



УДК 577.154.3; 577.150.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ЛИЗОЦИМА

*Черкасов И. А., Кравченко Н. А., Павловский П. Е.
Врагина Л. П.*

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР,
Московский технологический институт мясной и молочной промышленности*

Исследована ферментативная активность лизоцима белка куриных яиц, ковалентно и избирательно связанного с биогелем Р-60 по остатку гистидина-15. Найдено, что при гидролизе низкомолекулярного растворимого субстрата — хитопентаозы иммобилизованный лизоцим, в основном, сохраняет особенности действия нативного фермента, однако проявляет повышенную термостабильность (температура перехода 92–93°) и ингибируется солями в концентрациях более 0,3 М. Солевое ингибирование связано, по-видимому, с синерезисом геля, несущего лизоцим, что затрудняет диффузию субстрата и продуктов гидролиза между фазой геля и раствором. Удельная активность иммобилизованного лизоцима составляет ~30% активности нативного фермента. Определены термодинамические параметры тепловой денатурации иммобилизованного лизоцима. Они согласуются с данными для нативного лизоцима, откуда следует, что матрица носителя не оказывает существенного влияния на состояние его молекулы. Показано, что иммобилизованный лизоцим не обладает заметной бактериолитической активностью, хотя специфически сорбирует микробные клетки, образуя фермент-субстратный комплекс с полисахаридом клеточной стенки; эта особенность связана, по-видимому, с малым количеством лизоцима, доступного для микробных клеток, ввиду его преимущественного нахождения в порах носителя.

В последнее время актуальными проблемами энзимологии являются получение, изучение свойств и практическое применение иммобилизованных ферментов [1–3]. Методические подходы, применявшиеся для иммобилизации до настоящего времени, не предусматривали структурной направленности и избирательности присоединения фермента к носителю, вследствие чего получавшиеся препараты иммобилизованных ферментов были не однородными как по структуре, так и по активности. Ранее нами на примере лизоцима (КФ 3.2.1.17) впервые было проведено избирательное присоединение фермента к носителю по остатку гистидина-15, который удален от активной области лизоцима и блокировка которого не снижает ферментативной активности [4].

В данной работе исследовано влияние условий среды на активность избирательно иммобилизованного лизоцима по отношению к растворимому низкомолекулярному субстрату, хитопентаозе, а также проведена оценка бактериолитической активности фермента. Полученные результаты сопоставлены с данными для нативного лизоцима с целью выяснения влияния иммобилизации на свойства фермента.

Как известно, ферментативная активность лизоцима, помимо лизиса микробных клеток, проявляется в гидролизе олигомеров N-ацетилглюкозамина — фрагментов хитина. Последние субстраты более пригодны для ха-

рактические функциональные свойства иммобилизованного лизоцима, поскольку они как низкомолекулярные растворимые вещества, легче диффундируют в растворе и проникают в поры биогеля, содержащие связанный лизоцим. В связи с этим нами была исследована гидролитическая активность иммобилизованного лизоцима в отношении хитопентаозы.

На рис. 1 приведена зависимость активности от ионной силы среды. При нулевой ионной силе (в дистиллированной воде) иммобилизованный лизоцим неактивен и с ростом ионной силы до 0,3 его активность интенсивно нарастает, как и у нативного лизоцима [5]. Однако при дальнейшем повышении ионной силы активность плавно снижается, имея тенденцию к выходу на плато с остаточной величиной ~35% при ионной силе 1,35.

В случае нативного лизоцима подобного ингибирования гидролиза не наблюдалось ни для хитотетраозы [5], ни для хитопентаозы. Отсюда следует, что отмеченное ингибирование обусловлено косвенными причинами, связанными с иммобилизацией фермента на носителе.

Наиболее вероятная причина солевого ингибирования состоит в том, что с ростом ионной силы в результате экранирования ионами солей электростатического отталкивания одноименно заряженных молекул белка происходит синерезис геля, несущего лизоцим. Так, у испытанного нами препарата при переходе от дистиллированной воды к 1 М раствору хлористого натрия объем геля уменьшался в 5 раз. Ввиду сжатия и уплотнения несущего лизоцим геля, по-видимому, затрудняется диффузия субстрата к ферменту, а также диффузия продуктов гидролиза из геля в раствор. В результате этого активность иммобилизованного лизоцима, измеряемая по приросту восстанавливающей силы раствора, оказывается сниженной.

