



УДК 577.152.342.1*1.042

ЗАВИСИМОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОГО α -ХИМОТРИПСИНА В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СМЕСЯХ ОТ КОМПОЗИЦИИ МИКРООКРУЖЕНИЯ (ЖЕСТКОЙ МАТРИЦЫ И ГИДРАТИРУЮЩИХ ДОБАВОК)

© 1995 г. Э. О. Каменская*, И. К. Сакодынская, А. В. Левашов

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 118899, Москва, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 02.02.95 г.

Исследована зависимость каталитической активности иммобилизованного на вязком носителе α -химотрипсина в смесях изопропанол-вода ($H_2O < 10\%$) от содержания воды. Найдено, что добавление циклического полиэфира 18-краун-6 в раствор α -химотрипсина перед иммобилизацией приводит к значительному (в 7 - 10 раз) увеличению ферментативной активности в исследуемой системе, при этом каталитическая активность составляет примерно 10% от наблюдаемой в водном растворе.

Ключевые слова: α -химотрипсин иммобилизованный; ферментативный катализ в водно-органических смесях; полиэфир 18-краун-6.

Биокатализ в водно-органических смесях с низким содержанием воды – самостоятельный раздел энзимологии, интенсивно развивающийся в последние годы [1, 2]. Поиск условий, при которых наблюдается наибольшая каталитическая активность ферментов, важен для выяснения способов организации и функционирования ферментов, в частности для выяснения роли воды в биокатализе. Работа в этом направлении важна с точки зрения прикладной энзимологии в плане создания эффективных технологичных биокатализаторов.

Непосредственный контакт молекулы фермента с молекулами органического растворителя приводит к изменению каталитически активной конформации молекулы фермента (инактивации) [3]. Один из способов защиты фермента от этого нежелательного процесса заключается в закреплении его активной конформации путем включения молекулы фермента в жесткую матрицу. Это реализуется при нековалентной иммобилизации фермента на твердом носителе (молекулы фермента включаются в тесные поры носителя) или при лиофилизации (активный фермент включается в жесткую структуру, формирующуюся при лиофилизации) [4].

Однако для достижения высокого уровня ферментативной активности в водно-органических смесях с низким содержанием воды часто бывает недостаточно только защитить фермент от денатурации органическим растворителем. Необходимо также повысить локальную концентрацию воды около молекулы фермента [5], что может быть достигнуто добавлением в раствор фермен-

та перед лиофилизацией или иммобилизацией веществ, обладающих гидратирующими свойствами. Такие вещества мы предлагаем называть гидратирующими добавками. В литературе описан ряд примеров, когда введение в раствор фермента перед лиофилизацией низкомолекулярных неорганических (“буферных”) солей [4], веществ, имеющих в своем составе гидроксильные группы и простые эфирные связи (многоатомных спиртов [6], углеводов [7, 8], полиэтиленгликолей [7], т.е. соединений, которые можно рассматривать как гидратирующие добавки), на несколько порядков повышало каталитическую активность лиофилизованных ферментов, суспендированных в органическом растворителе или водно-органической смеси с низким содержанием воды. Следует отметить, что роль гидратирующих добавок ограничивается не только созданием благоприятного водного окружения фермента, но и участием этих веществ в формировании жесткой матрицы вокруг фермента во время лиофилизации или иммобилизации.

Простые циклические полиэфиры (краун-эфиры) также можно рассматривать как эффективные гидратирующие добавки: было показано, что добавление полиэфира 18-краун-6 в раствор химотрипсина перед лиофилизацией увеличивает каталитическую активность суспендированного лиофилизованного фермента [9, 10]. Цель настоящей работы – исследование влияния полиэфира 18-краун-6 (далее краун-эфир) как гидратирующей добавки на каталитическую активность иммобилизованного α -химотрипсина (далее химотрипсин).

Изучение гидролиза BTNA, катализируемого иммобилизованным на вискозе химотрипсином, в присутствии разных количеств краун-эфира показало (рис. 1), что каталитическая активность

Сокращения: BTNA – *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина,
E – α -химотрипсин, CE – полиэфир 18-краун-6.

* Автор для переписки.

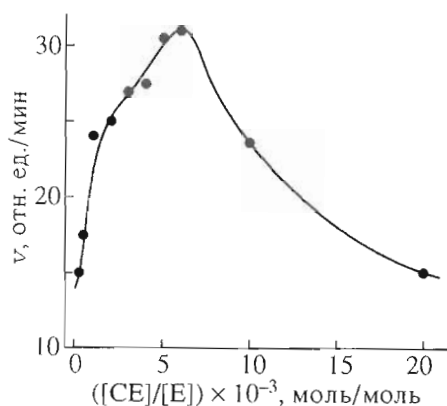


Рис. 1. Зависимость активности иммобилизованного химотрипсина от содержания краун-эфира в растворе фермента перед иммобилизацией. [BTNA] 1 мМ. Условия см. в "Экспер. части"; изопропанол-вода, 17 : 3.

