



УДК 577.152.311*4'17:661.183.8

**ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОРГАНОКРЕМНЕЗЕМНЫХ СОРБЕНТОВ***Евстратова Н. Г., Остапенко О. В., Серебренникова Г. А.,
Евстигьева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Описано получение иммобилизованной фосфолипазы A_2 (КФ 3.1.1.4) с использованием органокремнеземных сорбентов путем посадки фермента на матрицу по его карбоксильным или аминогруппам. Активность иммобилизованной фосфолипазы A_2 в первом случае составила 12%, во втором — 2% от его исходного значения. Иммобилизация фермента обеспечила возможность многократного использования фосфолипазы A_2 для разделения рацемических смесей фосфолипидов.

Актуальной задачей биотехнологии является разработка методов эффективного использования различных ферментов, поскольку это достаточно дорогие и труднодоступные биополимеры. Низкая стабильность ферментов при их хранении и различных неблагоприятных воздействиях, невозможность их многократного использования из-за сложности отделения фермента от реагентов и продуктов реакции обусловили необходимость получения иммобилизованных ферментов.

В настоящее время число их достаточно велико. Однако выбор носителя и метода иммобилизации в каждом конкретном случае до сих пор остается проблематичным.

В последнее время в качестве носителей широко используются как органические, так и неорганические матрицы. Иммобилизация фермента на них осуществляется путем ковалентного присоединения белковой молекулы по ее различным функциональным группам, в том числе и по группам, входящим в ее активный центр. В связи с этим при иммобилизации наблюдается значительная потеря ферментативной активности. Поэтому выбор носителя и способа посадки, обеспечивающих минимальную инактивацию фермента, является основной задачей при получении иммобилизованного фермента.

За последние годы широкую популярность получили органокремнеземные сорбенты, которые были использованы при иммобилизации некоторых ферментов и нуклеотидов [1, 2]. Ранее подобные носители были использованы нами при получении фосфолипидсодержащих биоспецифических сорбентов, на которых было проведено выделение фосфолипазы A_2 (КФ 3.1.1.4) из змеиного яда [3]. Представлялось интересным опробовать их для иммобилизации выделенного нами фермента.

До настоящего времени в качестве матриц для присоединения фосфолипаз были использованы сефароза [4] и ариламиностекло [5]. Однако остаточная активность иммобилизованных таким способом ферментов была незначительной. К тому же возможности многократного использования таких иммобилизованных ферментов ограничены, что обусловлено некоторыми известными недостатками, свойственными для выбранных носителей [6].

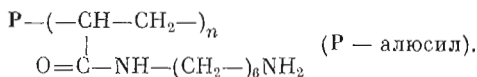
Органокремнеземные сорбенты, преимущества которых отмечались неоднократно [1—3], представляют собой силохром, обработанный солями алюминия с целью повышения его гидролитической устойчивости в водных средах и покрытый затем органическими полимерами: полиакриловой кислотой, поли- β -оксиэтилметакрилатом. При последующей обработке данного сорбента различными диаминами был получен носитель, имеющий реакционноспособную аминогруппу.

Характеристика препаратов иммобилизованной фосфолипазы A₂ (E_I)

Тип иммобилизации фосфолипазы A ₂	Активность, мкмоль/мин на 1 мг белка	Степень посадки, мг белка/г сорбента	Количество расщепляемого фосфолипида*, мг/100 мг E _I
(COOH)	8,1	4,5	200
(NH ₂)	1,6	2,1	16

* Полное расщепление за 30 мин гас-1,2-дипальмитоилглицеро-3-фосфохолина.

Мы использовали сорбент, обработанный на последней стадии гексаметилендиамином:



Посадка фосфолипазы A₂ на такой носитель осуществлялась двумя путями: за счет карбоксильных групп белка, активируемых различными водорастворимыми карбодимидами, в частности хлоргидратом 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимида, мето-*n*-толуолсульфонатом 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодимидом*, с образованием достаточно прочных связей типа

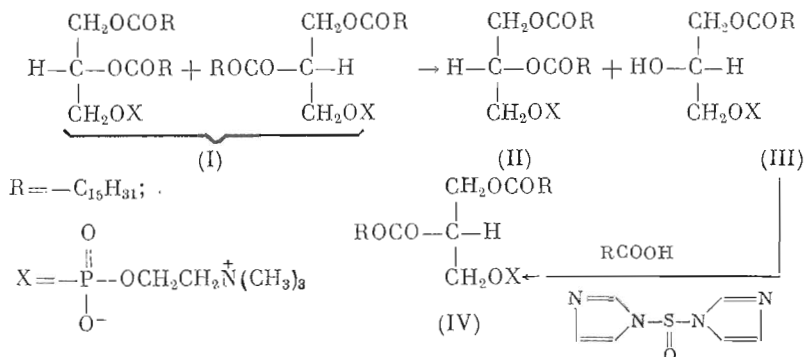
$$\begin{array}{c}
 \text{R---N---C---(E)} \\
 | \quad \parallel \\
 \text{H} \quad \text{O}
 \end{array}$$

[6], где R — матрица, E — фермент (I); 2) по аминогруппам фермента с помощью глутарового альдегида (II).