Следует отметить, что поскольку синерезис под действием солей обусловлен свойствами фермента как полиэлектролита, то проявление связанного с ним ингибирования ферментативной реакции следует ожидать у всех ферментов, иммобилизованных на жестких пористых носителях. При этом размер эффекта для заданного типа носителя должен зависеть как от ионной силы, так и от соотношения изоэлектрической точки фермента и рН среды.

Еще одна причина солевого ингибирования, характерная для иммобилизованного лизоцима, может состоять в том, что с ростом ионной силы возрастает прочность его связывания с субстратом [6] и, по-видимому, также с конкурентными ингибиторами — продуктами гидролиза. В том случае, когда лизоцим фиксирован в порах нерастворимого носителя, рост ионной силы должен приводить к концентрированию субстрата и продуктов в нерастворимой фазе и соответственно к снижению их содержания в растворе, что при принятом нами способе определения активности (см. «Экспериментальную часть») проявляется как ингибирование. Однако в испытанных условиях при исходном соотношении фермент/субстрат (близко 1 : 10) и стехиометрии связывания (1 : 1) вклад в ингибирование за счет этого эффекта не может превысить 10%.

На рис. 2 приведена зависимость активности иммобилизованного лизоцима от рН среды при оптимальной ионной силе 0,3. Иммобилизация не изменила характера зависимости активности лизоцима от рН: активность

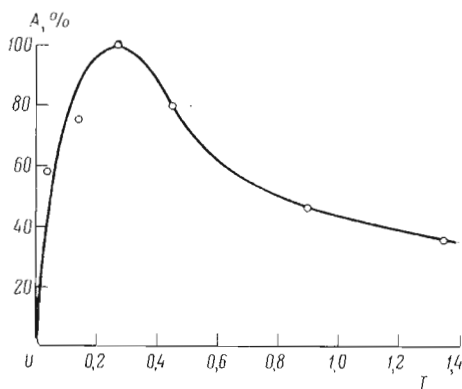


Рис. 1. Зависимость активности иммобилизованного лизоцима от ионной силы I . Ацетатная буферная система с добавкой NaCl (рН 4,6; 50°)

имеет оптимум при рН 4,2—4,7, что удовлетворительно согласуется с имеющимися для хитиновых субстратов многочисленными данными, охватывающими область рН от 3,5 до 5,5. Характерное «плечо» на рис. 2 в области рН 5,5—6,5, по-видимому, отражает корреляцию активности с особенностями влияния рН на образование фермент-субстратного комплекса [6]. Следует, однако, отметить, что подобное плечо при гидролизе хитотетразой не наблюдали [5].

На рис. 3 представлена зависимость активности иммобилизованного лизоцима от температуры при оптимальных значениях рН 4,6 и ионной силы 0,3. Общий характер зависимости активности лизоцима от температуры в результате иммобилизации не изменился. Однако в отличие от нативного лизоцима, имеющего при данной ионной силе температурный оптимум при 60—70° [5], иммобилизованный лизоцим имеет оптимум активности при 75—80°. Таким образом, иммобилизация привела к некоторому повышению термостабильности лизоцима, что характерно и для ряда других иммобилизованных ферментов [1—3].