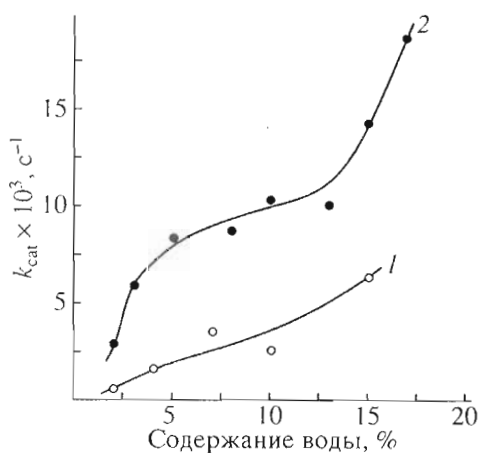


Рис. 2. Зависимость от содержания воды в системе каталитических констант гидролиза BTNA, катализируемого химотрипсином, иммобилизованным без добавок (1) и в присутствии краун-эфира (2) ($[CE]/[E]$ 6000 моль/моль). Условия см. в "Экспер. части".

химотрипсина максимальна при соотношении $[CE]/[E] = 6000$ моль/моль. Подобная зависимость для лиофилизованного фермента также представляет собой кривую с максимумом при соотношении $[CE]/[E]$, равном 250 моль/моль [10]. Дальнейшие исследования проводили, добавляя оптимальное количество полиэфира в раствор фермента перед иммобилизацией. Удаление носителя с ферментом из реакционной смеси приводит к прекращению гидролиза субстрата. Это свидетельствует о том, что вся наблюдаемая каталитическая активность локализуется на носителе.

Добавление краун-эфира при иммобилизации химотрипсина ведет к значительному (в 7 - 10 раз) увеличению ферментативной активности (рис. 2). По нашему мнению, этот эффект обусловлен влиянием краун-эфира как гидратирующей добавки. В системе органический растворитель-носитель-иммобилизованный на носителе фермент происходит перераспределение воды между ком-

понентами системы в соответствии с их средством к воде. Согласно данным [5, 11, 12], каталитическая активность фермента определяется локальной концентрацией воды на носителе вблизи фермента, а не общим содержанием воды в системе. Присутствие на носителе краун-эфира, по-видимому, приводит к увеличению локальной концентрации воды около фермента и, как следствие, к росту каталитической активности. Кроме того, мы полагаем, что присутствие краун-эфира во время иммобилизации способствует включению молекулы фермента в матрицу с жесткой структурой, которая закрепляет активную конформацию фермента и защищает его от денатурации молекулами органического растворителя.

Каталитическая активность химотрипсина при низком (меньше 10%) содержании воды в изопропанол в присутствии краун-эфира сохраняется на уровне 5 - 10% его активности в воде - $k_{cat} 9 \times 10^{-2} s^{-1}$ (рис. 2). Следует подчеркнуть, что в отсутствие гидратирующих добавок в водно-органических системах с низким содержанием воды каталитическая активность иммобилизованных и суспендированных ферментов обычно не превышает 1 - 2% их активности в воде [4, 10 - 12].

Таким образом, в работе предложен способ повышения каталитической активности иммобилизованных ферментов в системах с низким содержанием воды путем подбора композиции микроокружения фермента: введение в раствор фермента перед иммобилизацией гидратирующих добавок и закрепление активной конформации фермента в процессе иммобилизации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали циклический полиэфир 18-краун-6, BTNA и *N-транс*-циннамоилимидазол (Sigma, США); растворители и низкомолекулярные вещества отечественного производства (марок ч. д. а. и ос. ч.) без дополнительной очистки.

α -Химотрипсин из поджелудочной железы быка (КФ 3.4.21.1, Sigma, США) дополнительной очистке не подвергался. По данным титрования активных центров *N-транс*-циннамоилимидазолом по стандартной методике [13], содержание активного фермента в препарате составляло 62%. Носителем для иммобилизации химотрипсина служил коммерческий образец ткани из вискозного волокна.

