



УДК 577.152.02

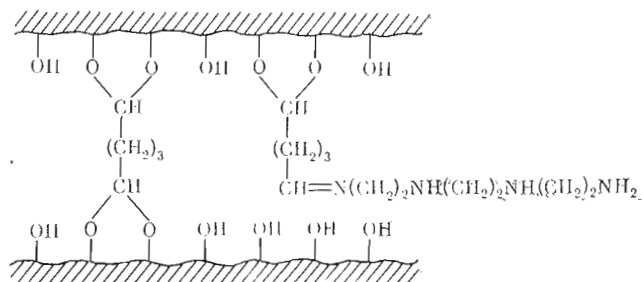
КООРДИНАЦИОННО-ИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

III*. СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОАЦИЛАЗЫ НА СПИТОМ ПОЛИВИНИЛОВОМ СПИРТЕ
ЧЕРЕЗ КОМПЛЕКСЫ КОБАЛЬТА, НИКЕЛЯ, МЕДИ И ЖЕЛЕЗА*Ямсков И. А., Буданов М. В., Лобарева Л. С.,
Даванков В. А.**Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва*

Изучен процесс иммобилизации аминоксилы координационно-ионным методом с использованием в качестве металлов-комплексобразователей ионов Co(II) , Ni(II) , Cu(II) , Fe(III) , Co(III) . Связывание фермента осуществлялось на поливиниловом спирте, спитом глутаровым диальдегидом и содержащем хелатирующие тетрадекатные группировки триэтилентетрамина. Сравнены свойства иммобилизованных препаратов, полученных при использовании аминоксилы различной степени очистки. Изучена зависимость стабильности иммобилизованных препаратов от природы металла-комплексобразователя. Показана возможность селективного связывания аминоксилы металлсодержащими носителями.

В предыдущих сообщениях была рассмотрена иммобилизация пенициллинамидогидролазы (КФ 3.5.1.11) из *E. coli* путем образования координационных соединений катионов переходных металлов с функциональными группами носителя и фермента [1, 2]. Настоящая работа посвящена иммобилизации с помощью координационного метода металлозависимой аминоксилы (КФ 3.5.1.14) из *Asp. oryzae*. Этот фермент интересен способностью энантиоселективно гидролизовать рацемические N-ацетильные производные ряда аминокислот [3, 4].

Для иммобилизации аминоксилы был использован гидрофильный носитель на основе поливинилового спирта, спитого глутаровым диальдегидом, с одновременным введением комплексообразующих остатков триэтилентетрамина [5]. Структура носителя, обладающего высокой набухаемостью в воде (~500%), может быть представлена следующей схемой:



* Сообщения I, II см. [1, 2].

Характеристики иммобилизованных образцов аминоксилазы из *Asp. oryzae*

Ферментный препарат	Ион металла-комплексообразователя	Содержание металла, ммоль	Выход активности при иммобилизации, % *	Активность образца, ммоль	Сохранение активности при нагревании (1 ч, 50° С), %
		г носителя		г носителя·ч	
Высокоактивная аминоксилаза	Co (II)	0,10	24	3600	68
	Ni (II)	0,22	28	4100	51
	Cu (II)	0,39	23	3400	46
	Fe (III)	0,50	11	1700	56
	Co (II)→Co (III)	0,10	22	3300	85
Частично очищенная аминоксилаза	—	—	23	2800	46
	Co (II)	0,10	54	3200	65
	Ni (II)	0,22	40	2400	56
	Cu (II)	0,39	24	2900	60
	Fe (III)	0,50	27	1600	83
	Co (III)	0,10	33	2000	78
	Co (II)→Co (III)	0,10	29	1700	92

* Рассчитан как отношение активности образца иммобилизованного фермента к общей активности раствора фермента, введенного в процесс иммобилизации.

Металлами-комплексообразователями при иммобилизации аминоксилазы служили ионы Co(II), Ni(II), Cu(II), Fe(III), Co(III), расположенные в данный ряд в соответствии с увеличением прочности комплексов с фиксированным на носителе остатком тетрамина [6]. Четырехкоординационные ионы Cu(II) образуют с хелатирующими группировками плоско-квадратные комплексы, остальные ионы шестикоординационны и образуют октаэдрические структуры. При этом комплексы Co(III) кинетически инертны. Таким образом, набор ионов-комплексообразователей давал возможность оценить влияние прочности и геометрии сорбционных комплексов на свойства иммобилизованной аминоксилазы.

