



УДК 577.158.52.02 + 541.128.13

СТАБИЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОЙ
С СЕФАРОЗОЙ*Кершенгольц Б. М., Угарова Н. Н., Березин И. В.**Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова.*

Показано, что стабильность пероксидазы значительно уменьшается после иммобилизации на сефарозе. Предложен метод стабилизации пероксидазы, ковалентно связанной с сефарозой, активированной бромцианом. Для этого перед иммобилизацией фермент модифицируют глутаровым альдегидом в присутствии инертных белков и сывороточного альбумина и получают растворимые олигомеры пероксидазы — инертные белки — альбумин, стабильность которых в 24 раза превышает стабильность нативного фермента. Иммобилизация таких олигомеров на сефарозе приводит к высокоактивным препаратам пероксидазы, стабильность которых в 500 раз превышает стабильность пероксидазы, ковалентно связанной с сефарозой без предварительной модификации.

Описанные в литературе методы иммобилизации пероксидазы из хрена (КФ 1.11.1.7) не приводят к повышению ее стабильности по сравнению с растворимым ферментом [1—3]. Нами был разработан метод стабилизации растворимой пероксидазы путем ковалентного присоединения к ее молекулам инертных белков (в том числе сывороточного альбумина) [4]. Включение полученных олигомеров пероксидазы — инертные белки — альбумин в полиакриламидный гель дало возможность получить высокостабильные препараты иммобилизованной пероксидазы [5]. Целью данной работы явилась разработка метода стабилизации пероксидазы, ковалентно связанной с носителем. В качестве носителя мы использовали сефарозу, активированную бромцианом. В ряде случаев показано, что ферменты, иммобилизованные на сефарозе, сохраняют высокую активность при повышении стабильности [6—10].

Иммобилизация нативной пероксидазы на BrCN-сефарозе. Удельная активность препаратов иммобилизованных ферментов *, как известно [8, 10], зависит от природы фермента (в частности, от количества реакционных аминогрупп в его молекуле), от соотношения концентраций фермента и BrCN-сефарозы при иммобилизации и от других факторов. Например, препараты неорганической пиррофосфатазы, иммобилизованной на BrCN-сефарозе, имеют удельную активность 0,12 мг/г [9], реннина — 0,06—0,75 [10], химотрипсина — 21—52 мг/г [10]. Пероксидаза содержит всего четыре реакционные аминогруппы, как было определено нами (см. «Экспериментальную часть»). Соотношение фермент/BrCN-сефароза при иммоби-

* Удельная активность препаратов иммобилизованных ферментов выражается в количестве миллиграммов (или нмоль) активного фермента на 1 г венабухшего носителя: мг/г или нмоль/г.

лизации составляло 1 : 100, что значительно ниже соотношений, используемых в работах [8, 10]; тем не менее в этих условиях получают препараты с довольно высокой удельной активностью — 3,2 нмоль (0,13 мг) активного фермента на 1 г ненабухшего носителя.

Зависимость активности от pH (определенная по реакции окисления *o*-дианизидина пероксидазы, ковалентно связанной с BrCN-сефарозой, заметно отличается от pH-зависимости для растворимого фермента (рис. 1). Оптимум каталитической активности для иммобилизованного фермента смещается на единицу pH в кислую область.

Заметно изменяется форма кривой: более острый максимум, более медленное уменьшение активности при росте pH от 5 до 9. Пероксидаза, иммобилизованная на BrCN-сефарозе, имеет меньшую стабильность, чем растворимый фермент (рис. 2, ср. 1 и 2). Для фермента в растворе при 56° и pH 7,0 константа инактивации составляет $4,5 \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹. Препарат иммобилизованного фермента инактивируется в две стадии. На первой стадии (более быстрой) инактивируется около 30% пероксидазы ($k_{ин} 0,1$ мин⁻¹), на второй (более медленной) — около 70% ($k_{ин} 0,01$ мин⁻¹). Уменьшение стабильности пероксидазы при ковалентном связывании ее с BrCN-сефарозой указывает на то, что микроокружение пероксидазы, иммобилизованной на данном носителе, менее благоприятно, чем в растворе. Эффективное защитное действие в случае растворимой пероксидазы оказывают инертные белки, в частности альбумин [4, 5]. Следовало ожидать, что предварительная модификация альбумином фермента или носителя может привести к значительной стабилизации пероксидазы, иммобилизованной на BrCN-сефарозе.

