



УДК 544.726

Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах

Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Багно О.П.,
Трофимова О.Д., Беленова А.С.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

Аннотация

Химические методы иммобилизации ферментов в настоящее время являются доминирующим способом получения гетерогенных биокатализаторов. При подборе условий иммобилизации препарата выявлено, что наиболее предпочтительным носителем является анионообменная смола АВ-17-2П, отработавшая в условиях сахаро-рафинадного производства в течение 400 циклов, изменение физико-химических свойств которой обусловлено многократными процессами сорбции-десорбции меланоидинов и других продуктов щелочного распада инвертного сахара. Оптимальным методом иммобилизации является модифицированный глутаральдегидный способ ковалентного связывания фермента с носителем, заключающийся в процессе наращивания связывающего звена между липазой и анионитом при обработке рядом органических реагентов.

Показано, что в процессе ковалентной и адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы происходит многоточечное связывание как с крахмалосвязующим, так и с каталитическим доменом, что сопровождается увеличением K_m , уменьшением V_{max} и значительным снижением величины константы конформационного перехода (L_0). Кинетика реакции гидролиза крахмала не соответствует уравнению Михаэлиса.

Ключевые слова: иммобилизация, фермент, анионит

A covalent immobilization of enzymes on anion-exchange resin AV-17-2P has been carried out by modified glutaraldehyde method, the essence of which is a consecutive treatment of anionite matrix by succinic anhydride, thionile chloride, ethylenediamine and incubation with a modified support.

It has been discovered that the effective connecting of the support with starch-binding and catalytic domains of glucoamylase occurs, an increase of K_m and a decrease of V_{max} and L_0 . Kinetics of starch hydrolysis does not lead to changes of the curve form of rate dependence on substrate concentration.

Введение

В последние годы при производстве различных видов продукции широко используются гидролитические ферменты микроорганизмов, характеризующиеся более высокой активностью и низкой себестоимостью по сравнению с энзимами растительного и животного происхождения. Выявление особенностей структуры и функционирования гидролаз становится особенно актуальным в связи с их биологической ролью, а также предоставляет новые возможности для создания

катализаторов с целью их дальнейшего эффективного применения в различных отраслях промышленности и в качестве медицинских препаратов [1, 2, 5].

Гидролитические ферментные препараты используют для заместительной терапии гипо- и дисферментозов желудочно-кишечного тракта, разрушения продуктов распада белков при ожогах, лечения гнойно-воспалительных заболеваний легких, для рассасывания тромбов кровеносных сосудов, а также при аномальном накоплении гликогена в клетках и тканях.

В настоящее время в лабораториях научно-исследовательских институтов разрабатывается новая прогрессивная технология – катализ с использованием иммобилизованных ферментов, имеющих ряд преимуществ перед растворимыми катализаторами в связи с более высокой стабильностью по отношению к денатурирующим факторам окружающей среды и возможностью пролонгированного действия медицинских препаратов, созданных на их основе. Особое значение при создании лекарственных препаратов на основе иммобилизованных гидролаз и промышленных биокатализаторов имеет подбор соответствующего носителя и способа иммобилизации [3, 4].

В этой связи целью нашей работы было исследование условий иммобилизации и физико-химических свойств иммобилизованных гидролитических ферментов.

Эксперимент.

Объектом исследования служили следующие ферменты: липаза (триацилглицерол ацилгидролаза, КФ 3.1.1.3) из *Rhizopus japonicus* 1403, гидролизующая триглицериды до карбоновых кислот, и глюкоамилаза из *Aspergillus awamori* Г-20Х (α –1,4:1,6-глюкан- 4,6 глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3), осуществляющая гидролиз полисахаридов до глюкозы путем разрыва гликозидных связей.

Культивирование штаммов *Rhizopus japonicus* 1403 и *Aspergillus awamori* Г-20Х осуществляли глубинным способом. Препарат глюкоамилазы получали путем ультрафильтрации на мембране УФМ – 50, осаждения изопропиловым спиртом и гель-хроматографии на сефадексах G-25 и G -100. Для выделения и очистки липазы использовали ацетон, ультрафильтрацию на мембране УАМ – 30, гель – фильтрацию на сефадексе G-150 и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ – целлюлозе. Гомогенность полученных ферментных препаратов подтверждена методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Каталитическую активность глюкоамилазы определяли глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов для измерения концентрации глюкозы в биологических жидкостях (OLVEX DIAGNOSTICUM); в качестве субстрата использовали крахмал.

