



УДК 577.15:541.6

## ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИИ ПОЛИМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ НА СИЛИКАТНОЙ МАТРИЦЕ

*Иванова Г. П., Миргородская О. А., Москвичев Б. В.*

*Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт антибиотиков  
и ферментов медицинского назначения, Ленинград*

Изучен процесс получения биокатализаторов, обладающих протеолитической активностью. Процесс заключается в сорбции на нейтральной силикатной матрице ферментов, предварительно модифицированных полимером. Модификацию проводили ковалентным связыванием белка с сополимером винилпирролидона и акролеина. Показано, что такие полимерные производные ферментов обладают высокой сорбционной избирательностью по отношению к сиохрому. Протеолитическая активность полученных биокатализаторов сохраняется при многократном использовании. Они устойчивы при длительном хранении, а минеральная матрица может быть легко регенерирована промывкой слабощелочным раствором.

Иммобилизация ферментов в настоящее время стала уже весьма рутинным приемом, который успешно используется как в исследовательской практике [1], так и в технологии, применяющей биокатализаторы [2]. Тем не менее дальнейшее методическое развитие процесса иммобилизации целесообразно осуществлять в направлении упрощения регенерации матриц биокатализаторов, увеличения срока хранения и функционирования иммобилизованных ферментов. Не меньший интерес представляет и требование возможно более широкой универсальности биокатализатора, обеспечивающей расширение областей применения. Таким критериям, по-видимому, должен удовлетворять подход, основанный на сочетании химического и сорбционного методов иммобилизации ферментов. Здесь необходимо отметить в первую очередь исследования Л. В. Козлова и В. К. Антонова [3, 4] в области модификации ферментов в растворе и последующей сорбции их на ионитах. Характерной особенностью указанного подхода является образование надмолекулярного полимерного комплекса, состоящего из ионизованной формы модифицированного фермента и нерастворимого полиэлектролита, заряд которого противоположен по знаку глобуле модифицированного фермента. В цитируемых работах не приводится сведений о возможности регенерации подобных катализаторов, хотя такая проблема существует и обсуждается в специальной литературе [5]. По-видимому, система кооперативных электростатических взаимодействий обеспечивает весьма прочное удерживание фермента на матрице ионита.

В нашей работе используется иной подход к получению биокатализаторов. Известно, что нейтральный полимер не оказывает неспецифического денатурирующего воздействия на ферменты, как это часто наблюдается при их модификации полиэлектролитами [6, 7]. Как показано в

Основные результаты модификации протеиназ сополимером (Р) винилпирролидона и акролеина в водном растворе

Фермент	Условия модификации * (0,1 М боратный буфер, 20±2° С)			Активный модифицированный фермент	
	рН	Время, мин	Е/Р, г/г	Выход, %	Количество связанного с матрицей, мг/г Р
Террилитин	10-10,2	60	1:5	99,8	166,3
Трипсин	9,3-9,6	40-50	1:1	51,6	258,4
Химотрипсин	9,3-9,6	40-50	1:2	30,5	101,6
Субтилизин ВРН	9,3-9,6	40-50	1:2	99,0	323,6

\* Модификация фермента во всех случаях была полной. Определение степени модификации см. в «Экспериментальной части».

наших работах, нейтральный полимер способствует повышению конформационной устойчивости фермента [8]. Кроме того, относительно более слабые связи, чем в случае взаимодействия полиэлектролитов, между твердым силикатным носителем и нейтральным полимером позволяют в определенных условиях обеспечить полную десорбцию модифицированного фермента из фазы носителя. В работе [9], посвященной изучению сорбции сополимеров винилпирролидона на силохроме, установлено, что полимеры поглощаются сорбентом с большой избирательностью. Коэффициенты распределения (рассчитанные как отношение емкости сорбции полимера в мг/г силохрома к равновесной концентрации полимера в растворе над силохромом в мг/мл) достигают 50 и возрастают с уменьшением концентрации сополимера в растворе. Мы полагали, что аналогичными сорбционными свойствами будут обладать ферменты, модифицированные водорастворимыми сополимерами на основе винилпирролидона и акролеина. Цель настоящей работы заключается в изучении процесса сорбции на силохроме протеолитических ферментов, химически модифицированных в растворе сополимером винилпирролидона и акролеина, а также в изучении каталитических свойств полученных иммобилизованных ферментов.