Иммобилизация пероксидазы на BrCN-сефарозе, предварительно модифицированной альбумином. BrCN-сефарозу обрабатывали избытком альбумина (см. «Экспериментальную часть») и к полученному носителю (CA-сефароза) с помощью глутарового альдегида присоединяли фермент. Для иммобилизации на CA-сефарозе использовали различные исходные препараты фермента (табл. 1): нативную пероксидазу, олигомеры пероксидазы — инертные белки (олигомеры (I)), олигомеры пероксидазы — инертные белки — альбумин (олигомеры (IIa)). Наибольшую удельную активность (в ~2 раза выше, чем активность пероксидазы, иммобилизованной на BrCN-сефарозе) имеют препараты иммобилизованных на CA-сефарозе олигомеров (I). Все полученные препараты фермента, иммобилизованного на CA-сефарозе, более стабильны по сравнению с пероксидазой, иммобилизованной на BrCN-сефарозе. Например, препарат пероксидазы — CA-сефароза в 70 раз стабильнее пероксидазы, иммобилизованной на BrCN-сефарозе. Следовательно, контакт пероксидазы с молекулами альбумина на поверхности сефарозы способствует заметному повышению стабильности иммобилизованной пероксидазы. Для изучения другой возможности — стабилизации альбумином растворимой пероксидазы до ее иммобилизации — необходимо было получить растворимые препараты пероксидазы, содержащие альбумин и способные связываться с носителем.

Получение и характеристика олигомеров, пригодных для последующей иммобилизации на BrCN-сефарозе. Для получения олигомеров использо-

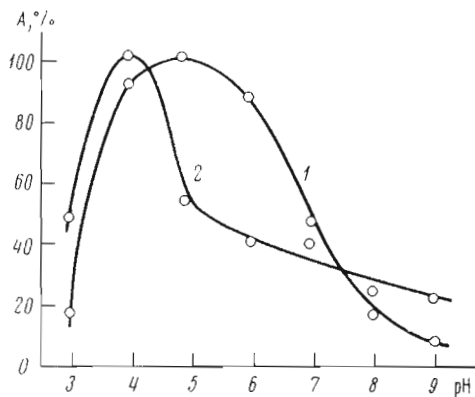


Рис. 1. Зависимость относительной активности *A* от pH для пероксидазы в растворе (1) и ковалентно связанной с BrCN-сефарозой (2)

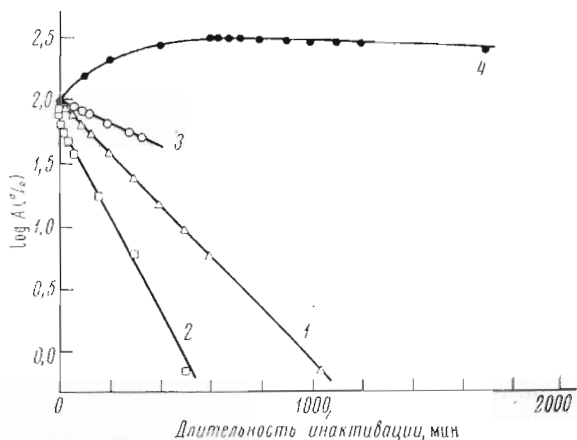


Рис. 2. Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых инактивации различных препаратов пероксидазы: 1 — пероксидаза в растворе, 2 — пероксидаза, ковалентно связанная с BrCN-сефарозой, 3 — олигомеры (III), ковалентно связанные с BrCN-сефарозой, 4 — олигомеры (II), ковалентно связанные с BrCN-сефарозой

