



УДК 577.156

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ КИСЛЫХ ПРОТЕИНАЗ

*Крылова Ю. И., Козлов Л. В., Антонов В. К.,  
Гаина В. С., Датуншвили Е. Н., Павленко Н. М.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва  
Всесоюзный научно-исследовательский институт виноградарства и  
виноделия «Магарач», Ялта*

Изучены возможности иммобилизации пепсина и родственных ему кислых протеиназ из *Aspergillus awamori* и *Aspergillus oryzae* с использованием методов, ранее не применявшихся для получения нерастворимых производных этого типа ферментов: активации носителей цианурхлоридом, солями титана и введения галоацетильной группы. Изучены различные носители для каждого метода иммобилизации. Проведено сравнение метода иммобилизации с помощью солей титана и известного метода с использованием карбодимида и показано, что первый метод имеет преимущества в плане практического использования.

Кислые протеиназы пепсинового типа обладают рядом специфических свойств, создающих определенные трудности для их иммобилизации. Они неустойчивы при щелочных и нейтральных значениях рН, что препятствует применению большинства методов иммобилизации. Они, как правило, содержат мало аминокрупп, и, кроме того, в той области рН, в которой эти ферменты устойчивы, аминокруппы протонированы, что затрудняет их ацилирование и алкилирование. Поэтому для иммобилизации пепсина и кислых протеиназ до сих пор применялись два основных подхода: проведение реакций при слабокислых значениях рН с аминокруппами или с карбоксильными группами фермента. Связывание с аминокруппами осуществляли при иммобилизации пепсина с помощью глутарового альдегида [1], при взаимодействии ренина с агарозой, активированной бромцианом [2], а также при иммобилизации на том же носителе пепсиногена с последующей его активацией [3]. Все эти препараты при кислых значениях рН теряют частично или полностью свою активность вследствие десорбции фермента в раствор.

Присоединение пепсина его карбоксильными группами к носителю осуществляли сополимеризацией фермента с желатиной или аминокислотами [4], конденсацией пепсина с помощью растворимого карбодимида с аминоксиланированным стеклом [5], а также методом четырехкомпонентной конденсации [6]. Применение этих методов сопряжено с использованием дорогостоящих реагентов, а в ряде случаев весьма сложно.

Мы исследовали возможности применения для кислых протеиназ других способов иммобилизации, а именно использование более активного реагента на аминокруппы — цианурхлорида, образование комплексов фермента с носителем с помощью солей титана, а также способность метио-

## Иммобилизация кислых протеиназ на носителях, активированных цианурхлоридом

Фермент	Носитель	Форма хранения образца	Активность образца, мг/г	Активность образца через месяц, %
Пепсин	DE-32	Сухой	10,0	100
	DEAE-целлюлоза (ОЗХР), порошкообразная	»	8,0	100
	»	Влажный	8,0	86
	DEAE-целлюлоза (ОЗХР), волокнистая	Сухой	3,2	92
	»	Влажный	1,8	80
	Целлюлоза FND (ГДР)	»	0,3	80
	Силикагель L (ЧССР)	»	0,1	—
	Силохром II	Сухой	0,3	—
	»	Влажный	0,22	—
	Силикагель МСА	»	0,6	—
Бентонит	»	0,09	—	
Асронгель				
Оризин	De-32	Сухой	1,5	100
	DEAE-целлюлоза (ОЗХР), порошкообразная	»	1,0	100
	Силохром II	Влажный	0,16	—
Аваморин	Силикагель СК	»	0,26	100

ниновых остатков пепсина реагировать с галоацетильными производными носителя [7].