Химическая модификация ферментов таким сополимером подробно описана нами на примере протеиназы террилитина в одной из предыдущих публикаций [10]. Она основана на взаимодействии альдегидных групп сополимера с аминогруппами белка, в основном с  $\epsilon$ -аминогруппами лизина. Химическая модификация других протеолитических ферментов — трипсина, химотрипсина, субтилизина ВРН — протекает аналогично модификации террилитина. В табл. 1 приведены основные результаты изучения модификации протеиназ альдегидсодержащим полимером, в котором молярная доля акролеина составляет 18–20%.

Последующую сорбцию модифицированного фермента проводили в различных буферных растворах при соответствующих значениях рН (см. «Экспериментальную часть»). На рис. 1 показаны кинетика и изотермы адсорбции полимерных производных ферментов террилитина и трипсина. Процесс сорбции полимерных производных ферментов заканчивается практически за 20–30 мин, а изотерма адсорбции выходит на плато уже при концентрации активного модифицированного фермента в растворе 1–2 мг/мл. Характеристика полученных биокатализаторов отражена в табл. 2.

В работе [9], посвященной изучению сорбции сополимеров винилпирролидона на силохроме, нами высказывалось предположение о том, что сорбция сополимеров обусловлена образованием системы кооперативных водородных связей между карбонилем пирролидонового кольца и непротонированной силанольной группой минерального носителя. Действи-

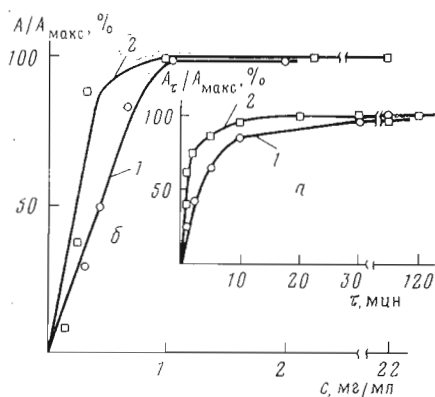


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика (а) и изотермы адсорбции (б) полимерных производных ферментов трипсина (1) и террилитина (2) на силихроме; 0,05 М трис-НСl, рН 8,  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ;  $A$  — каталитическая активность сорбированного модифицированного фермента (см. «Экспериментальную часть»),  $c$  — равновесная концентрация активного модифицированного фермента

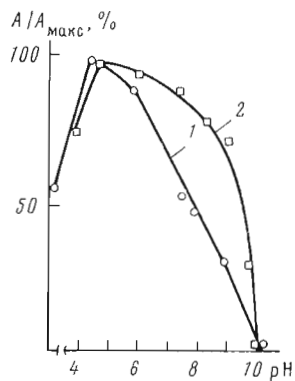


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость сорбции модифицированного трипсина (1) и модифицированного террилитина (2) на силихроме от рН. Время взаимодействия полимерных производных ферментов с силихромом 1 ч,  $20 \pm 2^\circ \text{C}$

тельно, сорбция на силихроме полимерных производных террилитина и трипсина протекает аналогично сорбции исходного сополимера с максимумом при значении рН 4,5 (рис. 2). Характер взаимодействия полимерных форм ферментов с силикатным носителем идентичен таковому в системе полимер — силихром. При рассмотрении взаимодействия нативных ферментов с силихромом в аналогичных условиях установлено, что нативный трипсин не сорбируется на носителе, а террилитин инактивируется при сорбции на 85%. Оставшийся активным в сорбированном состоянии фермент вымывается первой же порцией белковой субстрата при определении каталитической активности. Из рис. 2 следует, что в достаточно мягких условиях (рН ~ 10) можно достичь регенерации матрицы, осуществив десорбцию полимерного производного белка. В то же время простое повышение ионной силы раствора (рис. 3) при рН < 10 не приводит к заметной десорбции модифицированного фермента из твердой фазы. Такое явление можно рассматривать как дополнительное подтверждение предположения об определяющей роли водородных связей в явлении сорбционной иммобилизации полимерных производных ферментов.

Сорбция полимерных производных ферментов в наших экспериментах проводилась на фоне избытка полимера, модифицирующего фермент. Поэтому при низких концентрациях модифицированного фермента в растворе поверхность силихрома, по-видимому, полностью покрыта избытком полимера. Известно, что при использовании широкопористых стекол в качестве хроматографических материалов с целью предотвращения потери белков при фракционировании рекомендуется предварительно поверхность сорбента закрыть поливинилпирролидоном [11]. В случае биокатализаторов на основе силихрома и полимерных производных ферментов можно было бы ожидать высокой устойчивости иммобилизованных ферментов в процессе гидролиза высокомолекулярных белковых субстратов, поскольку здесь исключается поглощение как субстрата, так и продуктов ферментативного гидролиза. Эту точку зрения подтверждают данные о постоянстве активности биокатализатора при многократном его применении (рис. 4).