Каталитическую активность липазы измеряли спектрофотометрическим методом, основанным на определении оптической плотности окрашенных продуктов взаимодействия основной формы цветного реагента родамина 6Ж в бензоле и карбоновых кислот (в данном случае – бутановой), освобождающихся в ходе гидролиза триглицеридов. Определение количества белка в препаратах гидролаз осуществляли методом Лоури, в иммобилизованных ферментах - модифицированным методом Лоури. Изучение процесса термической инактивации проводили инкубируя раствор фермента ($5 \cdot 10^{-5}$ мол/л) в интервале времени 10-60

мин. при различных температурах с последующим определением каталитической активности.

Иммобилизацию гидролитических ферментов производили сорбционным и глутаральдегидным методами. В качестве носителя для иммобилизации применяли товарную ионообменную смолу АВ-17-2П, а также анионит, проработавший в сахаро-рафинадном производстве в течение года в качестве адсорбента красящих веществ. Подготовку носителей осуществляли путем кондиционирования [6]. Перед кондиционированием отмывали большим избытком раствора гидроксида натрия и соляной кислоты до обесцвечивания промывных вод.

Обсуждение результатов

В ходе исследования физико-химических свойств полученных ферментных препаратов установлено, что оптимальными условиями функционирования глюкоамилазы плесневого происхождения являются: $t = 40^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=4,7$, концентрация субстрата $1.16 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

При иммобилизации глюкоамилазы в качестве носителя использовали анионит АВ-17-2П, используемый в сахаро-рафинадном производстве в течение 20 циклов (I), 400 циклов (II) и более года (III) (табл.1).

Таблица 1. Характеристики глюкоамилазы, иммобилизованной сорбционным методом на анионитах, используемых в производстве для очистки сахара

Марка ионита	Удельная активность, ед/мг	Активность иммобилизованного фермента, % от свободного	Процент сохранения активности иммобилизованного фермента, %
АВ-17-2П (I)	$2029 \pm 0,5$	46	46,7
АВ-17-2П (II)	2635 ± 1	60	60,7
АВ-17-2П (III)	586 ± 1	1,3	13,5

Примечание: активность свободной глюкоамилазы - 4340 ед/мг

При исследовании физико-химических свойств глюкоамилазы, иммобилизованной на анионите АВ-17-2П адсорбционным методом, показано, что гетерогенный катализатор проявляет максимальную каталитическую активность при температуре 50°C (рис.1), $\text{pH} = 4.7$.

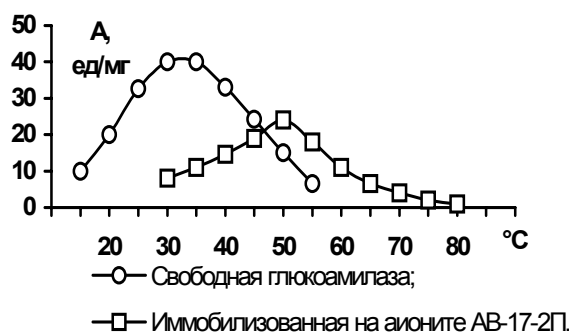


Рис. 1 Зависимость каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной сорбционным методом, от температуры

Выявлено, что наибольшей активностью обладает фермент, связанный с ионитом АВ-17-2П, проработавшим в течение 400 циклов в производственных условиях.

В процессе эксплуатации АВ-17-2П в промышленной технологии анионит приобретает свойства амфолита, нарушается так же и степень сшивки. Эти изменения приводят к тому, что молекула сорбционно иммобилизованной глюкоамилазы оказывается в микроокружении, благоприятствующем проявлению ее каталитических свойств. Молекулы фермента могут проникать в более глубокие слои матрицы носителя, что и сопровождается увеличением внутридиффузионного торможения реакции гидролиза крахмала. Установлено, что удельная активность иммобилизованного фермента зависит от срока работы ионита в производственных условиях. При использовании анионообменника более года наблюдаются нарушения матрицы, поэтому количество связанного белка для образца АВ-17-2П(III) - 3,57 мг/л, что в 3 раза выше, чем для АВ-17-2П(II). Однако глюкоамилаза, иммобилизованная на АВ-17-2П(II), сохраняет 60% активности свободного фермента, а связанная с ионитом АВ-17-2П(III) - лишь 1,3%.

В работах Г.В. Самсонова и сотрудников показано, что аниониты сорбируют полипептиды за счет молекулярного взаимодействия (дисперсионного, ион-дипольного) [7]. В этой связи они используются при производстве сахара в качестве адсорбентов красящих веществ. При взаимодействии анионита с сахарным сиропом в процессе очистки образуются меланоидины, которые, попадая в фазу ионообменной смолы, претерпевают структурные изменения и вступают в реакции конденсации с функциональными группами ионообменника [8].

Очевидно, в процессе очистки сахарных сиропов происходит поглощение ионитом меланоидинов и других окрашенных компонентов сахаро-рафинадного производства, содержащих пептидные группы, и такая "модификация" способствует адсорбционной иммобилизации ферментов.

