства ТС-химотрипсина по сравнению с α-химотрипсином. Изменяется характер pH-зависимости каталитической константы  $k_{кат}$  и кажущейся константы Михаэлиса  $K_{m(каж)}$  для реакции гидролиза АТЭЭ, что выражается в постоянстве  $K_{m(каж)}$  во всей области исследованных pH (6—10) и в смещении по сравнению с исходным α-химотрипсином значения  $pK_a$  ионизации имидазола гистидина-57. Величина  $pK_a$  гистидина-57, определяемая из pH-зависимости  $k_{кат}$  для ТС-химотрипсина, равна 7,25, а для α-химотрипсина — 6,74 [3].

Сорбция ТС-химотрипсина на анионитах приводит к введению в микроокружение фермента положительно заряженных групп ионообменника. Из исследованных нами носителей для иммобилизации ТС-химотрипсина [2] DEAE-целлолозы DE-32, DEAE-сефадекса А-50 и амберлита CG-400, только амберлит CG-400 содержит четвертичные аммониевые основания и обладает наибольшей концентрацией заряженных групп (емкость 1,2 экв/л). Поэтому для исследования влияния зарядов матрицы на кинетические свойства фермента мы выбрали именно этот носитель. Для сорбированного фермента, как и для ТС-химотрипсина, изучали реакцию гидролиза АТЭЭ. Эту реакцию проводили в условиях «реактора с перемешиванием», т. е. при перемешивании суспензии препарата фермента в растворе субстрата в условиях pH-статирования. Величины  $V$  и  $K_{m(каж)}$  и их отношения при pH от 5,5 до 10,0 приведены в табл. 1. Характер изменения логарифмов этих величин в зависимости от pH показан на рис. 1.

Как и в случае ТС-химотрипсина  $K_{m(каж)}$  не зависит от pH. Причины неизменности  $K_{m(каж)}$ , а также появления щелочной ветви кривой зависимости  $V$  от pH рассмотрены нами ранее [1]. Здесь мы обращаем внимание лишь на значеше  $pK_a$  гистидина-57, которое в данном случае равно 6,5, что не только ниже соответствующей величины для ТС-химотрипсина, но и ниже  $pK_a$  гистидина в исходном α-химотрипсине. Сдвиг этой величины в область более низких значений pH можно объяснить влиянием положительно заряженной матрицы носителя. На основании изложенного можно сделать вывод, что положительно заряженная матрица нейтрализует влияние введенных отрицательно заряженных группировок на кинетические свойства фермента и делает иммобилизованный таким образом фермент близким по свойствам к исходному немодифицированному α-химотрипсину.

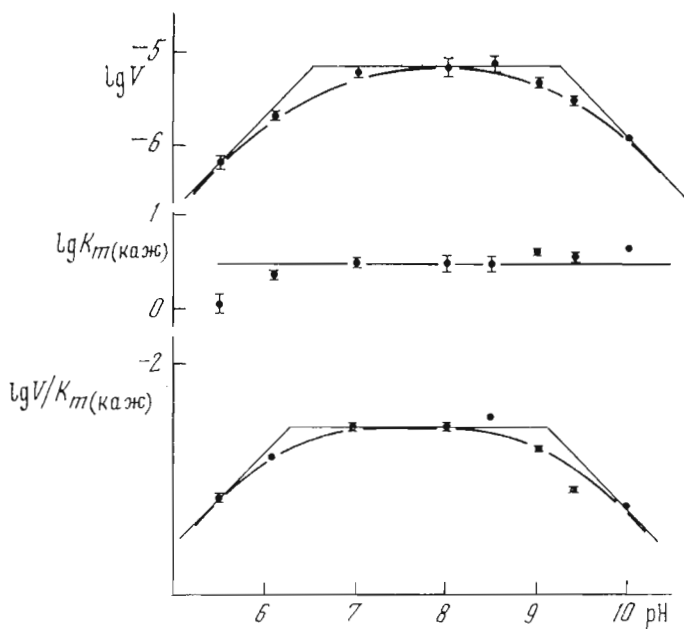


Рис. 1. Зависимость логарифмов  $V$ ,  $K_{m(\text{каж})}$  и  $V/K_{m(\text{каж})}$  при гидролизе АТЭЭ ТС-химотрипсином, адсорбированным на амберлите CG-400 I, от pH