вали одно- и двухстадийный метод. При одностадийном методе обрабатывали глутаровым альдегидом раствор, содержащий смесь пероксидазы, инертных белков и альбумина. При таком методе получения большинство аминокрупп белковых молекул, входящих в олигомер, модифицируется глутаровым альдегидом, поэтому такие олигомеры (IIa) плохо взаимодействуют с BrCN-сефарозой. Кроме того, состав олигомеров, получаемых по одностадийному методу (табл. 2), весьма неоднороден. Реакционная смесь содержит олигомеры с M 50 000—600 000. Доля олигомеров с

Таблица 1

Активность и стабильность препаратов пероксидазы, растворимых и иммобилизованных на BrCN- и SA-сефарозе

| Препарат фермента | Носитель | Удельная активность, нмоль/г (20°, pH 7,0) | $k_{инг} \cdot 10^3$, мин ⁻¹ (56°, pH 7,0) | Максимальная исследованная глубина инактивации, % |
|---|---------------|--|--|---|
| Пероксидаза | В растворе | — | 4,5 | 100 |
| | BrCN-сефароза | 3,2 | 100 | 30 |
| | SA-сефароза | 4,7 | 1,5 | 84 |
| Олигомеры (I) (олигомеры пероксидаза — инертные белки) | В растворе | — | 0,7 | 30 |
| | BrCN-сефароза | — | — | — |
| | SA-сефароза | 6,0 | 2,2 | 92 |
| Олигомеры (II) (олигомеры пероксидаза — инертные белки — альбумин, полученные двухстадийным методом) | В растворе | — | 1,1 | 20 |
| | BrCN-сефароза | 4,4 | 0,2 | 20 |
| | SA-сефароза | — | — | — |
| Олигомеры (IIa) (олигомеры пероксидаза — инертные белки — альбумин, полученные одностадийным методом) | В растворе | — | 0,5 | 30 |
| | BrCN-сефароза | 0,01 | — | — |
| | SA-сефароза | 2,6 | 4,6 | 98 |
| Олигомеры (III) (олигомеры пероксидаза — альбумин, полученные двухстадийным методом) | В растворе | — | 2,5 | 50 |
| | BrCN-сефароза | 0,4 | 2,1 | 50 |
| | SA-сефароза | — | — | — |

Состав растворимых олигомеров (II), (IIa) и (III)
содержание пероксидазы, % ее общего количества в препарате

| № | Препарат | Олигомер, $M \cdot 10^{-3}$ | | | | | | |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|----|-------|---------|---------|-----|-----|
| | | 40 | 50 | 70—80 | 100—140 | 180—220 | 300 | 600 |
| 1 | Нативная пероксидаза Олигомеры | 100 | — | — | — | — | — | — |
| 2 | (IIa) | — | 20 | 31 | 7 | 11 | 21 | 10 |
| 3 | (II) | — | 8 | 25 | 29 | 38 | — | — |
| 4 | (III) | 51 | — | — | 26 | 23 | — | — |

M 100 000—200 000, в которых на одну молекулу пероксидазы приходится 1—2 молекулы альбумина, составляет менее 20%.

