



УДК 577.154.36.02

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ЛИЗОЦИМА,
ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА СИЛОХРОМЕ*Черкасов И. А., Бравченко Н. А., Павловский П. Е.,
Гравова В. В., Мокеев В. Я.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР;
Московский технологический институт мясной и молочной промышленности;
ВНИИлюминофоров, Ставрополь*

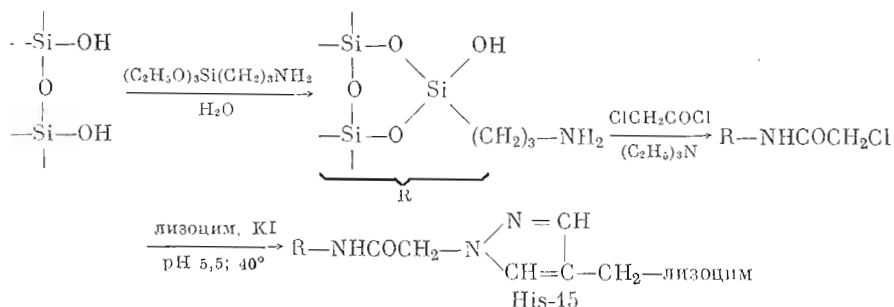
Описан способ иммобилизации лизоцима белка куриных яиц на силохроме — носителе с жесткой структурой на основе двуокиси кремния. Проведено ковалентное присоединение лизоцима к силохрому избирательно по остатку гистидина-15, не существенному для ферментативной активности. Полученный продукт (лизохром) содержит 10% по весу лизоцима. Удельная активность лизохрома, определенная по гидролизу хитопентаозы, составляет ~30% активности нативного лизоцима. Ввиду жесткости структуры носителя лизохром не подвержен набуханию и синерезису и не ингибируется повышенными концентрациями солей. Термодинамические параметры тепловой денатурации лизохрома указывают на неполное разворачивание молекул лизоцима в этом процессе и, следовательно, на стабилизирующее влияние матрицы носителя на структуру фермента. Лизохром обладает бактериолитической активностью, составляющей ~2% активности нативного лизоцима. Это позволяет рассматривать силохром как подходящий носитель для иммобилизации ферментов, действующих как на низкомолекулярные, так и на высокомолекулярные и коллоидные субстраты.

Ранее нами на примере лизоцима (КФ 3.2.1.17) белка куриных яиц была проведена структурно направленная иммобилизация фермента на носителе с нежесткой структурой на основе полиакриламида — биогеле Р-60 [1] и исследованы свойства полученного продукта (лизогеля) [2]. Иммобилизация достигалась ковалентным присоединением лизоцима к носителю избирательно по остатку гистидина-15, не существенному для взаимодействия с субстратом. По сравнению с нативным лизоцимом лизогель обладал некоторыми особенностями. В частности, его активность, измеряемая по гидролизу хитопентаозы, сохранялась при более высокой температуре, чем у нативного лизоцима, и снижалась с ростом ионной силы среды выше 0,3. Кроме того, лизогель не обнаруживал заметной бактериолитической активности, хотя связывал микробные клетки, образуя фермент-субстратный комплекс с полисахаридом клеточной стенки [2].

С целью дальнейшего изучения влияния иммобилизации на свойства фермента, в частности для выяснения влияния природы носителя, нами получен лизоцим, иммобилизованный на силохроме — носителе с жесткой структурой на основе двуокиси кремния, — и исследованы свойства полученного продукта (лизохрома).