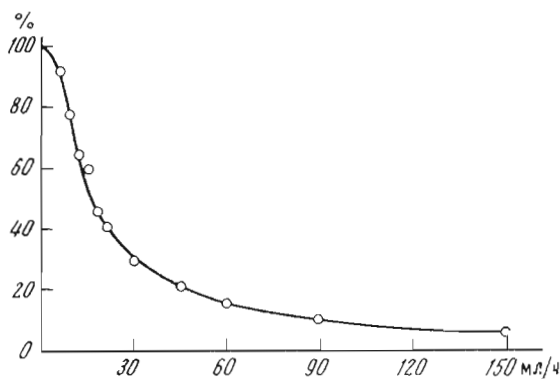


Рис. 2. Зависимость процента превращения субстрата (для концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  M) от скорости потока раствора через ферментную колонку

Для исследования гидролиза на ферментной колонке был использован хромогенный субстрат СФНА. Поскольку исходный субстрат и продукты реакции гидролиза связываются амберлитом CG-400 даже при высокой ионной силе раствора, гидролиз был изучен с использованием ферментной колонки, содержащей ТС-химотрипсин, сорбированный на DEAE-целлюлозе DE-32. Типичный результат эксперимента, проведенного при одной концентрации субстрата ( $5 \cdot 10^{-4}$  M) и для разных скоростей потока раствора субстрата через колонку показан на рис. 2.

Для расчета кинетических констант мы воспользовались интегрированным уравнением Михаэлиса -- Ментен [4]. Исходное дифференциальное уравнение имеет вид

$$\frac{dp}{dt} = \frac{k_{\text{кат}} E (s_0 - p)}{(s_0 - p) + K_m}$$

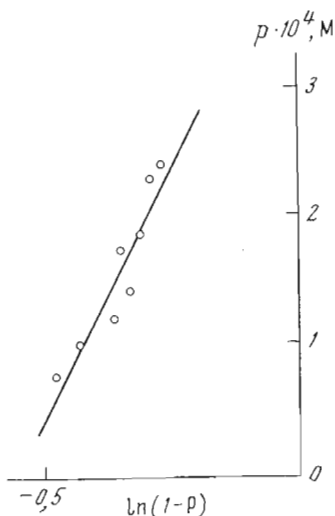


Рис. 3. Зависимость  $p$  от  $\ln(1-p)$  для одной скорости потока субстрата (в данном случае  $Q = 30$  мл/ч)

где  $E$  — концентрация фермента,  $s_0$  — исходная концентрация субстрата,  $p$  — концентрация продукта в момент времени  $t$ . После интегрирования получаем

$$\frac{1}{t} \ln \left( \frac{s_0}{s_0 - p} \right) = \frac{k_{\text{кат}}}{K_m} E - \frac{p}{t} \cdot \frac{1}{K_m}.$$

Обозначим долю субстрата, превратившегося в продукт к моменту времени  $t$ , через  $P = (s_0 - p)/s_0$ , тогда

$$p = K_m \ln(1 - P) + k_{\text{кат}} E t.$$

Время  $t$  определяется скоростью потока раствора  $Q$  и свободным объемом колонки  $V_{\text{св}} \cdot t = V_{\text{св}}/Q$ , а концентрация фермента — количеством активного иммобилизованного белка, находящегося в колонке, и свободным объемом колонки:

$$E = e/V_{\text{св}}.$$

Подставив определяемые значения  $e$  и  $Q$  вместо  $t$  и  $E$ , получим

$$p = K_m \ln(1 - P) + \frac{k_{\text{кат}} e}{Q}.$$

Произведение  $k_{\text{кат}} e$  — реакциюную емкость колонки обозначим  $C$ . Поскольку величина  $K_m$  может зависеть от скорости потока раствора субстрата ( $Q$ ) [5], то правильнее определять значения  $K_m$  и  $C$  при постоянной  $Q$ , полагая переменными  $p$  и  $\ln(1 - P)$ , найденные для разных концентраций субстрата. Для каждой скорости потока раствора субстрата были построены графики зависимости  $p$  от  $\ln(1 - P)$ , аналогичные приведенному на рис. 3. Наклон, равный  $K_m$ , и отсечение на оси ординат, равное  $C/Q$ , определяли по методу наименьших квадратов. Результаты приведены в табл. 2, а зависимости  $K_m$  и  $C$  от  $Q$  — на рис. 4.