Применение водорастворимого карбодимида при иммобилизации фермента по COOH-группам (тип (COOH)) диктует необходимость проведения реакции при pH 5,0, так как в этом случае затрагивается меньшее число карбоксильных групп фермента, входящих в его активный центр [7]. Предлагаемый способ позволяет сохранить 12% удельной активности фосфолипазы A₂ при содержании белка на носителе 4,5 на 1 г сорбента (таблица).

При иммобилизации фосфолипазы A₂ по ее аминогруппам (тип (NH₂)) последующая попытка восстановления шиффовых оснований боргидридом натрия приводила к частичному разрушению матрицы. Поэтому определение активности иммобилизованной фосфолипазы A₂ в данном случае осуществлялось сразу же после проведения реакции иммобилизации в условиях, обеспечивающих относительную устойчивость шиффовых оснований. Однако в результате трехкратного использования иммобилизованной таким образом фосфолипазы A₂ ее активность полностью терялась, тогда как в первом случае иммобилизованный фермент выдерживал 8—10 циклов работы в течение полугода.

Иммобилизованная фосфолипаза A₂ была использована для разделения рацемических фосфолипидов на оптически активные антиподы (схема, таблица).



* При использовании разных водорастворимых карбодимидов получены сходные результаты.

Расщепление рацемического дипальмитоилфосфатидилхолина (I) осуществляли в трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем ионы Ca^{2+} . В качестве мицеллообразователя в буфер добавляли тритон X-100, так как мицеллы тритон-X-100 — фосфолипид имеют диаметр Стокса, равный 100 Å и достаточный для проникновения их внутрь пор сорбента. После полного расщепления 2,3-дипальмитоил-*sn*-глицеро-1-фосфохолин (II) и лизофосфатидилхолин природного строения (III) разделяли на силикагеле. Лизофосфатидилхолин далее подвергался ацилированию имидазолидами пальмитиновой кислоты [8]. Оптическую чистоту полученных соединений (II) — (IV) контролировали методом дисперсии оптического вращения.

Таким образом, фосфолипаза A_2 , иммобилизованная на органокремнеземных носителях, обладает большей активностью и кратностью использования, чем препараты, полученные с применяемыми ранее носителями.

Экспериментальная часть

В качестве исходного носителя применяли органокремнеземный сорбент, предоставленный В. П. Варламовым (ИНЭОС АН СССР) ($d_{\text{пор}} 400 \text{ Å}$, $S_{\text{уд}} 30 \text{ м}^2/\text{г}$, $[\text{NH}_2\text{-группы}] 0,1 \text{ мэкв./г}$).

ТСХ проводили на силуфоле UV 254 в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. Проявитель — молибденовый синий. Дисперсию оптического вращения измеряли на поляриметре Perkin—Elmer 241 MC.

В работе была использована фосфолипаза A_2 яда дальневосточного щитомордника (изофермент E III), выделенная ранее [9] (активность 80 мкмоль/мин·мг белка). Активность фосфолипазы A_2 определяли ацидометрическим методом с применением 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина. Содержание белка на сорбенте определяли методом Лоури [10].

Фосфолипаза A_2 , иммобилизованная по COOH-группам (I).
К 0,65 г органокремнеземного сорбента в 10 мл дистиллированной воды добавляли 5,0 мг фосфолипазы A_2 и 10 мг водорастворимого карбодиимида, доводили рН до 5,0 разбавленной HCl и перемешивали 18—20 ч при 18—20° С. Затем сорбент отфильтровывали и промывали 200 мл дистиллированной воды.

Фосфолипаза A_2 , иммобилизованная по NH₂-группам (II).
К 0,915 г сорбента в 6 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 6,9, добавляли 2,3 мл 25% глутарового альдегида и инкубировали 17 ч при 37° С. Сорбент отфильтровывали и промывали тем же буфером, добавляли 3 мг фосфолипазы A_2 в 6 мл фосфатного буфера и встряхивали 18 ч при 18—20° С. Сорбент отфильтровывали и промывали 0,1 М фосфатным буфером, затем 200 мл дистиллированной воды и уравнивали буфером трис-НСl (50 мМ), рН 8,0, содержащим CaCl_2 (25 мМ), NaCl (0,2 М), EDTA (1 мМ).