Исходные комплексы стационарных лигандов с ионами металла получали обработкой носителя избытками водных растворов хлоридов соответствующих металлов (кроме Co(III)). Из таблицы видно, что содержание ионов металлов на носителе закономерно возрастает с увеличением прочности комплексов [6]. Co(III)-содержащие носители получали окислением ионов Co(II) в фиксированном на носителе комплексе перекисью водорода.

Для иммобилизации использовали два препарата аминоксилазы с различной степенью очистки: высокоактивный [3] и частично очищенный ферментный препарат, полученный обработкой амилоризина сульфатом аммония с последующим растворением осадка, диализом против воды и хроматографической очисткой на DEAE-целлюлозе. Ферментативная активность препаратов по 0,2 М ацетил-L-метионину составляла соответственно ~1500 и ~5 ммоль/мг белка в 1 ч.

Оказалось, что иммобилизованная аминоксилаза проявляет значительную активность в присутствии всех ионов-комплексообразователей (см. таблицу). В случае высокоактивного фермента наилучшие результаты получены с использованием ионов Ni(II), в случае частично очищенного — с использованием ионов Co(II). Увеличение прочности связывания белка при переходе к ионам Fe(III) в обоих случаях приблизительно вдвое снижает активность иммобилизованного фермента. Интересно, что ионы Co(II), активирующие высокоактивную аминоксилазу в растворимом состоянии [3, 7], несколько уступают при связывании на носителе ионам Ni(II).

Контроль за ходом иммобилизации частично очищенного фермента проводили измерением активности раствора над металлсодержащими носителями. Оказалось, что содержание белка на носителе, вычисленное из

уменьшения активности исходного раствора, должно достигать 800—1500 мг на 1 г носителя. Взвешивание же высушенных образцов носителей до и после иммобилизации дает содержание белка, не превышающее 100 мг/г. Следовательно, процесс связывания аминоксилазы протекает с высокой степенью селективности по отношению к примесным белкам, что, как правило, не имеет места при ковалентном или сорбционном связывании белка на различных носителях. Последнее обстоятельство позволяет надеяться на успешность применения координационно-ионного метода для селективной иммобилизации металлозависимых ферментов из смесей их с балластными белками. В этом случае отпадает необходимость в трудоемкой хроматографической очистке ферментов и их иммобилизованные препараты с достаточно высокой активностью можно получить, минуя эту стадию.

Используемый нами носитель на основе поливинилового спирта при отсутствии на нем ионов металлов достаточно хорошо сорбирует частично очищенную аминоксилазу, однако сорбционные образцы обладают низкой стабильностью.

В рамках координационно-ионного метода иммобилизации определенный интерес представляло использование инертных сорбционных комплексов: стационарный лиганд — ион Co(III) — фермент. При этом связывание фермента становится практически необратимым и по прочности сравнимым с ковалентной иммобилизацией. Связывание аминоксилазы осуществлялось при этом двумя способами:

- а) окислением Co(II) в Co(III) в исходном комплексе со стационарным лигандом с последующей инкубацией с ферментом,
- б) инкубацией фермента с носителем, содержащим ионы Co(II) , и последующим окислением Co(II) в Co(III) .

Высокоактивная аминоксилаза была иммобилизована по второму способу, а частично очищенная — двумя способами. Согласно данным таблицы, окисление Co(II) в Co(III) , проводимое в мягких условиях в сорбционном комплексе с высокоактивным ферментом, не вызывает существенного падения его активности. Иммобилизация частично очищенного фермента на Co(III) -содержащем носителе протекает менее эффективно, чем на носителе с Co(II) , что связано с затрудненностью лигандного обмена в инертной координационной сфере ионов Co(III) . Окисление Co(II) в Co(III) в сорбционном комплексе с частично очищенным ферментом приводит к большей потере активности, чем в случае высокоактивного ферментного препарата.