При повышении скорости потока субстрата от 6 до 30 мл/ч наблюдается линейное увеличение как константы Михаэлиса, так и реакционной емкости колонки. Такое поведение системы может быть результатом действия диффузионных и электростатических эффектов [6]. Поскольку субстрат и носитель имеют противоположные заряды, то локальные концентрации

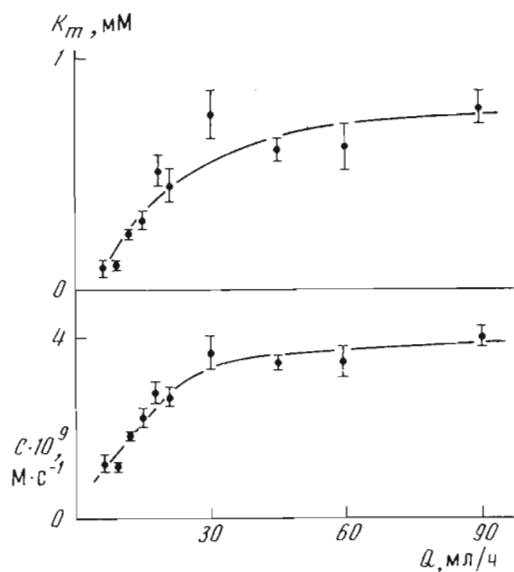


Рис. 4. Влияние скорости потока субстрата через колонку на величины  $K_m$  и  $C$

Таблица 2

Значения  $K_m$  и реакционной емкости колонки  $C$  при разных скоростях потока раствора субстрата  $Q$ 

$Q$ , мл/ч	$K_m$ , мМ	$C/Q$ , мМ	$C = k_{\text{кат}} \cdot e \cdot 10^9$ моль/с
6	$0,096 \pm 0,045$	$0,0733 \pm 0,129$	$1,22 \pm 0,22$
9	$0,112 \pm 0,015$	$0,475 \pm 0,031$	$1,19 \pm 0,08$
12	$0,242 \pm 0,011$	$0,573 \pm 0,015$	$1,91 \pm 0,05$
15	$0,306 \pm 0,047$	$0,538 \pm 0,048$	$2,24 \pm 0,20$
18	$0,525 \pm 0,077$	$0,550 \pm 0,050$	$2,75 \pm 0,25$
21	$0,463 \pm 0,077$	$0,448 \pm 0,044$	$2,61 \pm 0,25$
30	$0,772 \pm 0,126$	$0,435 \pm 0,045$	$3,63 \pm 0,38$
45	$0,602 \pm 0,042$	$0,272 \pm 0,011$	$3,40 \pm 0,14$
60	$0,614 \pm 0,104$	$0,204 \pm 0,018$	$3,40 \pm 0,31$
90	$0,797 \pm 0,072$	$0,159 \pm 0,009$	$3,98 \pm 0,22$

субстрата и ионов водорода в микроокружении могут быть отличны от соответствующих концентраций в растворе, что обусловлено возникновением диффузного двойного электрического слоя (слоя Гуи). Повышение концентрации субстрата вблизи фермента по сравнению с принимаемой в расчет концентрацией в растворе приводит к занижению значения измеряемой величины константы Михаэлиса. При повышении скорости потока субстрата уменьшается толщина диффузионного слоя, что может приводить к приближению  $K_m$  к ее истинному значению и изменению рН микроокружения. Последнее должно отражаться на изменении реакционной емкости колонки. Если принять количество фермента в колонке равным  $1,27 \cdot 10^{-7}$  моль, то при скорости 90 мл/ч,  $k_{\text{кат}} = 0,031 \pm 0,001 \text{ с}^{-1}$  и  $K_m = 0,80 \pm 0,07 \text{ мМ}$ , что находится в пределах разумных величин: для  $\alpha$ -химотрипсина при рН 7,0 для гидролиза СФНА  $k_{\text{кат}} = 0,08 \pm 0,01 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_m = 1,1 \pm 0,2 \text{ мМ}$  [7].

Возможность проведения гидролиза белкового субстрата (казеина) на ферментной колошке была исследована на аналогичном образце ТС-химотрипсина, сорбированного на DEAE-целлюлозе DE-32. Результаты экспериментов представлены на рис. 5 в виде зависимости количества прогидролизованного белка, которому соответствует величина оптической плотности раствора при 280 нм, отложенная на оси ординат, от скорости потока субстрата.