Иммобилизацию проводили, как и ранее [1], ковалентным присоединением лизоцима к носителю по остатку гистидина-15. Принципиальная

схема иммобилизации приведена ниже:



Количество вводимых на первой стадии аминогрупп, определенное титрованием, составляет 150—200 мк-экв/г носителя. Попытка на второй стадии провести хлорацетилирование аминопроизводного силохрома в водном растворе NaHCO_3 , т. е. в тех же условиях, в которых проводилось хлорацетилирование аминопроизводного биогеля [1], оказалась безуспешной. Однако в среде ацетона в присутствии триэтиламина аминогруппы ацилировались практически полностью, хотя для этого требовалась повторная обработка аминопроизводного силохрома 10-кратным молярным избытком хлорацетила хлорида. Сочетание лизоцима с хлорацетамидным производным силохрома проводили при pH 5,5, обеспечивающем избирательное присоединение по остатку гистидина-15 [1], в присутствии KI как катализатора. Не вступившие в реакцию хлорацетамидные группы блокировали этаноламином при pH 8,4 также в присутствии KI [1]. Полученный продукт (лизохром) отмывали от примесей на воронке со стеклянным фильтром вначале водой, а затем 0,2 М уксусной кислотой и лиофилизовали.

Лизохром представляет собой сыпучий порошок, внешне не отличающийся от исходного силохрома. Его влажность на воздухе $\sim 1,3\%$. Содержание лизоцима в лизохроме составляет 10% по весу; такое количество лизоцима вводилось в препарат в целях стандартизации условий работы и было равно его содержанию в ранее исследованном препарате лизоцима, иммобилизованного на биогеле [1, 2].

По данным аминокислотного анализа, в гидролизате обнаруживаются лишь следы гистидина, что подтверждает преимущественное присоединение лизоцима к носителю по этому остатку. Удельная активность лизохрома, определенная по гидролизу хитопентаозы в стандартных условиях, составляет $\sim 30\%$ активности нативного лизоцима, что соответствует наибольшему сохранению активности при ковалентной иммобилизации [3].

Объем, занимаемый лизохромом в растворе, заметно не изменяется при изменении pH от 3,0 до 8,4 и ионной силы от 0 до 1,35, т. е. благодаря жесткости структуры носителя он не подвержен набуханию и синерезису. Это, в частности, допускает возможность использования лизохрома как аффинного сорбента субстратов и ингибиторов лизоцима в условиях колоночной хроматографии с переменными значениями pH и ионной силы.

Далее нами было исследовано влияние условий среды на ферментативную активность лизохрома с использованием низкомолекулярного растворимого субстрата — хитопентаозы. Как оказалось, в отсутствие солей лизохром неактивен; с ростом ионной силы активность нарастает, выходя на плато (рис. 1). Аналогично зависит от ионной силы активность нативного лизоцима с этим же субстратом. Таким образом, отмеченное для лизогеля [2] ингибирование активности повышенными концентрациями соли в случае лизохрома не наблюдается. Этот факт подтверждает ранее высказанное предположение о том, что солевое ингибирование лизогеля является результатом его синерезиса, обусловленного в свою очередь

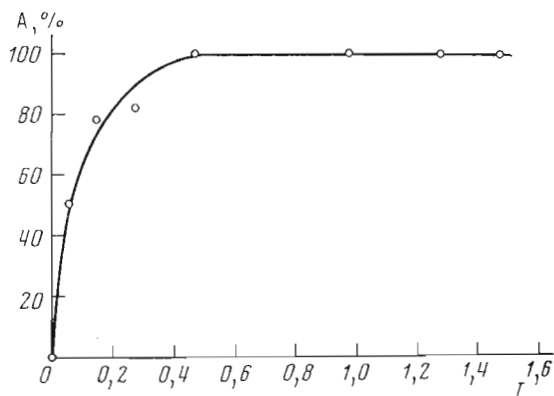


Рис. 1

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

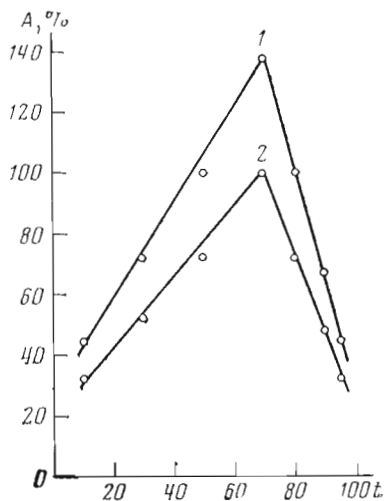


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности лизохрома от температуры (0,2 М ацетатный буфер с добавкой NaCl; рН 4,6; I 0,5); 1 — относительно стандартных условий, 2 — относительно максимальной активности при 70°

экранированием ионами солей сил отталкивания между одноименно заряженными молекулами фермента [2].