*Разделение *rac*-1,2-дипальмитоилглицеро-3-фосфохолина (I) с помощью иммобилизованной фосфолипазы A_2 .* а. К 100 мг фосфолипазы A_2 , иммобилизованной по COOH-группам, в 2,5 мл буфера, рН 8,0, содержащего трис-НСl (50 мМ), NaCl (0,2 М), CaCl_2 (25 мМ), EDTA (1 мМ), добавляли 200 мг предварительно обработанного ультразвуком фосфолипида (I) в 2 мл того же буфера и встряхивали 30 мин при 18—20° С. Затем отфильтровывали иммобилизованный фермент и промывали 100 мл того же буфера, не содержащего CaCl_2 . Смесь фосфолипидов из маточника экстрагировали 50% метанолом в хлороформе. Растворитель отгоняли в вакууме и остаток хроматографировали на силикагеле ЛМ 100/160 мкм. 2,3-Дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (II) элюировали смесью хлороформ — метанол, 3:7, лизофосфатидилхолин (III) — смесью хлороформ — метанол, 1:9. Выход соединения (II) 95 мг (95%). R_f 0,3. Данные ДОВ, $[\alpha]$, с 1, хлороформ (λ , нм): -6,1 (589), -16,7 (435), -17,9 (407), -23,2 (366), -27,8 (334), -40,5 (296).

Выход соединения (III) 90 мг (90%). R_f 0,2. Данные ДОВ, $[\alpha]$, с 10, хлороформ — метанол, 1:1 (λ , нм): -2,2 (589), -3,1 (435), -5,2 (407),

-10,1 (366), -16,0 (334), -25,3 (296). Лит. данные [11]: $[\alpha]_D^{20}$ -2,8 (с 10, хлороформ - метанол, 9:1).

б. Разделение рацемического 1,2-дипальмитоилглицеро-3-фосфохолина (I) фосфолипазой A_2 , иммобилизованной по NH_2 -группам, осуществлялось аналогично предыдущему опыту взаимодействием 40 мг соединения (I) и 250 мг иммобилизованной фосфолипазы A_2 (II). Выход соединения (II) 18 мг (90%). Выход соединения (III) 10 мг (85%). Данные ДОВ аналогичны значениям, полученным в предыдущем опыте.

1,2-Дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (IV). К раствору 110 мг имидазола в 4 мл сухого тетрагидрофурана в течение 2 мин прибавляли по каплям 0,5 мл $SOCl_2$ в токе сухого азота. Осадок отфильтровывали. Фильтрат сразу же добавляли к 60 мг пальмитиновой кислоты в 20 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали в токе сухого азота 30 мин. Добавляли 46 мг лизофосфолипида (III) и 1,0 мл раствора натрия в диметилсульфоксиде (323 мг натрия в 20 мл). Реакционную массу перемешивали 15 мин при 18-20°С, затем экстрагировали эфиром, эфирный слой сушили Na_2SO_4 и растворитель отгоняли в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (IV) смесью хлороформ - метанол, 3:7.

Выход 16 мг (29%). ДОВ, $[\alpha]$, с 1, хлороформ (λ , нм): +6,4 (589), +14,9 (435), +16,6 (407), +24,2 (366), +28,5 (334), +39,8 (296). Лит. данные [11]: $[\alpha]_D^{20}$ +6,7 (с 1,5, хлороформ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Скрябин К. Г., Варламов В. П., Захарьев В. М., Рогожин С. В., Бавев А. А. Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 7, с. 1416-1420.
2. Рогожин С. В., Варламов В. П., Вальковский Д. Г. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 8, с. 1718-1721.
3. Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Попова Т. П., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Варламов В. П., Семенова И. П., Рогожин С. В. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1355-1360.
4. Ансалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1553-1559.
5. Adamich M., Voss H. F., Dennis E. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1978, v. 189, № 2, p. 417-423.
6. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980, с. 174-235.
7. Fleer E. A. M., Verheij H. M., de Haas G. H. Eur. J. Biochem., 1981, v. 113, № 2, p. 283-288.
8. Hermeller A., Paltauf F. Chem. Phys. Lipids, 1981, v. 28, № 1, p. 111-115.
9. Евстратова Н. Г., Мирошников А. И., Айянян А. Е., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биохимия, 1982, т. 47, № 9, с. 1347-1351.
10. Кейрс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 146.
11. Препаративная биохимия липидов/Ред. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. и др. М.: Наука, 1981, с. 115, 120.

Поступила в редакцию
18.XI.1983

PHOSPHOLIPASE A_2 IMMOBILIZATION ON ORGANO-SILICA SUPPORTS

EYSTRATOVA N. G., OSTAPENKO O. V., SEREBRENNIKOVA G. A.,
EYSTIGNEEVA R. P.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Preparation of immobilized phospholipase A_2 (EC 3.1.1.4) by use of organo-silica supports is described. The enzyme was attached to the support via its carboxy or amino groups, the activity of immobilized phospholipase A_2 amounting to 12 or 2% of the initial value, respectively. The phospholipase A_2 immobilization provided a repeated use of the enzyme for separating the racemic phospholipids.