Осуществить непрерывное свертывание молока на колонке с ТС-химотрипсином, сорбированным на DEAE-целлюлозе, не удалось из-за сильной сорбции молока этим носителем. Более пригодным оказался препарат ТС-химотрипсина, сорбированного на амберлите CG-400. Разбавленный раствор молока пропускали через ферментную колонку при  $5^\circ$  (при этом осуществлялась стадия протеолиза казеина молока), добавляли в него хлористый кальций, нагревали до  $37^\circ$  и следили за образованием хлопьев. Таким образом удалось провести свертывание 40 мл молока со скоростью пропускания раствора через колонку 13 мл/ч и со временем свертывания после нагревания 35 с. После этого время свертывания стало возрастать и достигло десятков минут. После промывания ферментной колонки 1 М NaCl активность колонки восстановилась. При пропускании с прежней скоростью удалось провести свертывание еще 20 мл разбавленного молока (со временем свертывания  $\sim 35$  с). Такое же инактивирование ферментной колонки с последующей реактивацией наблюдали Феррье и др. [8] при попытке свертывать молоко с помощью пепсина, иммобилизованного на стекле.

Инактивированный препарат фермента оставался тем не менее активным в отношении гидролиза низкомолекулярного субстрата — АТЭЭ. Кроме того, при реактивации пропусканием 1 М раствора NaCl с колонки смывается белок (судя по поглощению света при 280 нм). Амберлит CG-400 без фермента в тех же условиях при пропускании разбавленного молока по-

степенно насыщается белком, элюируемым 1 М NaCl. На основании этих данных был сделан вывод, что инактивация ферментной колонки происходит не вследствие десорбции фермента или его ингибирования субстратом или продуктами протеолиза казеина молока, а в результате адсорбции на смоле белка, создающего пространственные препятствия для доступа субстрата к молекулам активного фермента.

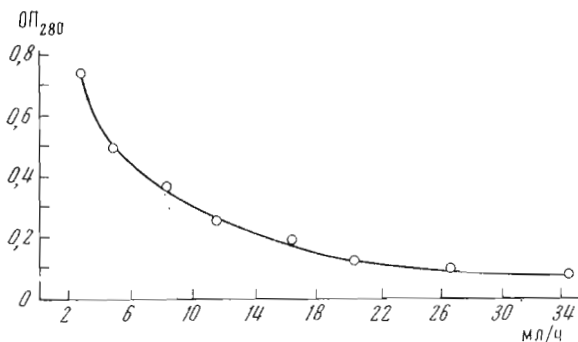


Рис. 5. Зависимость степени гидролиза казеина от скорости потока субстрата через колонку с ферментом

Полученные результаты свидетельствуют о том, что заряженные группы носителя не оказывают существенного влияния на каталитические свойства сорбированного белка. Однако для того чтобы избежать сорбции субстрата или продуктов реакции на носителе, следует уделять внимание выбору носителя для каждого используемого субстрата. Это, по-видимому, основное неудобство при применении заряженных носителей.

### Экспериментальная часть

ТС-Химотрипсин получали по методу, описанному в работе [1]; препараты ТС-химотрипсина, сорбированного на амберлите CG-400 I, DEAE-целлюлозе DE-32 — по методу работы [2] и СФНА — по методу [9].

Зависимость скорости гидролиза АТЭЭ ТС-химотрипсином, сорбированным на амберлите CG-400, от pH изучали в условиях «реактора с перемешиванием» на pH-стате при pH 5,5—10,0 с концентрациями субстрата от 0,61 до 4,07 мМ и 3,85 мг иммобилизованного фермента на 1 мл раствора при 25°. Величины  $V$  и  $K_m$  (наж) рассчитывали по методу Лайнуивера — Берка.

Исследование гидролиза СФНА на колонке, содержащей ТС-химотрипсин, сорбированный на DEAE-целлюлозе, проводили на установке, изображенной на рис. 6. Раствор субстрата с концентрацией от 0,1 до 1 мМ в 0,2 М трис-буфере (pH 8,6), содержащем 6% диметилформамида и 1 М NaCl, пропускали через термостатированную при 25° колонку (1××4,5 см), содержащую 3,2 мл препарата фермента. Сухой вес препарата фермента составлял 0,5 г, а удельная активность — 6,6 мг/г (по АТЭЭ). Скорость потока раствора субстрата через колонку — от 6 до 90 мл/ч. При каждой скорости после установления стационарного режима определяли по цифровому вольтметру процент светопропускания при 405 нм. Величину оптической плотности раствора рассчитывали. Величина разности молярных экстинкций  $\Delta\epsilon$  для субстрата (СФНА) и продукта гидролиза (*n*-нитроанилина) для проточной кюветы прибора (ширина кюветы ~3 мм) была равна 4364.