Зависимость активности лизохрома от рН не обнаруживает каких-либо существенных отличий от нативного лизоцима и лизогеля (рН-оптимум 4—4,5), что согласуется с электронейтральным характером использованных носителей (биогеля и силохрома).

Температурный оптимум активности приходится на 70° (рис. 2), что близко к данным для нативного лизоцима [4]. В области до 70° эта зависимость носит линейный характер и прирост активности составляет ~1,17% на 1° (рис. 2, 2). Кажущаяся температура полуинактивации приходится на 89°. Однако, экстраполируя ход повышения активности с температурой в область инактивации, получаем, что истинная полуинактивация, соответствующая денатурационному переходу, происходит при 85°, тогда как у нативного лизоцима при 78° [5]. Таким образом, термостабильность лизохрома, как и лизогеля [2], оказывается несколько повышенной по сравнению с нативным лизоцимом.

В испытанных условиях тепловая денатурация лизохрома полностью обратима, о чем свидетельствует полное восстановление его активности после прогрева при инактивирующих температурах, вплоть до 95°.

Оценка термодинамических параметров тепловой денатурации лизохрома проводилась с учетом тепловой активации фермента. Количество (%) неденазированной формы фермента определялось по формуле $N_t = 100 \cdot A_t / 100 + 1,17(t - 70)$ (рис. 2, 2). Полученные результаты приведены в таблице вместе с данными для нативного лизоцима и лизогеля. (Приближенная оценка тех же параметров без поправки на тепловую активацию фермента, как это проводилось для лизогеля [2], дает величины ΔH и ΔS , равные 44 ккал/моль и 121 э.е. соответственно, т. е. существенно не отличающиеся от приведенных в таблице.)

Полученные результаты предположительно можно объяснить тем, что разворачивание молекул иммобилизованного на силохроме лизоцима в ходе тепловой денатурации происходит лишь частично. Таким образом, матрица силохрома, по-видимому, оказывает стабилизирующее действие

**Термодинамические параметры тепловой денатурации
препаратов лизоцима**

Фермент	ΔH , ккал/моль	ΔS , э.е.	Литература
Нативный	123	351	[6]
»	127	364	[7]
Лизогель	117	320	[2]
Лизохром	43	118	Данная работа

на структуру связанного с ним лизоцима. Однако, учитывая явную неоднородность надмолекулярной структуры силохрома (см. ниже), вряд ли можно утверждать, что все молекулы иммобилизованного лизоцима находятся в одинаковом состоянии (в смысле микроокружения) и претерпевают одинаковые изменения при нагревании. В связи с этим приведенные выше параметры тепловой денатурации иммобилизованного на силохроме лизоцима следует рассматривать как среднестатистические.

Интересно отметить, что термодинамические параметры тепловой денатурации лизогеля практически совпадают с данными для нативного лизоцима (см. таблицу), что указывает на отсутствие взаимодействия между молекулами иммобилизованного фермента и матрицей носителя. В то же время температуры денатурационных переходов лизогеля [2] и лизохрома, несмотря на существенные различия в параметрах тепловой денатурации, оказались весьма близки друг другу ($\sim 90^\circ$). Отсюда следует, во-первых, что стабилизирующее влияние матрицы силохрома на структуру лизоцима проявляется, по-видимому, лишь в снижении величин ΔH и ΔS тепловой денатурации, но не имеет значения в сохранении активности при повышенных температурах. Во-вторых, повышение термостабильности лизогеля и лизохрома, возможно, является следствием иммобилизации как таковой, т. е. следствием потери способности свободной диффузии фермента в растворе и изменившихся условий контакта его молекул с окружающей средой. Подобное повышение термостабильности может иметь общее значение для ферментов, если только способ иммобилизации не сопровождается модификацией фермента, дестабилизирующей его структуру. Физическая природа этого явления, однако, неясна и требует специального рассмотрения.