Располагая данными по тепловой инактивации иммобилизованного лизоцима, мы попытались оценить структурно-энергетические характеристики его молекулы с тем, чтобы выяснить степень ее взаимодействия с матрицей носителя. Если исходить из того, что процесс тепловой денатурации лизоцима обратим и включает два состояния белка — нативное и денатурированное, т. е. имеет место равновесие типа $A \rightleftharpoons B$, [7, 8], то по величинам остаточной активности при 90 и 95° можно приблизительно оценить термодинамические параметры его денатурации. Если построить график, аналогичный изображенному на рис. 3, но приняв за 100% максимальную активность при 80°, то оказывается, что температура денатурационного перехода лежит в середине рассматриваемого интервала, где $K=1$ и $\Delta F=0$, т. е. при 92—93°. Величина константы денатурационного равновесия K при температурах 90 и 95° составляет соответственно 0,64 и 3,76, что, согласно стандартному расчету, дает величину энтальпии тепловой денатурации ΔH , равную 117 ккал/моль, и $\Delta S=320$ э.е. По данным Дельбена и Крепшенцы [9] для нативного лизоцима в сравнимых условиях (0,1 М фосфатный буфер, рН 5,4) величина ΔH равна 123 ккал/моль, $\Delta S=351$ э.е. Наканиси и соавт. [10] приводят сходные данные: $\Delta H=127$ ккал/моль, $\Delta S=364$ э.е. (условия: 0,1 М фосфатный буфер, рН 5,6). Следует отметить, что при снижении рН величина энтальпии тепловой денатурации лизоцима снижается; так, при рН 3,3 она равна 73,5 ккал/моль [8], а при рН 2,2—2,4—66 ккал/моль [7]. Учитывая различия в условиях и методах определения (определение проводилось при рН 4,6), можно считать, что термодинамические параметры тепловой денатурации нативного и иммобилизованного лизоцима удовлетворительно согласуются между собой. Отсюда следует, что при иммобилизации лизоцима по предложенному нами способу [4] структурно-энергетические свойства его молекулы существенно не изменяются, т. е. матрица носителя не оказывает заметного влияния на ее состояние. В связи с этим повышение температуры перехода иммобилизованного лизоцима до 92—93° по сравнению с 78° у нативного [11] не находит какого-либо объяснения. В работе [1] описаны случаи как повышения, так и снижения термостабильности при иммобилизации, однако теоретические основы количественного прогнозирования данного эффекта отсутствуют.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что иммобилизованный лизоцим сохраняет основные функциональные и структурно-энергетические свойства нативного фермента. Активность иммобилизованного лизоцима в стандартных условиях (см. «Экспериментальную часть») составляет ~30% активности нативного фермента. Согласно данным работы [1], такая величина остаточной активности наблюдается при наиболее эффективном способе ковалентной иммобилизации ферментов. Этот факт согласуется с исходными посылками для иммобилизации лизоцима принятым способом [4]. Само же по себе снижение активности до 30%

обусловлено скорее всего диффузионными затруднениями при взаимном сближении фермента и субстрата [1].

Далее мы попытались оценить бактериолитическую активность иммобилизованного лизоцима. Применяя турбидиметрический метод, мы обнаружили, что при перемешивании суспензии микробных клеток с иммобилизованным лизоцимом наблюдается снижение ее мутности. В опытах с микробными клетками, окрашенными ремазолем ярко-синим, также происходило снижение мутности суспензии, однако при этом наблюдался переход окраски в фазу биогеля, содержащего лизоцим. Характерно, что снижение мутности происходило лишь в буферной среде, но не наблюдалось

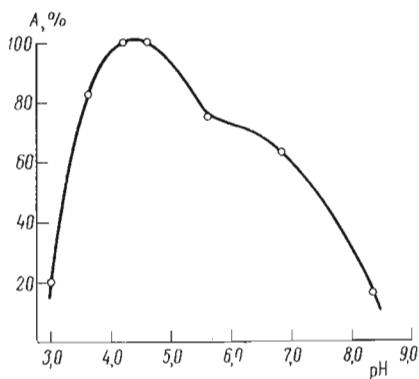


Рис. 2. Зависимость активности иммобилизованного лизоцима от pH (pH 3,0–6,85–0,2 М ацетатный, pH 8,35–0,15 М бикарбонатный буферные растворы с добавкой NaCl; I 0,3; 50°)

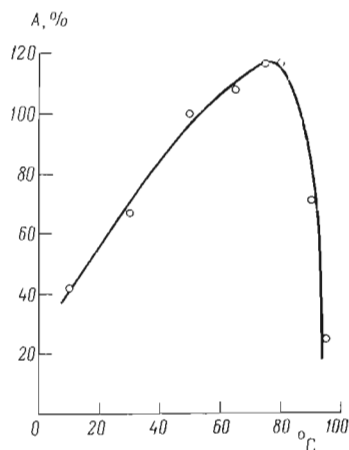


Рис. 3. Зависимость активности иммобилизованного лизоцима от температуры (0,2 М ацетатный буфер с добавкой NaCl, pH 4,6, I 0,3)

в дистиллированной воде, т. е. в отсутствие солей. Поскольку известно, что присутствие солей необходимо для образования комплекса лизоцима с субстратом [6], можно сделать вывод, что иммобилизованный лизоцим сорбирует на себе микробные клетки, образуя фермент-субстратный комплекс с полисахаридом клеточной стенки.