Гидролиз казеина на ферментной колонке исследовали, пропуская 1%-ный раствор казеина в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,6), содержащем 0,8 М NaCl, через термостатированную при 25° колонку с ТС-химотрипси-

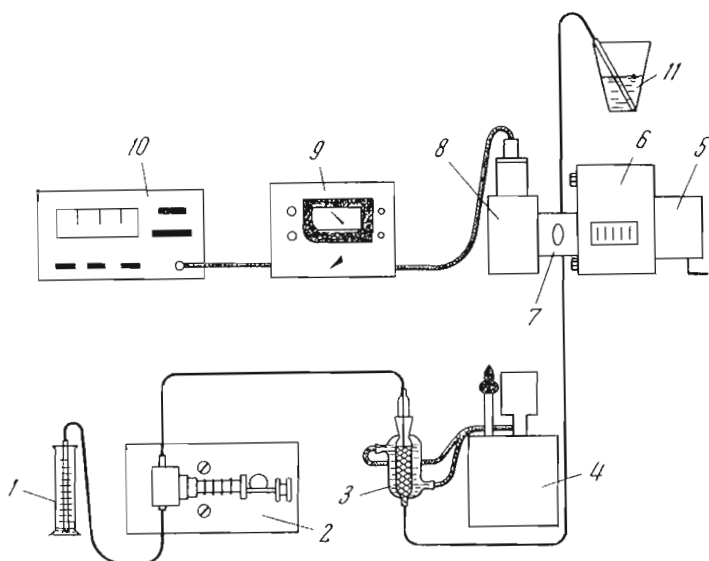


Рис. 6. Установка для изучения кинетики реакции на ферментной колонке: 1 — раствор субстрата реакции, 2 — насос, 3 — колонка с иммобилизованным ферментом, 4 — термостат, 5 — источник света, 6 — монохроматор, 7 — проточная кювета, 8 — фотоэлектрический датчик, 9 — электрометрический усилитель, 10 — цифровой вольтметр, 11 — раствор смеси продукта и субстрата реакции после выхода из колонки

ном на DEAE-целлюлозе (1,24 мг активного фермента) со скоростью от 2,5 до 34 мл/ч. После этого раствор собирали фракциями и определяли количество гидролизованного казеина по поглощению при 280 нм после осаждения белка трихлоруксусной кислотой.

Свертывание молока проводили, пропуская через колонку, содержащую 6,8 мл амберлита CG-400 I с сорбированным ТС-химотрипсином и термостатированную при 5°, 0,5%-ный раствор лиофилизованного обезжиренного молока в 0,01 M малеинатном буфере (pH 6,7) со скоростью 13 мл/ч. Раствор собирали порциями по 3 мл, к каждой порции добавляли по 0,1 мл 0,3 M CaCl<sub>2</sub>, нагревали до 37° в термостате и следили за образованием хлопьев.

Все кинетические расчеты проводили по методу наименьших квадратов на ЭВМ «Наири-2».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Янушаускайте В. Б., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) Биохимия, 39, 446–453.
2. Янушаускайте В. Б., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) Прикл. биохимия и микробиол., 10, 410–414.
3. Bender M. L., Clement G. E., Kézdy F. J., Heck H. d'A. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3680–3690.
4. Bar-Eli A., Katchalski E. (1963) J. Biol. Chem., 238, 1690–1698.
5. Lilly M. D., Hornby W. E., Crook E. M. (1966) Biochem. J., 100, 718–723.
6. Shuler M. L., Aris R., Tsuchiya H. M. (1972) J. Theor. Biol., 35, 67–76.
7. Antonov V. K., Kozlov L. V., Smirnov P. N., Djachenko E. D., Surjvtzev V. I. (1970) Anal Biochem., 37, 160–168.
8. Ferrier L. K., Richardson F., Olson N. F. (1971) J. Dairy Sci., 54, 762.
9. Nagel W., Willig F., Peschke W., Schmidt F. H. (1965) Z. phys. Chem., 340, 1–10.

Поступила в редакцию  
27.VI.1974

CATALYTIC PROPERTIES OF MODIFIED  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN  
ADSORBED ON ANION EXCHANGERS

V. B. JANUSHAUSKAITE, L. V. KOZLOV, V. K. ANTONOV

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

$\alpha$ -Chymotrypsin modified with a procion dye was adsorbed on the DEAE-cellulose and the Amberlite CG-400. pH-Dependence of the hydrolysis of N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester was examined and conclusions about the influence of matrix charged groups on enzyme kinetic properties were made. The catalytic properties of columns with immobilized chymotrypsin were investigated in hydrolysis of synthetic substrate N-succinyl-L-phenylalanine *p*-nitroanilide, and also in cleavage of casein and milk clotting in continuous processes.

---