Далее, нами была исследована бактериолитическая активность лизохрома в отношении клеток *Micrococcus lysodeikticus*. Активность определяли описанным ранее [8] фотометрическим методом по приросту оптической плотности реакционной смеси при 260 нм. При определении литической активности препаратов иммобилизованного лизоцима данный метод является более объективным, чем турбидиметрический, поскольку, как было показано ранее на примере лизогеля [2], мутность суспензии бактерий может снижаться не за счет лизиса клеток, а за счет их сорбции на частицах иммобилизованного фермента. Прирост же оптической плотности при 260 нм обусловлен выходом в раствор веществ нуклеиновой природы после полного распада бактериальной клетки.

В испытанных нами условиях (время инкубации 30 мин при содержании 5 мг лизохрома, т. е. 500 мкг лизоцима в пробе) удельная активность лизохрома составила $\sim 2\%$ активности нативного лизоцима (последний был взят в количестве 10 мкг в пробе при том же времени инкубации). При линейной экстраполяции активности к нулевой концентрации лизохрома получается величина 3,3%. Таким образом, в отличие от лизогеля, практически не обладавшего литической активностью [2], активность лизохрома выражена достаточно заметно. В данном случае, по-видимому, сказывается различие в надмолекулярной структуре частиц носителей.

Поскольку биогель и силохром имеют стандартный размер пор, достаточный для включения молекул лизоцима, но существенно меньший,

чем размер бактериальных клеток, величина литической активности лизогеля и лизохрома, по-видимому, определяется особенностями строения их поверхности. Так, частицы биогеля обладают сферической формой с ровной, гладкой поверхностью, в то время как частицы силохрома имеют неправильную форму с неровной поверхностью.

Хотя количества лизоцима, находящегося на поверхности частиц лизогеля, достаточно для заметного связывания микробных клеток [2], однако из-за гладкого и ровного характера этой поверхности контакт микробной клетки с молекулами лизоцима не может быть многоточечным. В прищипе, если пренебречь другими факторами, например энергией броуновского движения, для связывания одной микробной клетки достаточно одной молекулы лизоцима, поскольку связывание происходит за счет образования фермент-субстратного комплекса лизоцима с полисахаридом клеточной стенки бактерии [2] при известной стехиометрии, равной 1 : 1. В то же время, как было показано нами ранее [8], для лизиса клетки необходим разрыв более чем 10^7 гликозидных связей в ее клеточной стенке, т. е. и соответствующее число актов связывания с ферментом. В связи с этим практическое отсутствие лизиса клеток лизогелем в обычных условиях определения литической активности становится понятным. Что же касается лизохрома, то благодаря неровностям его поверхности микробные клетки, по-видимому, могут одновременно подвергаться множественной атаке молекулами иммобилизованного лизоцима, что существенно ускоряет их лизис.

Таким образом, полученные на примере лизохрома данные позволяют рассматривать силохром как подходящий носитель для иммобилизации ферментов, действующих не только на низкомолекулярные, но и на высокомолекулярные и коллоидные субстраты.

Экспериментальная часть

В работе был использован силохром С-80, приготовленный в ВНИИ люминофоров (г. Ставрополь), со следующими характеристиками: размер частиц 0,25—0,35 мм, размер пор 350—500 Å, удельная поверхность 80 м²/г. Лизоцим белка куриных яиц был трижды перекристаллизован, обессолен на сефадексе G-25 в 1 М уксусной кислоте и лиофилизирован. Концентрацию лизоцима в растворе определяли спектрофотометрически, приняв экстинкцию при 275 нм ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) равной 24,33. Хитопентаоза была получена по методике, аналогичной для получения хитотетраозы [4]. В качестве бактериального субстрата использовали ацетонный порошок клеток *Micrococcus lysodeikticus* (производство Олайнского завода химических реактивов), очищенный от растворимых веществ двукратной экстракцией водой с последующей лиофилизацией [2, 8].