Более предпочтительным для наших целей оказался двухстадийный метод получения олигомеров, при котором пероксидазу, высоко или частично очищенную (последняя содержит 72% по весу инертных белков), обрабатывают глутаровым альдегидом, затем отделяют непрореагировавший глутаровый альдегид, к белковому раствору добавляют альбумин и после инкубирования смеси получают олигомеры (II) и (III), состав которых приведен в табл. 2. При использовании двухстадийного метода не образуется высокомолекулярных олигомеров ($M > 220\ 000$). Несколько увеличивается доля олигомеров, в состав которых входит альбумин (67% вместо 50%). Различный состав олигомеров наблюдается при использовании для их получения высоко (олигомеры (III), табл. 2) и частично (олигомеры (II), табл. 2) очищенной пероксидазы. В первом случае лишь 50% пероксидазы входит в состав олигомеров, 50% пероксидазы не входит в олигомеры, и, поскольку ее аминокислотные группы модифицированы глутаровым альдегидом, эта часть фермента практически не связывается с BrCN-сефарозой, что является, по-видимому, одной из причин того, что при иммобилизации олигомеров (III) на BrCN-сефарозе получают препарат с весьма низкой удельной активностью — 0,4 $\mu\text{моль/г}$ (табл. 1). Сравнение состава и стабильности в растворе олигомеров (II) и (III) (см. табл. 1 и 2) показывает, что присутствие инертных белков благоприятно влияет как на состав олигомеров (доля олигомеров, содержащих альбумин, составляет 67% вместо 49%), так и на стабильность иммобилизованного фермента, поскольку ковалентное связывание пероксидазы с инертными белками и альбумином стабилизирует фермент. Следовательно, наиболее пригодны для иммобилизации на BrCN-сефарозе олигомеры пероксидазы — инертные белки — альбумин, получаемые двухстадийным методом (олигомеры (II)). Именно эти олигомеры мы использовали в нашей дальнейшей работе.

Иммобилизация олигомеров (II) на BrCN-сефарозе. При иммобилизации олигомеров (II) на BrCN-сефарозе были получены препараты с гораздо большей удельной активностью, чем при иммобилизации олигомеров (III) (табл. 1). Кроме того, олигомеры (II), иммобилизованные на BrCN-сефарозе, в 24 раза стабильнее нативной пероксидазы в растворе и в 500 раз стабильнее нативной пероксидазы, ковалентно связанной с BrCN-сефарозой (табл. 1; рис. 2, 2 и 4). Для олигомеров (II), ковалентно связанных с BrCN-сефарозой, отмечено весьма интересное явление (см. рис. 2, 4): инкубирование их в суспензии (0,01 н. Na-фосфатный буфер, pH 7,0; 56°) в течение первых 10 ч приводит не к уменьшению активности препарата (что следовало бы ожидать из-за инактивации пероксидазы), а к ее увеличению более чем в 3 раза. Это явление может быть связано с изменением структуры носителя, т. е. с деформацией BrCN-сефарозы при нагревании. Вследствие этого часть олигомеров, ранее недоступных для субстрата, демаскируется. Влияние механической деформации носителя на

каталитические свойства ковалентно связанного с ним фермента отмечали ранее для химотрипсина, иммобилизованного на капроновой нити [12]. Однако подобной активации ферментов, связанных с BrCN-сефарозой, не наблюдали ни другие авторы, ни мы при работе с другими препаратами иммобилизованной пероксидазы. Поэтому более вероятно, что наблюдаемое явление связано с особенностями структуры олигомеров (II) и их взаимодействия с матрицей. При ковалентном связывании олигомеров с BrCN-сефарозой могут возникать определенные напряжения в структуре фермента, входящего в олигомер, в результате чего его активность уменьшается. Длительное (10 ч) воздействие умеренного (56°) нагревания должно приводить к некоторой перестройке нековалентных связей как внутри олигомера, так и в системе матрица — олигомер. Следствием этого может явиться наблюдаемый нами редкий факт возрастания ферментативной активности иммобилизованного фермента после продолжительного нагревания.

Увеличение стабильности олигомеров (II) при иммобилизации на BrCN-сефарозе по сравнению с их стабильностью в растворе может иметь различное объяснение. Возможно, здесь играет определенную роль многоточечное связывание олигомеров с носителем [13, 14]. Более тривиальное, но весьма вероятное объяснение состоит в том, что присутствующие в смеси олигомеры различного состава (табл. 2) способны в различной степени связываться с BrCN-сефарозой. Олигомеры с M 50 000—80 000 не содержат альбумина, все их аминокислотные группы модифицированы глутаровым альдегидом, поэтому их иммобилизации на BrCN-сефарозе практически не происходит. Следовательно, с BrCN-сефарозой в данном случае связываются только олигомеры, содержащие альбумин, а, как известно, именно эти олигомеры составляют наиболее стабильные фракции как в растворе, так и в иммобилизованном состоянии.

