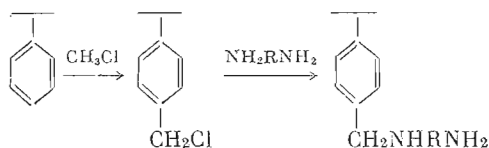


ИММОБИЛИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ
НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СТИРОЛДИВИНИЛБЕНЗОЛЬНЫХ
МАТРИЦАХТорчилин В. П., Литвак Ж. М., Есина Г. Н.,
Макарова С. Б., Грязнов Г. В.Всесоюзный научно-исследовательский институт
химических реакций и особо чистых химических веществ, Москва

Изучена иммобилизация α -химотрипсина и пепсина на стиролдивинилбензолевых матрицах разной провидаемости, модифицированных этилендиамином, гексаметилендиамином, диэтилентриамином и полиэтиленимином, с использованием бифункционального реагента — глутарового альдегида. Показано, что для иммобилизации α -химотрипсина наиболее пригодны высокопроницаемые матрицы, модифицированные диэтилентриамином и полиэтиленимином; по отношению же к пепсину все испытанные носители мало пригодны. Показано, что кинетические константы гидролиза *p*-нитрофенилацетата иммобилизованным α -химотрипсином и нативным ферментом практически совпадают.

В настоящее время для иммобилизации различных ферментов широко применяют ионообменные смолы на основе различных природных и синтетических полимеров [1—3]. При этом иммобилизация может проводиться как по механизму ионообменной сорбции, так и по механизму ковалентного связывания. При использовании для иммобилизации ферментов инертных гидрофобных полимерных матриц (например, матриц на основе трехмерного сополимера стирола и дивинилбензола) в последние необходимо вводить реакционные группы, способные к взаимодействию с ферментом непосредственно или через бифункциональный реагент, в качестве которого чаще всего применяют глутаровый альдегид [4]. Длина цепи, которой реакционноспособная группа присоединена к исходной матрице («ножка»), может быть различной. Так, при модификации полистирола введением в него аминогрупп по обычной схеме:



длина метиленового радикала R может изменяться в широких пределах, к тому же он может содержать и другие реакционноспособные группы, например вторичные аминогруппы. Изучение влияния строения и длины «ножки» на процесс иммобилизации и на свойства иммобилизованного фермента представляет теоретический и практический интерес.

Таблица 1

Количество иммобилизованного активного фермента на различных носителях

Носитель	Проницаемость по <i>M</i>	Ионообменная емкость, мг-экв/г	Количество α -химотрипсина (мг/г носителя), иммобилизованного за время реакции		Количество пепсина (мг/г носителя), иммобилизованного за 24 ч реакции
			2 ч	24 ч	
(I)	До 3000	5,5—6	6	8	~1
(II)	До 3000	5,5—6	7	8	~1
(III)	До 3000	8	20	20	~1
(IV)	До 3000	1	6	6	~1
(I)	До 50000	5,5—6	50	55	Не определяли

Таблица 2

Кинетические константы гидролиза *n*-нитрофенилацетата иммобилизованным α -химотрипсином

Носитель	k_2, c^{-1}	$K_m \cdot 10^3, M$	$k_3 \cdot 10^3, c^{-1}$	Носитель	k_2, c^{-1}	$K_m \cdot 10^3, M$	$k_3 \cdot 10^3, c^{-1}$
(I)	3,5	1,1	4	(IV)	3,8	1,2	8
(II)	4,2	1,0	6	Фермент в растворе [7]	4,0	1,2	8
(III)	4,0	0,9	6				

тонируются, у α -химотрипсина при pH 7,5 протонировано лишь незначительное количество аминогрупп. При последующей отмывке препаратов иммобилизованных ферментов происходит десорбция с носителя белков, связанных ионообменно, — на носителе остается только ковалентно связанный фермент. Из вышесказанного следует, что лимитирующей стадией иммобилизации является химическая реакция альдегидных групп носителя и непротонированных аминогрупп фермента. Именно поэтому на изученных носителях независимо от их ионообменной емкости не удалось иммобилизовать заметных количеств пепсина. Иммобилизация же α -химотрипсина протекает достаточно успешно. Роль ионообменной сорбции фермента может заключаться лишь в начальном концентрировании его вблизи реакционноспособных групп носителя.