Аминирование силохрома. Около 15 г силохрома С-80 смачивали 5% раствором γ -аминопропилтриэтоксисилана в этаноле, откачивали водоструйным насосом воздух из пор силохрома для более полного его смачивания и сушили на воздухе при 80°. Сухой продукт промывали на воронке со стеклянным фильтром № 2 водой и ацетоном и сушили на той же воронке в токе воздуха при откачивании водоструйным насосом. Для определения аминогрупп навеску 0,5 г аминсилохрома в виде основания заливали 20 мл 0,01 н. HCl и через 0,5 ч периодического перемешивания оттитровывали избыток кислоты 0,01 н. раствором NaOH по индикатору Ташира. Параллельно проводили обратное титрование аминсилохрома в форме хлоргидрата. Найдено около 200 мкмоль аминогрупп на 1 г аминилохрома.

Хлорацетилирование аминилохрома. Полученный аминилохром суспендировали в 100 мл ацетона, прибавляли 2 мл ($\sim 0,02$ моль) триэтиламина и приливали по каплям при перемешивании погружной мешалкой 2,0 мл ($\sim 0,027$ моль) свежеперегнанного хлорацетилхлорида (10-

кратный молярный избыток относительно содержания аминогрупп в аминосилохроме). Реакционную смесь перемешивали 2,5 ч при комнатной температуре, затем выливали в 1 л воды и отмывали осадок от примесей декантацией. Для перевода непрореагировавших аминогрупп в форму свободного основания осадок суспендировали в 1 л 0,01 н. NaOH и отмывали от щелочи водой на воронке со стеклянным фильтром № 2, затем ацетоном и сушили на той же воронке в токе воздуха при откачивании водоструйным насосом. Титрование показало присутствие 40 мкмоль аминогрупп в 1 г продукта хлорацетилирования, т. е. после первичной обработки ацилирование аминогрупп прошло не полностью. После проведения повторного хлорацетилирования в аналогичных условиях свободные аминогруппы не обнаруживались.

Сочетание лизоцима с хлорацетамидосилохромом. В раствор 3 г лизоцима в 500 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера, pH 5,5, с добавкой KI до 0,1 М внесли хлорацетамидосилохром (13,5 г), предварительно увлажненный тем же буферным раствором и откачанный на водоструйном насосе для дегазации. Смесь инкубировали при 40° и перемешивали. Процесс вели с перерывами, оставляя реакционную смесь на ночь без перемешивания и нагревания. За ходом присоединения лизоцима к хлорацетамидосилохрому следили по снижению оптической плотности реакционной смеси при 275 нм. Спустя 30 ч инкубации при 40° продукт сочетания отфильтровывали на воронке со стеклянным фильтром № 2 и отмывали 0,2 М уксусной кислотой. Количество лизоцима в объединенных промывных водах, определенное спектрофотометрически с учетом поправки на поглощение KI, составило 1,5 г. Таким образом, судя по балансу, с носителем связывалось 1,5 г фермента.

Блокировка избыточных хлорацетамидных групп. Полученный влажный продукт перенесли в 100 мл 0,15 М натрий-бикарбонатного буфера (pH 8,4), содержащего β-этаноламин в концентрации 0,1 М (нейтрализованный уксусной кислотой) и KI в той же концентрации. Смесь инкубировали 14 ч при 40° и перемешивали. Затем осадок отмывали на фильтре дистиллированной водой, затем 0,2 М уксусной кислотой и лиофилизировали. Выход 15,07 г. Содержание лизоцима в полученном лизохроме составляло 10% по весу.