Влияние состава олигомеров (II) и условий их иммобилизации на активность и стабильность иммобилизованного фермента. Активность и стабильность препаратов иммобилизованной на BrCN-сефарозе пероксидазы могут в заметной степени зависеть от условий их получения: соотношения концентраций альбумина и пероксидазы в смеси, используемой для получения олигомеров, длительности проведения процесса иммобилизации; соотношения количеств BrCN-сефарозы и олигомеров при иммобилизации. Изучение влияния указанных факторов дало возможность предложить оптимальные условия получения иммобилизованных на BrCN-сефарозе олигомеров (II).

При получении олигомеров (II) мы варьировали соотношение концентраций пероксидазы и альбумина, причем активность иммобилизованных олигомеров (II) была наибольшей в том случае, когда для получения самих олигомеров использовали эквимолярные количества альбумина и пероксидазы. Если в реакционной смеси при иммобилизации присутствовал большой избыток альбумина, удельная активность препаратов иммобилизованного фермента уменьшалась, поскольку значительная доля поверхности была занята молекулами альбумина, ковалентно связанными с BrCN-сефарозой. Стабильность олигомеров (II), связанных с BrCN-сефарозой, не зависела от соотношения исходных концентраций альбумина и пероксидазы при получении олигомеров, поскольку при двухстадийном методе образуются в основном олигомеры одного и того же состава (M 140 000—220 000) независимо от соотношения исходных концентраций альбумина и пероксидазы.

Реакция взаимодействия олигомеров (II) с BrCN-сефарозой — медленный процесс, и обычно используемая длительность инкубации для получения иммобилизованных ферментов (4 ч) [8] недостаточна. Увеличение длительности инкубирования олигомеров (II) в суспензии с BrCN-сефарозой до 24 ч приводит к возрастанию удельной активности препарата более чем в 2 раза.

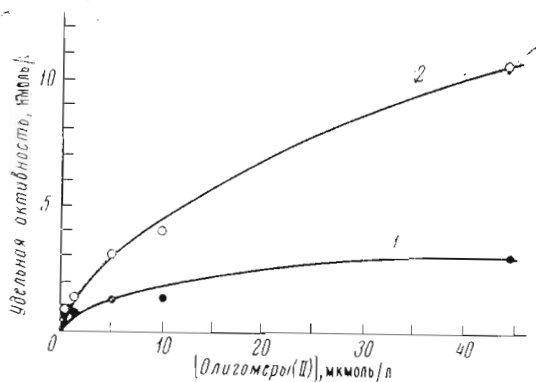


Рис. 3

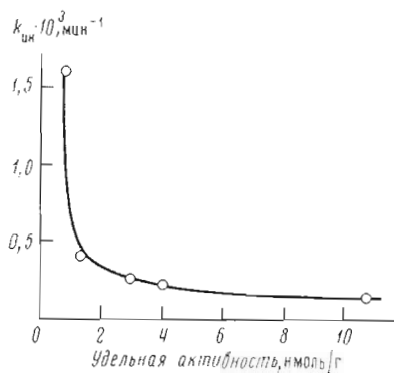


Рис. 4

Рис. 3. Удельная активность ковалентно связанных с BrCN-сефарозой олигомеров (II) в зависимости от их концентрации при иммобилизации. Концентрация олигомеров выражена в количестве активного фермента, входящего в олигомер, которое содержится в единице объема раствора (мкмоль/л). Удельная активность препаратов олигомеры (II) — BrCN-сефароза непосредственно после их получения (1) и после их инкубирования при 56° 10 ч (2)

Рис. 4. Термическая стабильность олигомеров (II) — BrCN-сефароза в зависимости от удельной активности препарата

Удельная активность получаемых препаратов зависит от концентрации олигомеров (II) в смеси при иммобилизации. Увеличение концентрации от 0,5 до 44,5 мкмоль/л приводит к возрастанию удельной активности препарата от 0,5 до 3,2 нмоль/г (рис. 3, 1). После инкубирования препаратов иммобилизованного фермента в суспензии при 56° в течение 10 ч, как уже указывалось выше, их активность значительно возрастает (рис. 3, 2). Степень увеличения активности тем выше, чем выше концентрация олигомеров в смеси при иммобилизации.