Иммобилизацию химотрипсина проводили на квадратных кусочках (6 × 6 мм) вискозного носителя. Раствор химотрипсина (4×10^{-5} М) готовили в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.9 (буфер А), в присутствии такого количества краун-эфира, которое удовлетворяло соотношению $[CE]/[E] = 100 - 20000$ моль/моль. Раствор фермента (30 мкл) наносили в центр квадрата из носителя, который затем сушили 2 ч на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы или

высушивали лиофильно. Каталитическая активность препаратов, высушенных на воздухе и лиофильно, была одинаковой (с учетом экспериментальной ошибки). Специально было показано, что удельная активность химотрипсина не зависит от исходной концентрации фермента в растворе при $[E] < 8 \times 10^{-5}$ М и резко уменьшается при более высоких исходных концентрациях фермента. Этот факт можно объяснить повышением скорости автолиза при увеличении концентрации химотрипсина. Контрольные препараты иммобилизованного химотрипсина готовили так же, но без добавления краун-эфира. Аналогично получали контрольные препараты носителя с краун-эфиром, но без фермента.

Определение каталитической активности химотрипсина в водных растворах. К 2 мл буфера А добавляли 2 - 18 мкл 3 мМ раствора ВТНА в диоксане и 10 мкл 1.6×10^{-4} М раствора химотрипсина в 1 мМ НСl. За образованием продукта реакции (*n*-нитроанилина) следили, определяя оптическое поглощение раствора (20°C, λ 385 нм) с использованием двулучевого спектрофотометра Beckman E-25 (США) с термостатируемым кюветным отделением.

Отдельно было показано, что добавки органического растворителя (до 10 об. %), вносимые с запасным раствором субстрата, не влияют на наблюдаемые скорости реакции.

Определение каталитической активности иммобилизованного химотрипсина в смесях изопропанол-вода. В спектрофотометрической кювете смешивали 10 - 200 мкл 30 мМ раствора ВТНА в диоксане, 60 - 400 мкл воды и изопропиловый спирт так, чтобы объем смеси был равен 2 мл. Реакцию начинали введением в кювету вязкого носителя с иммобилизованным химотрипсином и проводили при механическом встряхивании. За ходом реакции следили спектрофотометрически, как описано выше, периодически определяя величину оптического поглощения в системе (при этом

носитель с ферментом опускался на дно кюветы и не попадал в световой пучок спектрофотометра).

В независимом эксперименте определяли коэффициент молярного поглощения *n*-нитроанилина в изопропанол, содержащем воду в разных концентрациях.

Данная работа частично финансировалась из средств Государственной научно-технической программы 08.05 "Новейшие методы биоинженерии", направление - "Инженерная энзимология" (грант 1-535).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khmel'nitsky Yu.L., Levashov A.V., Klyachko N.L., Martinek K. // Enzyme Microb. Technol. 1988. V. 10. P. 709 - 724.
2. Gurta M.N. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 203. P. 25 - 32.
3. Mozhaev V.V., Khmel'nitsky Yu.L., Sergeeva M.V., Belova A.B., Klyachko N.L., Levashov A.V., Martinek K. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 184. P. 597 - 602.
4. Khmel'nitsky Yu.L., Welch S.H., Clark D.S., Dordick J.S. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116(6). P. 2647 - 2648.
5. Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 172. P. 573 - 578.
6. Yamane T., Ichiryu T., Nagata M., Ueno A., Shimizu S. // Biotechnol. Bioeng. 1990. V. 36. P. 1063 - 1069.
7. Dabulis K., Klivanov A.M. // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 41. P. 566 - 571.
8. Otamiri M., Adlercreutz P., Mattiasson B. // Biocatalysis. 1992. V. 6. P. 291.
9. Bross J. Enzymes in Organic Media: Effects of Crown Ethers and Other Organic Additives on the Activity and Selectivity. Thesis Enschede. Universiteit Twente. Netherlands, 1994.
10. Bross J., Sakodinskaya I.K., Engbersen J.F.J., Verboom W., Reinhoudt D.N. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1995. P. 255.
11. Adlercreutz P. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 199. P. 609 - 614.
12. Erp S. van, Kamenskaya E.O., Khmel'nitsky Y.L. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 202. P. 379 - 384.
13. Schonbaum G.R., Zerner B., Bender M.L. // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. P. 2930 - 2935.

Dependence of Immobilized α -Chymotrypsin Activity in Water-Organic Solvent Mixtures upon Composition of Microsurroundings (Rigid Matrix and Hydrating Additives)

E. O. Kamenskaya*, I. K. Sakodinskaya, and A. V. Levashov

Moscow State University, Chemical Faculty, Moscow, 119899 Russia

Abstract - Dependence of catalytic activity of α -chymotrypsin immobilized on viscose in isopropanol-water mixtures (water content < 10%) on the water content was investigated. An addition of a cyclic polyether, 18-crown-6, to the solution of α -chymotrypsin before immobilization was found to lead to a significant (7 to 10 times) increase of enzymic activity in the system studied, and this activity reached approximately 10% of that in water solution.

Key words: α -chymotrypsin immobilized, enzymic catalysis in water-organic solvent mixtures, 18-crown-6.

* To whom correspondence should be addressed.