В табл. 3 приведены результаты определения активности биокатализаторов в течение весьма длительного времени, а также данные, отражаю-

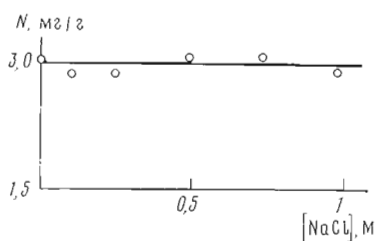


Рис. 3

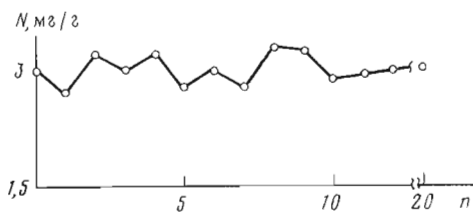


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость емкости сорбции силохрома ( $N$ , мг активного фермента на 1 г силохрома) от концентрации  $\text{NaCl}$  в растворе 0,1 М ацетата натрия; pH 4,5;  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Рис. 4. Зависимость количества активного модифицированного фермента, связанного с матрицей ( $N$ ), от числа циклов ( $n$ ) его использования. Субстрат — 2% раствор казеина в 0,05 М растворе трис- $\text{HCl}$ , pH 8;  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ .

щие влияние регенерации носителя на свойства вновь полученного биокатализатора. Видно, что стабильность изученных иммобилизованных ферментов при хранении и в процессе работы достаточно высока.

Важной характеристикой иммобилизованных ферментов является кажущаяся величина константы Михаэлиса ( $K_m$ ). В табл. 4 приведены значения этой константы для различных модифицированных производных трипсина и террилитина по сравнению с их нативными формами. Увеличение  $K_m$  в результате модификации, по-видимому, результат возникновения диффузионных затруднений в процессе каталитического акта при подходе белкового высокомолекулярного субстрата к молекуле модифицированного фермента.

В заключение необходимо отметить, что модификация ферментов сополимером на основе винилпирролидона обеспечивает обратимую сорбцию полимерных производных ферментов на силохроме, причем протеина-

Таблица 2

**Характеристика биокатализаторов, полученных сорбцией модифицированных протеиназ на силохроме**

Фермент	Выход по активности, %	Активность, мг активного фермента/г силохрома *
Субтилизин BPN	35,5	4,4
Трипсин	36,0	1,6
Химотрипсин	44,4	1,0
Террилитин	22,5	3,0

\* Определена по казеину, см. «Экспериментальную часть».

Таблица 3

**Стабильность биокатализатора на основе террилитина при хранении**

Время хранения	Активность, мг/г силохрома	
	При первом использовании	После регенерации
0	3,0	2,74
3 мес	2,8	2,6
6 мес	3,16	2,76
1 год	3,1	2,6
2 года	3,15	2,6

Значение кажущихся констант Михаэлиса для нативных трипсина и террилитина и их модифицированных производных (определены по расщеплению казеина)

Модификация	$K_m$ , мг/мл	
	трипсин	террилитин
—	0,36	0,9
ВП-АК-фермент * в растворе	1,2	2,3
Силохром-фермент **	2,2	6,7
Силохром-ВП-АК-фермент	5,0	12,0

\* В работе использовали образцы модифицированных сополимером винилпирролидона и акролеина (ВП-АК) трипсина и террилитина в соотношении фермент — полимер 1:1 и 1:3 соответственно.

\*\* Фермент, ковалентно связанный посредством глутарового альдегида с аминосилохромом, получали по методике, описанной в работе [12].

зы в сорбированном состоянии проявляют достаточно высокую ферментативную активность, а регенерация минеральной матрицы может быть осуществлена в мягких условиях.

### Экспериментальная часть

В работе использовали террилитин отечественного производства, очищенный диализом, трипсин (КФ 3.4.21.4) фирмы Spofa (ЧССР), субтилизин ВРН (КФ 3.4.21.14) фирмы Sigma (США),  $\alpha$ -химотрипсин Олайнского завода химических реактивов, сополимер винилпирролидона и акролеина отечественного производства и силохром (отечественного производства) с удельной поверхностью 28 м<sup>2</sup>/г и средним диаметром пор 220–250 нм, диаметром зерна 0,15–0,5 мм.