Константа инактивации иммобилизованных олигомеров (II) резко уменьшается (от $1,6 \cdot 10^{-3}$ до $0,14 \cdot 10^{-3}$ мин $^{-1}$) при увеличении их концентрации на поверхности (рис. 4). Следовательно, чем выше степень заполнения поверхности BrCN-сефарозы олигомерами (II), тем выше их стабильность. Белок-белковые взаимодействия в случае данных белковых молекул — пероксидазы и альбумина — оказывают стабилизирующее действие на фермент в растворе [4] и при иммобилизации пероксидазы на SA-сефарозе (см. выше). Стабилизирующее действие белок-белковых взаимодействий в случае иммобилизации олигомеров (II) на BrCN-сефарозе проявляется в увеличении стабильности иммобилизованных препаратов при увеличении концентрации олигомеров на поверхности.

Сравнение свойств различных препаратов иммобилизованной пероксидазы (табл. 1) показывает, что наибольшей удельной активностью характеризуется препарат олигомеры (1) — SA-сефароза. Удельная активность препаратов пероксидаза — SA-сефароза и олигомеры (II) — BrCN-сефароза несколько ниже. Последний препарат, однако, обладает значительно большей стабильностью по сравнению с остальными. Поэтому он наиболее пригоден для практического применения.

Экспериментальная часть

В работе использовали пероксидазу из хрена фирмы «Reanal» (Венгрия), высокоочищенную ($D_{403}/D_{278} = 3,3$), как описано в работе [11], и частично очищенную ($D_{403}/D_{278} = 1,0$), которая содержит 72% по весу инертных белков (их молекулярные веса были определены методом гель-фильтрации: 70 000—3%, 40 000—9%, остальные — 10 000—20 000),

25%-ный водный раствор глутарового альдегида фирмы «Merck» (ФРГ), бычий сывороточный альбумин фирмы «Biomed» (Польша), чистый для микроскопии, фракция V, 95% чистоты, ВгCN-сефарозу марки 4В фирмы «Pharmacia» (Швеция). Другие вещества и приготовление рабочих растворов описаны ранее [4,11].

Получение олигомеров (II) и (IIa). При одностадийном методе получения раствор, содержащий 0,4 мг/мл пероксидазы, 1 мг/мл инертных белков, 0,7 мг/мл альбумина и 90 мг/мл глутарового альдегида, инкубировали в 0,01 н. Na-фосфатном буфере (0,1 М KNO_3 , pH 7,0) в течение 24 ч, после чего избыток глутарового альдегида отделяли на сефадексе G-25 (колонка $2,5 \times 18$ см).

При двухстадийном методе к 4,2 мл 0,12 мМ раствора пероксидазы в 0,01 н. Na-фосфатном буфере (pH 7,0; 0,1 М KNO_3) прибавляли 0,8 мл 25%-ного раствора глутарового альдегида, инкубировали 24 ч при 20° и отделяли избыток глутарового альдегида, как указано выше. При использовании высокоочищенной пероксидазы на данной стадии получали пероксидазу, модифицированную глутаровым альдегидом, а при использовании частично очищенной пероксидазы — олигомеры (I) с M 50 000—80 000, аминокруппы которых также были модифицированы глутаровым альдегидом. К полученному раствору пероксидазы или олигомеров (I) добавляли 0,5 мл 1 мМ раствора альбумина (молярное соотношение пероксидаза/альбумин составляло 1 : 1), перемешивали и инкубировали 24 ч при 20°. Состав получаемых олигомеров (II), (IIa) и (III) определяли гель-фильтрацией полученных растворов через сефадекс G-200 (колонка 1×30 см, откалиброванная по ряду стандартных белков).