Иммобилизация на целлюлозных носителях, активированных цианурхлоридом [8], проводится, как правило, при нейтральных и слабощелочных значениях pH. Однако недавно Смитом и Ленгофом [9] было показано, что наиболее благоприятными условиями для связывания белков в этом методе иммобилизации являются значения  $\text{pH} < 7$ . Мы исследовали возможность иммобилизации этим методом пепсина и кислых протеиназ из *Aspergillus oryzae* (оризин) и *Aspergillus awamori* (аваморин). В качестве носителей использовали различные образцы DEAE-целлюлозы, порошкообразную целлюлозу, бентонит, силикагели и силохром II. Целлюлозные носители обрабатывали предварительно щелочью, как рекомендовано в работе [9].

Неорганические силикатные носители перед проведением реакций с ферментом, как правило, силанизируют обработкой  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисиланом [5].

Мы полагали, что такие носители, как силикагель и силохромы, содержат достаточно реакционноспособные для наших методов активации гидроксильные группы и поэтому можно было обойтись без введения аминогрупп и тем самым упростить и удешевить процесс. Данные по иммобилизации кислых протеиназ с помощью цианурхлорида приведены в табл. 1. Во всех образцах активность определялась по высокомолекулярному субстрату — гемоглобину. По низкомолекулярному субстрату Ac-Phe-Tyr активность, как правило, выше, чем по белковому, и, например, для иммобилизованного на DE-32 пепсина имеет значение 92 мг/г, т. е. в полученных образцах активность по гемоглобину составляет 10% активности по синтетическому субстрату. Иммобилизация на носителях, несущих заряд, противоположный заряду фермента, дает лучшие результаты, чем иммобилизация на нейтральных носителях (DEAE-целлюлоза по сравнению с целлюлозой). Ионная сорбция на носителе создает большую концентрацию фермента на носителе и при химическом связывании способствует иммобилизации большего количества белка. Данные по связыванию на

## Иммобилизация кислых протеиназ на носителях, активированных солями титана

№ образца	Фермент	Носитель	Способ активации носителя	Форма хранения образца	Активность образца, мг/г		
1	Пепсин	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Ti <sup>4+</sup>	Влажный	0		
2			Ti <sup>4+</sup> , 540°	»	1,8		
3			Ti <sup>4+</sup> , 540°	Сухой	0,56		
4		Силохром С-80	Ti <sup>3+</sup>	Влажный	2,6		
5			Ti <sup>3+</sup> , 540°	»	1,6		
6			Ti <sup>3+</sup> , 540°	»	0,24		
7			Ti <sup>4+</sup> , 540°	»	0,6		
8			Силохром С-120	Ti <sup>4+</sup>	»	3,4	
9				Ti <sup>4+</sup>	Сухой	0,3	
10		Ti <sup>4+</sup> , 540°		Влажный	2,0		
11		Силикагель МСА	Ti <sup>4+</sup> , 540°	Сухой	0,36		
12			Ti <sup>4+</sup>	Влажный	0,3		
13			Оризин	Sилохром С-80	Ti <sup>3+</sup> , 540°	»	0,3
14				Ti <sup>4+</sup> , 540°	»	0,5	
15			Аваморин	Силикагель МСА	Ti <sup>4+</sup>	»	0,2

силикагелях показывают, что можно использовать последние без предварительной силанизации. Существенную роль, вероятно, играет пористость носителя, так как активность на крупнопористых образцах — силикагеле МСА (650 Å) и силохроме II (1200 Å) — выше активности фермента на носителе с меньшим размером пор — силикагеле I (80 Å). Более низкие активности иммобилизованных оризина и аваморина объясняются, по-видимому, использованием недостаточно очищенных препаратов ферментов. Хранение лиофильно высушенных препаратов в течение месяца не приводит к падению активности; влажные препараты в ряде случаев несколько снижали свою активность при хранении в буферном растворе, pH 4,5.