Аминокислотный анализ лизохрома. Навеску 60 мг лизохрома поместили в ампулу, прибавили 6 мл 6 н. HCl, откачали на водоструйном насосе и запаляли. Гидролиз вели при 110° в течение 24 ч. Гидролизат после вскрытия ампулы сушили в вакуум-эксикаторе над сухой щелочью и затем дважды пересушивали из воды. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе типа ААА-881 (Чехословакия) с загрузкой 0,2 мг гидролизата.

Ферментативная активность лизохрома. Активность лизохрома определяли так же, как активность лизогеля [2]. За стандартные условия при определении активности по гидролизу хитопентаозы были приняты следующие: 0,2 М натрий-ацетатный буфер (pH 4,6) с добавкой до 0,3 М NaCl, 50°. Активность в иных условиях (рис. 1, 2) выражали в процентах от активности в стандартных условиях.

Удельную бактериолитическую активность выражали в условных единицах по формуле $A = 1000 (\Delta D / e \cdot t)$, где ΔD — прирост оптической плотности реакционной смеси при 260 нм; e — содержание фермента, мг; t — время инкубации, мин. Условия: 0,02% суспензия *M. lysodeikticus* в 1/15 М фосфатном буфере (pH 6,2), 22°, объем пробы 7 мл.

Термодинамические определения. Термодинамические параметры тепловой денатурации лизохрома определяли, как описано ранее для лизогеля [2], но с учетом тепловой активации неденатурированной части фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1972) Изв. АН СССР. Сер. хим. н., № 10, 2374.
2. Черкасов И. А., Кравченко Н. А., Павловский П. Е., Брагина Л. П. (1975) Био-
орган. химия, 1, 50—55.
3. Кестнер А. И., Крезн М. И. (1973) Производство и применение иммобилизован-
ных ферментов, ЭстНИИНТИ, Таллин.
4. Кравченко Н. А., Кузнецов Ю. Д. (1967) Молекуляр. биология, 1, 498—510.
5. Foss J. G. (1960) Biochim. et biophys. acta, 43, 300—310.
6. Delben F., Crescenzi V. (1969) Biochim. et biophys. acta, 194, 615—618.
7. Nakanishi M., Tsuboi M., Ikegama A. (1973) J. Mol. Biol., 75, 673—682.
3. Черкасов И. А., Кравченко Н. А., Павловский П. Е., Брагина Л. П. (1974) Био-
химия, 39, 1308—1311.

Поступила в редакцию
3.XII.1975

После переработки
14.IV.1976

PREPARATION AND PROPERTIES OF LYSOZYME IMMOBILIZED ON SILOCHROM

CHEKASOV I. A., KRAVCHENKO N. A., PAVLOVSKY P. E.,
GRAVOVA V. V., MOKEEV V. Ya.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; Technological Institute of Meat and Dairy
Industry, Moscow; All-Union Institute for Luminofor Research,
Stavropol*

A method for immobilization of hen egg-white lysozyme (E.C.3.2.1.17) on rigid structure macroporous support (silochrom) is described. Covalent attachment of lysozyme to chloroacetamide derivative of silochrom was performed selectively via the histidine-15 residue. The lysozyme content of immobilized preparation (lysochrom) is about 10% by weight, and its specific activity as measured by hydrolysis of chitopentaose constitutes about 30% of the native enzyme activity. Transition temperature (which corresponds to half-inactivation) of lysochrom is increased up to 85°; however, the ΔH and ΔS values of heat denaturation, are decreased and are equal to 43 kcal/mole and 118 cal/mole·grad, respectively, thereby indicating a stabilizing effect of silochrom matrix on the structure of bound enzyme. The specific bacteriolytic activity of lysochrom towards *Micrococcus lysodeikticus* is about 2-3% of that for the native enzyme. The results obtained have demonstrated that silochrom may be used as a support for immobilization of enzymes acting on high molecular and colloidal substrates.