Получение SA-сефарозы. 200 мг ВгCN-сефарозы, предварительно набухшей (12 ч, 20°) в трижды перегнанной воде, отмывали от декстрана 50 мл 1 мМ раствора HCl, затем инкубировали в 10 мл 0,3 мМ раствора альбумина (4 ч, 20°) при непрерывном встряхивании на качалке. Полученную SA-сефарозу промывали 40 мл 0,1 М NaHCO_3 , содержащего 0,5 М NaCl, затем 6 раз попеременно порциями по 10 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,0), содержащего 1 М NaCl и 0,1 М боратного буфера (pH 8,0), содержащего 1 М NaCl.

Иммобилизация пероксидазы и олигомеров (I) и (IIa) на SA-сефарозе. К 2,6 мл 24 мкМ раствора пероксидазы прибавляли 0,5 мл 25%-ного раствора глутарового альдегида. Инкубировали смесь 24 ч при 20°, отделяли избыток глутарового альдегида, как описано выше. Затем 3,5 мл 10 мкМ раствора модифицированной глутаровым альдегидом пероксидазы или олигомеров (I) или (IIa) смешивали с 100 мг свежеприготовленной SA-сефарозы. Смесь инкубировали 24 ч при постоянном перемешивании (20°) и далее отмывали от сорбированного белка, как описано выше для SA-сефарозы.

Иммобилизация пероксидазы и олигомеров (II), (IIa) и (III) на ВгCN-сефарозе. 100 мг ВгCN-сефарозы, предварительно набухшей (12 ч, 20°), отмывали от декстрана 25 мл 1 мМ раствора HCl, затем при постоянном встряхивании 4 ч инкубировали в 3,5 мл 10 мкМ раствора пероксидазы (или олигомеров) при 20°, после чего полученный препарат обрабатывали последовательно карбонатным, ацетатным и боратным буфером, как указано выше для SA-сефарозы.

Определение числа реакционных аминокрупп в белках проводили по методу Филдса [15] несколько модифицированному нами: к 1,25 мл 0,1 М боратного буфера добавляли 1,15 мл трижды перегнанной воды, 0,1 мл раствора белка и 50 мкл насыщенного раствора тринитробензолсульфокислоты в воде ($\sim 0,1$ М раствор). Смесь перемешивали и записывали изменение оптической плотности раствора при 420 нм в течение 60 мин (до полного окончания реакции). Одновременно выполняли глухой опыт. В использованных в данной работе белках этим методом определено число аминокрупп, реакционных по отношению к глутаровому альдегиду. На-

тивная пероксидаза содержит четыре реакционные аминогруппы. В инертных белках, содержащихся в препарате частично очищенной пероксидазы, на каждые 40 000 а.е.м. приходится 10 реакционных аминогрупп. В молекуле альбумина из 63 лизиновых остатков 26 титруются тринитробензолсульфокислотой. После модификации глутаровым альдегидом пероксидаза и олигомеры (I) не содержат реакционных аминогрупп. Альбумин, модифицированный глутаровым альдегидом, и олигомеры (IIa) содержат по три аминогруппы, титруемые тринитробензолсульфокислотой.

Определение активности растворимых препаратов пероксидазы проводили по начальной скорости окисления (v_0) *o*-дианизидина (0,074 мМ) перекисью водорода (0,14 мМ) в 0,01 н. Na-фосфатном буфере (pH 7,0), содержащем 0,1 М KNO_3 при 20°. Концентрация фермента составляла 0,1—1,0 нМ. Увеличение оптической плотности растворов после их смешения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре SP-1800 фирмы «Rye Unicam» (Англия). Для определения концентрации активного фермента в растворимых препаратах модифицированной пероксидазы был использован калибровочный график зависимости v_0 от концентрации нативной пероксидазы.