Галлоидатильные производные носителей применяют, как правило, для иммобилизации при слабощелочных значениях pH в расчете на алкилирование аминокрупп белка. Описан, по-видимому, лишь один случай иммобилизации кислой протеиназы — аспергиллопептидазы на бромцетилстекле при pH 4,5 [10]. В работе Локшиной и Ореховича [7] было показано, что йодацетамид модифицирует остаток метионина в пепсине при кислых значениях pH без существенного изменения активности фермента. Эти данные позволили надеяться на успех при использовании галлоидатильных производных носителей для иммобилизации пепсина. Полученные нами результаты по иммобилизации пепсина на бромцетилцеллюлозе с высоким содержанием активного брома (до 20%) показывают, что содержание активного по гемоглобину пепсина составляло 1,76 мг на 1 г препарата.

Недавно был предложен новый метод иммобилизации, основанный на способности окислов переходных металлов давать комплексные соединения с гидроксильными группами носителя и фермента [11]. Метод активации четыреххлористым титаном был применен к носителям, обладающим высокой удельной массой, для использования в реакторах с «кипящим слоем». Для этих целей в качестве носителей были испытаны нержавеющая сталь, окис никеля и окис алюминия [12]. Иммобилизация ферментов по этому методу проводится в слабокислых условиях (pH 4,5), что позволяет применять его для связывания с носителем кислых протеиназ. Однако до настоящего времени кислые протеиназы данным методом, по-ви-

Сравнение методов иммобилизации кислых протеиназ

Фермент	Носитель	Метод активации носителя	Форма хранения образца	Активность образца, мг/г
Пепсин	Силохром С-80	Ti <sup>4+</sup> , 540°	Влажный	0,6
		КДИ	»	1,18
		»	Сухой	0,6
Оризин		Ti <sup>4+</sup> , 540°	Влажный	0,5
		КДИ	»	0,335
		»	Сухой	0,160
Аваморин	Силикагель МСА	Ti <sup>4+</sup>	Влажный	0,2
		КДИ	»	0,4

димому, не иммобилизовали. Мы исследовали возможность иммобилизации кислых протеиназ на окиси алюминия, крупнопористом силикагеле МСА и силохромах с помощью солей титана — хлорида четырехвалентного титана и сульфата трехвалентного титана. Оказалось, что соли трехвалентного и четырехвалентного титана можно применять для иммобилизации кислых протеиназ на этих носителях (табл. 2). Трехвалентный титан на окиси алюминия, по-видимому, дает лучшие результаты, чем четырехвалентный, в то время как на силохромах лучшие результаты получены с четырехвалентным титаном. Не совсем ясно влияние прокаливания носителя после обработки солями титана и перед иммобилизацией. Такое прокаливание при 540° было рекомендовано авторами работы [12]. В наших опытах прокаливание иногда приводило к существенному повышению активности препаратов (ср. обр. 1 и 2), а иногда несколько снижало ее (обр. 4 и 5, 8 и 10). При лиофильном высушивании она существенно падала (обр. 3, 9 и 11), однако при хранении уже лиофилизированные образцы сохраняли активность полностью. Активность влажных образцов нестабильна (табл. 2).

Следует отметить, что на количество иммобилизованного активного фермента большее влияние при этом способе иммобилизации оказывает не размер пор носителя, а его удельная поверхность. Количество иммобилизованного фермента растет в ряду: силикагель МСА (удельная поверхность 40 м<sup>2</sup>/г), силохром С-80 (80 м<sup>2</sup>/г), силохром С-120 (120 м<sup>2</sup>/г).

Для сравнения методов иммобилизации мы получили нерастворимые производные тех же ферментов и на тех же носителях путем предварительной силикации носителей  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилопаном и конденсации с ферментом с помощью водорастворимого карбодимида (КДИ), как это описано для иммобилизации пепсина на стекле в работе [5]. Лиофилизация препаратов, полученных с помощью карбодимида, приводит также к падению активности в 2 раза (табл. 3). Количества активного связанного фермента при использовании этих методов практически одинаковы, однако метод комплексообразования с солями титана прост и дешев.

Полученные в работе данные свидетельствуют о применимости для иммобилизации кислых протеиназ на целлюлозных носителях активации цианурхлоридом, а на неорганических носителях активации солями титана и указывают возможные пути дальнейшего развития исследований по иммобилизации ферментов при кислых значениях рН.