*Модификацию ферментов* сополимером винилпирролидона и акролеина осуществляли как описано в работе [10]. Степень модификации оценивали визуально по данным тонкослойной гель-хроматографии, проводимой по методу, описанному в работе [12]. Подтверждением полноты модификации служило перемещение ферментативно-активной зоны на хроматограмме в область меньших объемов удерживания по сравнению с нативным ферментом.

*Сорбцию модифицированных полимером ферментов* на силохроме изучали в статических условиях. К 1 г силохрома добавляли 20 мл раствора модифицированного фермента в 0,1 М буферном растворе (цитрат, ацетат, фосфат). Значение рН буферного раствора, из которого проводили сорбцию, может быть в интервале 3,5–8,0. Полученную суспензию перемешивали на мешалке в течение 30 мин при 20°С. После проведения процесса сорбционного взаимодействия раствор над силохромом сливали и определяли в нем протеолитическую активность. Затем силохром промывали 3 раза по 20 мл 1 н. раствором хлористого натрия для удаления избытка несвязавшегося фермента. Продолжительность каждой промывки 10 мин. После промывок раствором хлористого натрия силохром промывали один раз 20 мл дистиллированной воды и определяли каталитическую активность образца по высокомолекулярному субстрату — казеину. Методика определения описана в работе [13]. Степень регенерации изучали, добавляя к 1 г биокатализатора 20 мл 0,1 М буферного боратного раствора, рН 10–10,2, и перемешивая в течение 30 мин при 20°С. Количество освободившегося модифицированного фермента определяли в растворе над силохромом.

Протеолитическую активность нативных ферментов и их модифицированных форм определяли по модифицированной методике Кунитца [14]. Расчет значений  $K_m$  проводили по методу, описанному в работе [15].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К. (1976) Имобилизованные ферменты, т. 2, с. 110–250, Изд-во МГУ.
2. Кёстнер А. И., Крезн М. И. (1973) Производство и применение иммобилизованных ферментов, с. 35–39, Изд-во Института научно-технической информации ЭССР.
3. Яровая Г. А., Гулянская Т. Н., Доценко В. Л., Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1975) Биоорганическая химия, 1, 646–650.
4. Виноградова Н. Н., Козлов Л. В., Антонов В. К., Жагат Р. А. (1975) Химия природн. соед., с. 113–114, изд-во «ФАН», Ташкент.
5. Киселев А. В., Никитин Ю. С. (1978) Биол. химия, 12, 6–16.
6. Миргородская О. А., Иванова Г. П., Панарин Е. Ф., Москвичев Б. В. (1976) Биоорганическая химия, 2, 1695–1698.
7. Иванова Г. П., Миргородская О. А., Панарин Е. Ф., Москвичев Б. В. (1977) Биоорганическая химия, 3, 127–131.
8. Тенникова Т. Б., Москвичев Б. В., Самсонов Г. В. (1980) Биохимия, 45, 438–448.
9. Иванова Г. П., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. (1979) Высокомолек. соед., 738–741.
10. Тенникова Т. Б., Панарин Е. Ф., Миргородская О. А., Самсонов Г. В., Москвичев Б. В. (1977) Хим.-фарм. ж., 86–90.
11. Klatyk Knut (1970) Патент США № 3.549.525.
12. Johansson V. G., Rymo L. (1962) Acta chem. scand., 16, 2067–2068.
13. Иванова Г. П., Зайцева Л. А., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. (1978) Прикл. биохим. и микробиол., 14, 543–547.
14. Кунитц М. (1947) J. Gen. Physiol., 30, 291–310.
15. Корниш-Боуден Э. (1979) Основы ферментативной кинетики, с. 36–48, «Мир», М.

Поступила в редакцию  
19.XII.1979  
После доработки  
3.III.1980

#### STUDIES ON SORPTION OF POLYMERIC DERIVATIVES OF SOME ENZYMES ON A SILICATE MATRIX

IVANOVA G. P., MIRGORODSKAYA O. A., MOSKVICHEV B. V.

*All-Union Research Technological Institute of Antibiotics  
and Enzymes for Medical Use, Leningrad*

A process for preparing biocatalysts having a proteolytic activity has been studied. It involves sorption of polymers-modified enzymes on a neutral silicate matrix. Modification is carried out by covalent binding of a protein to vinylpyrrolidone-acrolein copolymer. Such polymeric enzyme derivatives manifested a high sorption selectivity towards silochrome. The prepared immobilized enzymes preserved proteolytic activity through repeated use, were stable on prolonged storage, whereas mineral matrix could be easily regenerated in a weak alkaline solution.