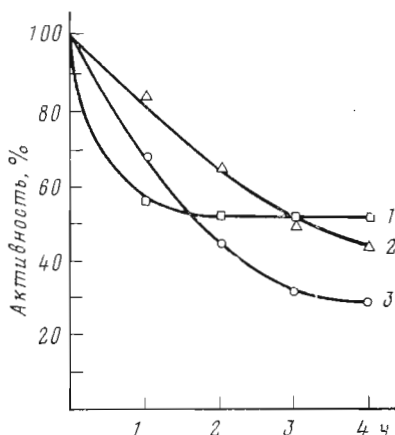
Для оценки стабильности иммобилизованной аминоксилазы образцы нагревали в растворе субстрата при 50°C с последующим определением их активности. При этом могут иметь место три параллельных процесса, приводящих к падению активности образцов:

- а) перераспределение ионов металлов между фазой носителя и раствором *L*-метионина, образующегося в ходе инкубации (равновесие сдвинуто в сторону стационарных комплексов за счет их значительно большей прочности [6]),
- б) собственная термическая инактивация аминоксилазы,
- в) переход в раствор фермента, сорбированного на носителе, но не связанного с ним через комплексы ионов металлов.

Как видно из представленных в таблице результатов, степень дезактивации фермента за 1 ч нагревания несколько различается для высокоактивного и частично очищенного препаратов аминоксилазы. Однако в обоих случаях выражена тенденция к увеличению стабильности образцов с увеличением прочности сорбционных комплексов, что вполне закономерно. Максимальной стабильностью отличаются препараты, в которых фермент связан в инертный комплекс Co(III) .

Кривые падения активности при более длительном нагревании для некоторых образцов иммобилизованной высокоактивной аминоксилазы приведены на рисунке. Оказалось, что в случае применения ионов Fe(III) образ-

Кинетика дезактивации образцов иммобилизованной высокоактивной аминоксилы при нагревании до 50°С в 0,2 М растворе N-ацетил-L-метионина. Металлы-комплексобразователи: 1 — Fe(III), 2 — Co(II) → Co(III), 3 — Co(II)



цы иммобилизованного фермента довольно быстро стабилизируются с сохранением активности, равной ~50% от исходной. Предложенный нами прием окисления Co(II) в Co(III) в комплексе с ферментом позволяет повысить стабильность иммобилизованного фермента на 20%. В случае частично очищенного фермента, связанного через ионы Fe(III) и по схеме Co(II) → Co(III), иммобилизованные образцы обладают стабильностью, на 10–15% превышающей стабильность аналогичных образцов высокоактивного фермента. Таким образом, на базе частично очищенного ферментного препарата показана возможность получения достаточно активных и стабильных образцов иммобилизованной аминоксилы, не уступающих по своим характеристикам продуктам иммобилизации высокоактивного фермента и зарубежным образцам, используемым в промышленности [4]. Подобный подход может резко снизить стоимость препаратов иммобилизованной аминоксилы благодаря существенному упрощению процедуры выделения и очистки фермента.

Экспериментальная часть

Синтез носителя на основе поливинилового спирта. 5 г поливинилового спирта ($M \sim 20\,000$) растворяли при 90°С в 200 мл дистиллированной воды, раствор перемешивали 3 ч, охлаждали до 25°С и при перемешивании добавляли 13,5 мл 25% водного раствора глутарового диальдегида и 2 мл триэтилентетрамина. Через 10 мин добавляли 50 мл 2,5 н. HCl. Смесь интенсивно перемешивали еще 5 мин, после чего блок образовавшегося геля выдерживали 16 ч при 25°С. Блок геля измельчали, промывали на фильтре водой, этанолом, ацетоном и сушили в вакууме при 60°С; высушенный гель дополнительно измельчали в мельнице и просеивали, отбирая фракцию 0,1–0,2 мм. Выход фракции 5,6 г (54%). Содержание триэтилентетрамина — 0,5 ммоль/г.

Получение комплексов стационарного лиганда с ионами Co(II), Ni(II), Cu(II), Fe(III). 0,5 г носителя обрабатывали избытками 0,5 М растворов хлоридов соответствующих металлов при комнатной температуре до достижения равновесной концентрации ионов металлов в растворе над носителем, которую определяли спектрофотометрически и по которой рассчитывали содержание ионов металлов на носителе. Носители отмывали дистиллированной водой до исчезновения следов металлов в элюате, промывали этанолом и высушивали на фильтре. Содержание ионов металлов на носителе приведено в таблице.

Для получения комплекса Co(III) 0,5 г заряженного ионами Co(II) носителя заливали избытком 1–2%-ного водного раствора H₂O₂, выдерживали 2 ч при 20°С, промывали дистиллированной водой, этанолом и высушивали на фильтре.