#### Экспериментальная часть

В работе были использованы пепсин свињи с активностью по гемоглобину 3000 ед./мг, кислая протеиназа из *Aspergillus awamori* штамм 78-2 с активностью 1900 ед./мг, кислая протеиназа из *Aspergillus oryzae* штамм

251 с активностью 1800 ед./мг. Активность определяли по модифицированному методу Ансона [13], в случае же иммобилизованных ферментов при инкубации с раствором гемоглобина дополнительно осуществляли перемешивание.

В качестве носителей для иммобилизации использовали: силохром II (диаметр пор 1200 Å, удельная поверхность 47 м<sup>2</sup>/г), силохром С-80 (350 Å, 80 м<sup>2</sup>/г), силохром С-120 (250 Å, 120 м<sup>2</sup>/г), силикагель МСА (650 Å, 40 м<sup>2</sup>/г), силикагель Л «Сметарол» (ЧССР) (80 Å, диаметр частиц 100—160 мкм), силикагель СК, бентонит Асконгель (диаметр частиц 160—250 мкм), окись алюминия (80—160 мкм), силохром С-80, силанизированный  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилоном, согласно [5], с емкостью 0,6 мэкв/г, образцы DEAE-целлюлозы — DE-32 («Whatman», Англия), порошкообразную (ОЗХР), волокнистую (ОЗХР), целлюлозу FND (ГДР), бромацетилцеллюлозу порошкообразную с содержанием 20% активного брома, любезно предоставленную А. К. Аренсом (ОЗХР).

*Иммобилизация с помощью цианурхлорида.* Целлюлозные носители предварительно обрабатывали щелочью, как рекомендовано в работе [9]. 2,5 г минерального носителя, или 1 г целлюлозы, или 0,5 г DEAE-целлюлозы перемешивали с 50 мл 5%-ного раствора цианурхлорида в смеси диоксан — ксилол (1 : 1 по объему) или диоксан — толуол (4 : 1 по объему) в течение 30 мин на магнитной мешалке. Носитель отделяли центрифугированием и промывали смесью диоксан — ксилол или диоксан — толуол 3 раза по 50 мл, 50 мл смеси CH<sub>3</sub>COOH — вода — диоксан (1 : 1 : 2 по объему) и 150 мл ацетона. Активированный носитель высушивали и хранили над щелочью.

Полученное количество активированного носителя инкубировали с 50 мл 1%-ного раствора фермента в 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,5, в течение 1 ч при комнатной температуре на качалке, а затем еще 12 ч на качалке в холодной комнате при 4°. Препарат отделяли центрифугированием, промывали тем же буфером (50 мл), 1 М NaCl в том же буфере до исчезновения светопоглощения при 280 нм в промывных жидкостях, 0,1 М ацетатным буфером, рН 5,5, до отсутствия в промывной жидкости ионов хлора. Препараты хранили во влажном виде в 0,1 М ацетатном буфере, рН 5,5, при 4° или лиофильно высушенными при 4° или при комнатной температуре.

*Иммобилизация на бромацетилцеллюлозе.* Бромацетилцеллюлозу, хранящуюся в буферном растворе, промывали 0,1 М ацетатным буфером, рН 4,0, влажный носитель (5 г) добавляли к 50 мл 1%-ного раствора фермента в том же буфере. Смесь перемешивали на качалке 1 ч при комнатной температуре, затем 12 ч при 4°. Промывали и хранили препарат аналогично описанному выше.

*Иммобилизация с помощью солей титана.* Носитель (10 г) суспендировали в 50 мл дистиллированной воды при охлаждении до 5—10°, порциями по 1 мл через каждые 5 мин добавляли 5 мл TiCl<sub>4</sub> при интенсивном перемешивании и охлаждении. Через 30 мин носитель отделяли, промывали 0,01 н. HCl, водой до нейтральной реакции, высушивали на воздухе и прокальвали при 540° в течение 1 ч.