Определение активности препаратов иммобилизованного фермента проводили в тех же условиях, что указаны выше для растворимой пероксидазы. Однако при работе с суспензиями более удобным оказалось оставлять реакцию через 1 мин добавлением 0,05 мл 2 н. H_2SO_4 к 2,5 мл реакционной смеси и после этого определять изменение оптической плотности суспензии (в кюветном отделении для мутных сред) при 460 нм. Как было специально проверено, в данных условиях скорость реакции остается постоянной в течение 3—4 мин, поэтому обе методики измерения пероксидазной активности приводили к идентичным результатам.

Удельную активность иммобилизованного фермента выражали в нмоль активного фермента на 1 г ненабухшего носителя (нмоль/г) в предположении, что при иммобилизации пероксидазы ее удельная активность (на 1 мг белка) не изменяется.

Измерение термостабильности растворимой и иммобилизованной пероксидазы. Мерой стабильности растворимого и иммобилизованного фермента в данной работе была выбрана константа скорости мономолекулярной термоинактивации препарата $k_{ин}$ (0,01 н. Na-фосфатный буфер, 0,1 М KNO_3 , pH 7,0) при 56°. При проведении термоинактивации 10 мл суспензии или раствора фермента инкубировали в закрытом сосуде, через определенные интервалы времени отбирали пробы по 0,2 мл и вносили их в 2 мл того же буферного раствора (см. выше) при 20°, а через 4 ч определяли пероксидазную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weliky N., Brown F. S., Dale E. C. (1969) Arch. Biochem. and Biophys., 131, 1—8.
2. Schell H. D., Turcu A., Mateescu M. A. (1973) Rev. roum. biochim., 10, 233—238.
3. Brown G., Thomas D., Gellf G., Domurado D., Berjonneau A. M., Guillon C. (1973) Biotechnol. and Bioeng., 15, 359—375.
4. Березин И. В., Кершенгольц Б. М., Угарова Н. Н. (1975) Докл. АН СССР, 223, 1256—1259.
5. Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М. (1974). Тезисы I Всесоюзного симпозиума, с. 31, Таллин.
6. Hoffman C. H., Harris E., Chodroff S., Michelson S., Rothrock I. W., Peterson E., Reuter W. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 41, 710—714.
7. Axen R., Porath J., Ernback S. (1967) Nature, 214, 1302—1304.
8. Axen R., Ernback S. (1971) Eur. J. Biochem., 18, 351—360.
9. Плаксина Е. А., Склянкина В. А., Мевх А. Т., Аваева С. М. (1975) Биоорган. химия, 1, 558—562.
10. Green M. L., Crutchfield G. (1969) Biochem., J., 115, 183—190.
11. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бровко Л. Ю. (1975) Биохимия, 40, 297—301.
12. Berezin I. V., Klibanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K. (1975) in Immobilized Enzymes (Mosbach K., ed.), Acad. Press, N. Y.

13. Иммуобилизованные ферменты, под ред. Березина И. В., Антонова В. К., Мартиника К. (1975) Изд. МГУ, гл. 5.
14. Суровцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1971) Биохимия, 36, 199—204.
15. Fields R. (1971) Biochem. J., 124, 581—590.

Поступила в редакцию
15.VII.1975

STABILIZATION OF PEROXIDASE COVALENTLY ATTACHED TO SEPHAROSE

KERSHENGOL'TS B. M., UGAROVA N. N., BEREZIN I. V.

*Chemistry Department, M. V. Lomonosov State
University, Moscow*

A technique was developed to eliminate a fall in the enzyme stability which was produced by covalent coupling of peroxidase to BrCN-Sepharose. It involves peroxidase pretreatment with glutaraldehyde in the presence of inert proteins and serum albumin that results in soluble peroxidase-inert protein-albumin oligomers possessing a 24 times higher stability in solution than the native enzyme. Immobilization of the oligomers on Sepharose yields highly active preparations with thermal stability 500 times higher than that of non-modified peroxidase covalently attached to Sepharose.