При этом не должно вызывать удивления столь резкое возрастание количества связывающегося α -химотрипсина при переходе от диамина (I), (II) к триамину (III), так как в первых двух случаях расположенный близко к матрице атом азота не должен оказывать сильного влияния на концентрирование фермента из-за стерических затруднений и близости сильно гидрофобной матрицы, а в третьем случае уже появляется положительно заряженный атом азота, расположенный на достаточном удалении от матрицы и способный к ионообменному связыванию фермента.

Еще ярче этот эффект наблюдается в случае использования носителя (IV), содержащего полиэтилениминовые цепи. Тот факт, что на 1 г этого носителя связывается лишь 6 мг фермента, не противоречит сделанному выводу, так как этот образец, в отличие от образцов (I) — (III), содержит значительно меньшее количество первичных аминогрупп и, соответственно, их реакционноспособных альдегидных производных. Обменная емкость исходной смолы (IV) по всем амино- и иминогруппам составляет только 1 мг-экв/г. Даже если предположить, что средняя длина полиэтилениминовых цепочек составляет 10—15 звеньев, то и тогда несложный расчет приводит к тому, что содержание первичных аминогрупп в образце (IV) в 50—80 раз меньше, чем в образцах (I) — (III), а это означает, что на 1 активированную первичную аминогруппу носителя (IV) приходится в 50—

80 раз больше связанного фермента, чем для образцов (I) и (II), и в 15—20 раз больше, чем для образца (III).

Еще одним подтверждением высокой связывающей способности носителей (III) и (IV) является тот факт, что связывание фермента этими носителями полностью заканчивается через 2 ч, тогда как для носителей (I) и (II) процесс иммобилизации продолжается до 24 ч (табл. 1), т. е. увеличение локальной концентрации фермента вблизи активных групп за счет ионообменного концентрирования ускоряет процесс иммобилизации.

Таким образом, введение в исходную стиролдивинилбензолную матрицу большего числа полиэтилениминовых цепей (для чего необходимо преодолеть определенные стерические затруднения) позволит достичь связывания с полимерным носителем значительных количеств фермента.

Для препаратов иммобилизованного α -химотрипсина по кинетическим данным реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата нами были рассчитаны значения констант второго порядка k_2 , констант Михаэлиса K_m и констант деацилирования k_3 (табл. 2). Из данных табл. 2 следует, что значения констант, характеризующих протекание ферментативной реакции, для иммобилизованного α -химотрипсина, во-первых, достаточно близки между собой для всех препаратов на основе носителей (I) — (IV), а во-вторых, близки константам для нативного фермента [7]. Незначительные колебания величин k_2 и K_m вполне можно объяснить ошибкой эксперимента, а некоторое уменьшение константы деацилирования k_3 для фермента, иммобилизованного на носителях (I) — (III), может быть обусловлено близостью гидрофобной основы матрицы. В целом же иммобилизация на использованных носителях (I) — (IV) не оказывает заметного влияния на кинетическое поведение α -химотрипсина в реакции гидролиза сложноэфирной связи *n*-нитрофенилацетата.

Экспериментальная часть

В качестве полимерных носителей для иммобилизации ферментов были использованы аминоксодержащие стиролдивинилбензолные сополимеры с верхним пределом проницаемости по M 3000 и 50 000, представляющие собой гранулы со средним диаметром 0,25—0,5 мм. Для их получения исходные сополимеры стирола и дивинилбензола (марки СДВ-2) были подвергнуты хлорметилированию с последующим аминированием этилендиамином, гексаметилендиамином, диэтилентриамином и полиэтиленимином (для полимера с проницаемостью до M 3 000) и этилендиамином (для полимера с проницаемостью до M 50 000).

Иммобилизацию α -химотрипсина с содержанием активного фермента 80% и пепсина с содержанием активного фермента 75% (Олайнского завода химреактивов) проводили с использованием бифункционального реагента — 50%-ный водный раствор глутарового альдегида («Eastman kodak», США) в соответствующем буферном растворе (см. ниже).

Содержание активного препарата в исходном пепсине и активность иммобилизованного пепсина определяли по гемоглобину [6].

Содержание активного препарата в исходном α -химотрипсине и концентрацию активных центров в препаратах иммобилизованного α -химотрипсина определяли спектрофотометрически методом титрования активных центров *транс*-циннамоилимидазолом [8].