При использовании сульфата трехвалентного титана к 10 г носителя приливали 10 мл 15%-ного раствора Ti<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> в H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, смесь выдерживали при комнатной температуре 2—3 ч, отмывали водой до нейтральной реакции и прокальвали при 540° в течение 1 ч.

Активированный носитель (10 г) инкубировали с 50 мл 0,1—1%-ного раствора фермента в 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,5, при перемешивании на качалке при 4° в течение 20 ч. Промывка и хранение препаратов аналогичны.

*Иммобилизация с помощью водорастворимого карбодимиды.* К смеси 0,5 г силохрому С-80, силанизированного  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилоном, и раствора 10 мг фермента в 3 мл дистиллированной воды добавляли

раствор 50 мг 1-циклогексил-3-(2-морфолил-(4-этил)-карбодиимида в 1 мл воды, поддерживая 0,1 н. HCl pH 4,0, затем в течение 1 ч поддерживали pH 4,0 и оставляли смесь на 20 ч при 4°. Препарат фермента отделяли центрифугированием и промывали 0,01 н. HCl, 1 М NaCl до исчезновения светопоглощения при 280 нм в промывных жидкостях и снова 0,01 н. HCl. Хранили препарат во влажном виде в 0,01 н. HCl при 4° либо в лиофильно-сухом виде при комнатной температуре.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ryle A. P. (1972) *Int. J. Pept. and Protein Res.*, **4**, 123—125.
2. Green M. L., Crutchfield G. (1969) *Biochem. J.*, **115**, 183—190.
3. Bustin M., Conway-Jacobs A. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 615—620.
4. Rao S. S., Patki V. M., Kulkarni A. D. (1970) *Indian J. Biochem.*, **7**, 210—211.
5. Line W. F., Kwong A., Weetall H. (1971) *Biochem. et biophys. acta*, **242**, 194—202.
6. Vrethland P., Axén R. (1971) *FEBS Lett.*, **18**, 254—256.
7. Локшина Л. А., Орехович В. Н. (1964) *Биохимия*, **29**, 346—352.
8. Kay G., Crook E. M. (1967) *Nature*, **216**, 514—515.
9. Smith N. L., Lenhoff H. M. (1974) *Anal. Biochem.*, **61**, 392—415.
10. Chin C. C. Q., Wold F. (1974) *Anal. Biochem.*, **61**, 379—391.
11. Emery A. N., Barker S. A., Novais J. M., (1972) Пат. ФРГ 2206360; С. А. (1973) **78**, 13345b.
12. Hasselberger F. X., Allen B., Paruchuri E. K., Charles M., Coughlin R. W. (1974). *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **57**, 1054—1062.
13. *Worthington enzyme manual* (1972) pp. 122—123. Worthington Biochemical Corporation, Freehold.

Поступила в редакцию  
12.VIII.1975

#### IMMOBILIZATION OF ACID PROTEINASES

KRYLOVA Yu. I., KOZLOV L. V., ANTONOV V. K.,  
GAINA B. S., DATUNASHVILI E. N., PAVLENKO N. M.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow; All-Union Research  
Institute of Viticulture and Wine-Making «Magarach», Jalta*

The possibility of pepsin immobilization and that of related acid proteinases from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus awamori* was studied using several methods previously not employed for this type of enzymes, viz., carriers activation by cyanuric chloride and titanium salts, as well as by halogenacetyl groups introduction. A number of carriers were examined in each immobilization procedure. Immobilization with titanium salts offers some practical advantage as compared with well-known carbodiimide method.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20/XI-1975 г.	Т-19335	Подписано к печати 9/1-1976 г.	Тираж 850 экз.
Зак. 3089	Формат бумаги 70×108 <sup>1/16</sup>	Усл. печ. л. 12,6	Бум. л. 4,5
			Уч.-изд. л. 13,2

2-я типография издательства «Наука». Москва. Шубинский пер., 10