Результаты опытов с окрашенными микробными клетками указывали на то, что снижение мутности суспензии нельзя однозначно рассматривать как проявление литической активности иммобилизованного лизоцима, поскольку в ходе лизиса следовало ожидать перехода окрашенных продуктов в раствор. Для более объективной оценки литической активности мы использовали фотометрический метод, основанный на измерении нарастания оптической плотности реакционной смеси при 260 нм. Поглощение в этой области спектра создается веществами нуклеиновой природы, поступающими в раствор из цитоплазмы клетки после ее распада [12]. Применяя этот метод, мы не обнаружили сколько-нибудь заметной литической активности у иммобилизованного лизоцима при содержании до 10 мг препарата (1000 мкг лизоцима) в пробе и времени инкубации до 2 ч. В случае же нативного лизоцима отчетливый эффект лизиса проявляется при содержании 6–8 мкг препарата в пробе и времени инкубации 30–60 мин (прирост оптической плотности — соответственно от 0,06 до 0,135).

Таким образом, несмотря на специфическое связывание микробных клеток с иммобилизованным лизоцимом, их лизиса не происходит, либо он крайне замедлен. Наиболее вероятная причина этого состоит, по-видимому, в том, что основная часть лизоцима сосредоточена в относительно небольших порках биогеля Р-60 и недоступна для микробных клеток. Если же

учесть, что для лизиса необходимы многократные акты гидролиза полисахарида клеточной стенки, то отсутствие литической активности у испытанного препарата иммобилизованного лизоцима становится вполне понятным. В то же время относительно небольшое количество лизоцима, находящееся на поверхности зерен биогеля, достаточно для заметной сорбции клеток.

В связи с полученными данными вопрос о возможности использования препаратов иммобилизованного лизоцима в качестве антибактериальных средств пролонгированного действия требует дальнейшего исследования в плане подбора подходящего носителя.

Экспериментальная часть

Препараты лизоцима. В опытах использовали трижды перекристаллизованный лизоцим, полученный из белка куриных яиц методом прямой кристаллизации [13]. Для освобождения от солей его пропускали через колонку с сефадексом G-25 в 1 М уксусной кислоте и лиофилизировали. Лизоцим иммобилизовали, как описано ранее [4], ковалентным присоединением к полиакриламидному носителю (биогелю Р-60) избирательно по остатку гистидина-15 через промежуточный ацетамидэтиламидный мостик. Опыты проводили с лиофильно высушенным препаратом, содержащим 10% по весу лизоцима.

Препараты субстратов. Хитопентаозу получили по методике, аналогичной для получения хитотетраозы [5]. В качестве бактериального субстрата использовали ацетоновый порошок клеток *Micrococcus lysodeikticus* производства Олайнского завода химреактивов. Перед употреблением микробные клетки (1 г) экстрагировали водой (2×100 мл) путем размешивания их суспензии магнитной мешалкой с последующим центрифугированием. Экстрагированные клетки лиофильно высушивали; выход — около 620 мг. Микробные клетки, окрашенные ремазолом ярко-синим, получали по методике, описанной для эластина [14]. Измерение рН проводили на потенциометре ЛПУ-01 при 20°.

Определение ферментативной активности. Активность препаратов лизоцима при гидролизе хитопентаозы определяли по приросту восстанавливающей силы реакционной смеси, используя метод Парка и Джонсона [15]. Гидролиз проводили в термостатированном ($\pm 0,1^\circ$) сосуде, снабженном магнитной мешалкой. Реакционная смесь общим объемом 10 мл содержала 1 мг хитопентаозы и 1 мг лизоцима, в случае иммобилизованного лизоцима — 10 мг препарата. Смесь инкубировали 1 ч в заданных условиях среды (рН, ионная сила, температура), отбирая аликвоты по 0,2 мл. Для определения исходного фона восстанавливающей силы раствора отбирали аликвоту также до внесения фермента в реакционную смесь. За стандартные условия были приняты следующие: 0,2 М ацетатный буфер (рН 4,6) с добавкой 0,1 М хлорида натрия при 50° и времени инкубации 1 ч. Активность (в тех или иных условиях среды) выражали в процентах к активности в стандартных условиях. Точки на графиках (рис. 1–3) соответствуют усредненным экспериментальным значениям.