Носитель для иммобилизации предварительно активировали следующим способом: 1 г носителя (I) — (IV) суспендировали при перемешивании в 12,5 мл фосфатного буфера (рН 7,5) с ионной силой 0,1, после чего при комнатной температуре по каплям добавляли сначала 2,5 мл 25%-ного водного раствора глутарового альдегида, а затем еще 2,5 мл 50%-ного водного раствора глутарового альдегида. Обработанный носитель отмывали тем же фосфатным буфером до полного удаления непрореагировавшего глутарового альдегида. Полноту реакции аминогрупп носителя кон-

тролировали реакцией с нингидрином, используя для сравнения соответствующий носитель, не обработанный глутаровым альдегидом.

Для связывания α -химотрипсина 0,1 г обработанного глутаровым альдегидом носителя суспендировали в 12,5 мл фосфатного буфера (рН 7,5), к полученной суспензии при комнатной температуре и при перемешивании добавляли 5 мл раствора, 1,5 г фермента в 40 мл того же буфера. Реакцию проводили в течение 2 ч, после чего продукт отмывали (порциями по 50 мл) 500 мл фосфатного буфера (рН 7,5), 250 мл 2М NaCl, 250 мл 0,001 н. HCl и 500 мл воды, что приводило к полному удалению химически не связанного с носителем фермента. Затем полученные образцы иммобилизованного на носителях (I) — (IV) фермента высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Для связывания пепсина 0,1 г обработанного глутаровым альдегидом носителя суспендировали при температуре 4° в 10 мл ацетатного буфера (рН 5,6) с ионной силой 0,1 и при перемешивании добавляли 200 мг пепсина. Реакцию проводили 24 ч, после чего препарат иммобилизованного фермента отмывали (порциями по 50 мл) раствором 2М NaCl в ацетатном буфере (рН 5) до полного удаления химически не связанного пепсина, последнюю отмывку проводили водой и высушивали препарат при комнатной температуре.

Присутствие белка в сливных водах в обоих случаях определяли спектрофотометрически при 280 нм.

Кинетику гидролиза *n*-нитрофенилацетата иммобилизованным α -химотрипсином определяли спектрофотометрически при 400 нм. 0,1 г препарата иммобилизованного фермента суспендировали при 25° в 25 мл трис-HCl буфера (рН 7,8) с ионной силой 0,05 и вводили в суспензию до 10^{-4} М *n*-нитрофенилацетата, растворенного в диметилсульфоксиде. Для сравнения использовали растворы *n*-нитрофенилацетата в тех же концентрациях, не содержащие ферментного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barnett L. B., Bull H. B. (1959) J. Amer. Chem. Soc., 81, 5133—5136.
2. Mitz M. A. (1956) Science, 123, 1076—1077.
3. Mitz M. A., Summaria L. J. (1961) Nature, 189, 576—577.
4. Schejter A., Bar-Eli A. (1970) Arch. biochem. biophys., 136, 325—330.
5. Гембицкий П. А., Жук Д. С., Каргин В. А. (1966) Химия этиленimina, стр. 181, «Наука», М.
6. Асагиави В. С. (1969) Ферментные методы анализа, стр. 532, «Наука», М.
7. Bender M. L., Kezdy F. J., Gunter G. R. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3714—3721.
8. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930—2935.

Поступила в редакцию
25.XII.1974

IMMOBILIZATION OF SOME ENZYMES ON MODIFIED STYRENE-DIVINYLBENZENE COPOLYMER MATRICES

TORCHILIN V. P., LITVACK G. M., ESINA O. N.,
MAKAROVA S. B., GRYAZNOV G. V.

All-Union Research Institute of Chemical Reagents
and High Purity Compounds, Moscow

Utilizing bifunctional reagent glutaraldehyde, α -chymotrypsin and pepsin were immobilized on styrene-divinylbenzene copolymer matrices of different permeability modified with ethylenediamine, hexamethylenediamine, diethylenetriamine and polyethylenimine. Of the compounds tested, the last two were shown to be most suitable for α -chymotrypsin immobilization on highly permeable matrix, whereas all of them were without effect with pepsin. The kinetic constants for the hydrolysis of *p*-nitrophenylacetate by immobilized α -chymotrypsin are practically the same as those for the native enzyme.