Иммобилизация высокоактивной аминоксиллазы. 50 мг металлсодержащих носителей заливали 0,1 М боратным буфером $\text{H}_3\text{BO}_3\text{--Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (рН 8,0), выдерживали 2 ч при 20° С, отфильтровывали и инкубировали в 1 мл исходного раствора (0,5 мг белка на 1 мл 0,1 М боратного буфера, рН 8,0) высокоактивной (~1500 мкмоль/мг белка в 1 ч) аминоксиллазы при 5° С при перемешивании в течение 10–16 ч. Носители отфильтровывали, промывали 0,1 М раствором NaCl, водой и 0,1 М боратным буфером. Продукт хранили под слоем буфера при 5° С.

Иммобилизация частично очищенной аминоксиллазы. 50 мг металлсодержащих носителей обрабатывали как описано выше, заливали 5 мл исходного раствора (~13 мг белка на 1 мл 0,1 М боратного буфера, рН 8,0) частично очищенной аминоксиллазы (~5 мкмоль/мг белка в 1 ч) и инкубировали при 5° С, перемешивая, 10–16 ч. Далее носители обрабатывали и хранили как описано выше.

Окисление Co(II) в Co(III) в комплексе стационарный лиганд — Co(II) — аминоксиллаза. 50 мг Co(II)-содержащего носителя с иммобилизованной аминоксиллазой заливали 10 мл боратного буфера и в течение 6 ч при 20° С барботировали через суспензию воздух, свободный от CO₂. Носитель промывали боратным буфером и хранили при 5° С под слоем буфера.

Активность иммобилизованной аминоксиллазы определяли поляриметрическим методом [1, 2] с помощью проточной поляриметрической кюветы (l 10 см при λ 436 нм), соединенной в замкнутый цикл с реактором, в котором проводили реакцию ферментативного гидролиза при 40° С с использованием в качестве субстрата 0,2 М раствора N-ацетил-L-метионина в боратном буфере, рН 8,0. Из наклона прямолинейного участка кинетических кривых гидролиза рассчитывали активность образцов иммобилизованной аминоксиллазы, а по конечной величине угла вращения раствора субстрата контролировали глубину протекания ферментативной реакции. Активность образцов выражали в мкмоль свободного L-метионина, образующегося под действием 1 г образца с иммобилизованной аминоксиллазой в течение 1 ч при 40° С.

Активность растворимой высокоактивной и частично очищенной аминоксиллазы определяли поляриметрически аналогично работе [2].

Стабильность образцов иммобилизованной аминоксиллазы определяли нагреванием 50 мг образцов в 10 мл 0,2 М раствора N-ацетил-L-метионина (рН 8,0) при перемешивании при 50° С. Носители отфильтровывали, промывали 0,1 М боратным буфером, рН 8,0, и, как описано выше, определяли активность образца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. (1979) Биоорган. химия, 5, 757–767.
2. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. (1980) Биоорган. химия, 6, 1404–1408.
3. Лобарева Л. С., Соловьева Т. А., Лалук Я. И., Люблинская Л. А., Степанов В. М. (1978) Тез. Всес. симпоз. «Методы получения высокоочищенных ферментов», с. 83, Вильнюс.
4. Chibata I. (1978) Immobilized Enzymes, p. 170.
5. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. (1979) Биоорган. химия, 5, 1728–1734.
6. Яцимирский К. Б., Васильев В. П. (1959) Константы нестойкости комплексных соединений, Изд-во АН СССР, М.

Поступила в редакцию
12.III.1980.

COORDINATION-IONIC ENZYME IMMOBILIZATION. III. AMINOACYLASE BINDING
TO CROSS-LINKED POLYVINYL ALCOHOL THROUGH COBALT, NICKEL AND
IRON COMPLEXES

YAMSKOV I. A., BUDANOV M. V., LOBAREVA L. S., DAVANKOV V. A.

*Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The process of coordination-ionic immobilization of aminoacylase was studied using Co(II), Ni(II), Cu(II), Fe(III), and Co(III) ions as complexing agents. The enzyme was bound to polyvinyl alcohol cross-linked with glutaric aldehyde and containing tetradentate chelating groupings of triethylenetetraamine. The properties of immobilised preparations obtained from aminoacylases of various degrees of purity were compared. A dependence of the stability of immobilized preparations on the nature of complexing metal ions was studied. The possibility of selective binding of aminoacylase by the metal-containing carriers was shown.