Бактериолитическую активность препаратов лизоцима определяли по приросту оптической плотности при 260 нм в надосадочной жидкости, полученной центрифугированием реакционной смеси. Стандартные условия лизиса: 0,02%-ная суспензия микробных клеток в 1/15 М натрий-фосфатном буфере (рН 6,2), 22°, объем пробы 7 мл; содержание лизоцима в пробах и время инкубации варьировали. Для сравнительной оценки литической активности использовали также турбидиметрический метод; лизис проводили в тех же условиях, измеряя снижение оптической плотности реакционной смеси при 570 нм.

Термодинамические определения. Термодинамические параметры тепловой денатурации иммобилизованного лизоцима определяли по значениям величин остаточной активности при 90 и 95°. Активность определяли по

гидролизу хитопентаозы при рН 4,6 и ионной силе 0,3 (см. выше), принимая за 100% максимальную активность при 80°. Кажущуюся константу денатурационного равновесия K находили по формуле $K=(100-A)/A$, отражающей соотношение денатурированной и нативной форм, где A — остаточная активность при заданной температуре. Остальные параметры рассчитывали по формулам: $\Delta F=-RT \ln K$, $\Delta H=-4,575 \cdot \Delta(\lg K)/\Delta(1/T)$, $\Delta S=\Delta H/T^*$, где T^* — температура денатурационного перехода (полуинактивации) [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кестнер А. И., Крезн М. И. (1973) Производство и применение иммобилизованных ферментов, ЭстНИИНТИ, Таллин.
2. Gryskiewicz J. (1971) *Folia biol.*, **19**, 119–150.
3. Melrose G. J. H. (1971) *Revs. Pure and Appl. Chem.*, **21**, 83–119.
4. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1972) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2374.
5. Кравченко Н. А., Кузнецов Ю. Д. (1967) Молекулярн. биология, **1**, 498–510.
6. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1967) Молекулярн. биология, **1**, 381–390.
7. Sophianopoulos A. J., Weiss B. J. (1964) *Biochemistry*, **3**, 1920–1928.
8. McDonald C. C., Phillips W. D., Glickson J. D. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 235–246.
9. Delben F., Crescenzi V. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **194**, 615–618.
10. Nakanishi M., Tsuboi M., Ikegama A. (1973) *J. Mol. Biol.*, **75**, 673–682.
11. Foss J. G. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, **43**, 300–310.
12. Поуз Э. (1971) Химическая микробиология, «Мир», М., стр. 46.
13. Alderton G., Fevold H. L. (1946) *J. Biol. Chem.*, **164**, 1–5.
14. Rinderknecht H., Geokas M. C., Silverman P., Lillard Y., Haverback B. J. (1968) *Clin. chim. acta*, **19**, 327–339.
15. Park J. T., Johnson M. J. (1949) *J. Biol. Chem.*, **181**, 149–151.
16. Жолн М. (1968) Физическая химия денатурации белков, «Мир», М., стр. 212.

Поступила в редакцию
2.VIII.1974

STUDY ON THE ENZYMIC PROPERTIES OF IMMOBILIZED LYSOZYME

I. A. CHERKASOV, N. A. KRAVCHENKO, P. E. PAVLOVSKY, L. P. BRAGHINA

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow and Technological Institute
of Meat and Milk Industry, Moscow*

The activity of hen egg white lysozyme covalently bound to Biogel P-60 via His-15 residue was studied using chitopentaose as a substrate. As compared to native lysozyme, the immobilized enzyme reveals higher thermostability (transition temperature 92–93°) and is inhibited by increased salt concentrations (over 0.3 M). The inhibition might be accounted for by syneresis of the enzyme containing gel, which limits substrate and/or products diffusion between gel and solution phases. The immobilized lysozyme does not possess any appreciable bacteriolytic activity; however, it binds specifically bacterial cells forming an enzyme-substrate complex.