Химические методы иммобилизации ферментов в настоящее время являются доминирующим способом получения гетерогенных биокатализаторов. Модифицированный глутаральдегидный способ иммобилизации, заключающийся в попеременной обработке ионита янтарным ангидридом, хлористым тионилем, этилендиамином и глутаровым альдегидом, обеспечивает повышение активности иммобилизованной глюкоамилазы по сравнению с обычным глутаральдегидным методом в 2 раза. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что применение отработанного анионита АВ-17-2П способствовало увеличению количества связанного белка по сравнению с использованием товарной смолы в качестве носителя в 3 раза.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что для получения более активных и стабильных препаратов глюкоамилазы в качестве подложки необходимо использовать ионит АВ-17-2П, отработавший в условиях сахаро-рафинадного производства 400 циклов. Оптимальные режимы функционирования данного гетерогенного биокатализатора следующие: $t = 55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,7$. При этом ферментный препарат сохраняет 46 % активности нативной глюкоамилазы.

Очевидно, в процессе ковалентной и адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы происходит многоточечное связывание как с крахмалсвязывающим, так и с каталитическими участками активного центра фермента, что сопровождается увеличением K_m , уменьшением $V_{\max}$ и значительным снижением величины константы конформационного перехода. Установлено, что при связывании фермента с носителем кинетика реакции гидролиза крахмала не соответствует уравнению

Михаэлиса-Ментен, сопровождается сдвигом равновесия при переходе энзима из состояния R в состояние T.

Возрастающие масштабы использования липаз в фармацевтической и пищевой промышленности вызывают необходимость поиска эффективных продуцентов ферментов данной группы, в качестве которого в настоящей работе служит микромицет *Rhizopus japonicus* 1403. Для решения проблем регулирования биологических свойств липазы необходимо детальное исследование физико-химических, кинетико-термодинамических свойств фермента, особенностей его структурной организации, раскрытие молекулярного механизма реакции превращения субстрата.

Показано, что оптимальными условиями ферментативного гидролиза триглицеридов являются: $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 6,5$; концентрация субстрата $1,75 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

При подборе условий иммобилизации препарата липазы из *Rhizopus japonicus* 1403 выявлено, что наиболее предпочтительным носителем является анионообменная смола АВ-17-2П, отработавшая в условиях сахаро-рафинадного производства в течение 400 циклов, изменение физико-химических свойств которой обусловлено многократными процессами сорбции-десорбции меланоидинов и других продуктов щелочного распада инвертного сахара. Оптимальным методом иммобилизации является модифицированный глутаральдегидный способ ковалентного связывания фермента с носителем, заключающийся в процессе наращивания связывающего звена между липазой и анионитом при обработке рядом органических реагентов.

Установлено, что иммобилизованный препарат липазы сохраняет 23% активности по сравнению с растворимой формой фермента. Оптимальная температура реакции гидролиза триглицеридов при иммобилизации повышается на $3\text{ }^{\circ}\text{C}$, оптимум pH смещается вправо на 0,5 единиц, значения K_m и $V_{\max}$ увеличиваются на 52% и 49% соответственно (рис. 2, 3).

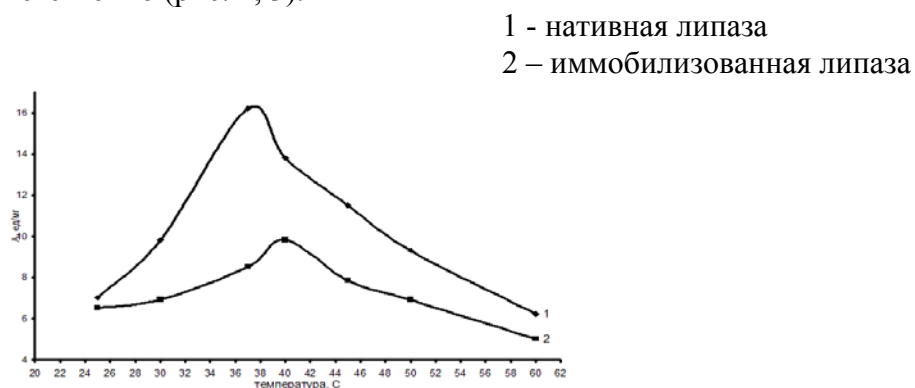


Рис.2 Зависимость каталитической активности нативной и иммобилизованной липазы от температуры

Иммобилизация липазы приводит к увеличению $E_{\text{акт.}}$ и энтальпии активации реакции гидролиза, что связано с затруднением процесса перехода иммобилизованного фермента в «открытую» конформацию на границе раздела фаз «липид-вода».

Отрицательные значения ΔS для реакции гидролиза, осуществляемого свободной и иммобилизованной липазой, позволяют заключить, что расщепление

эфирных связей трибутирина протекает с большой скоростью и характеризуется высокой упорядоченностью.

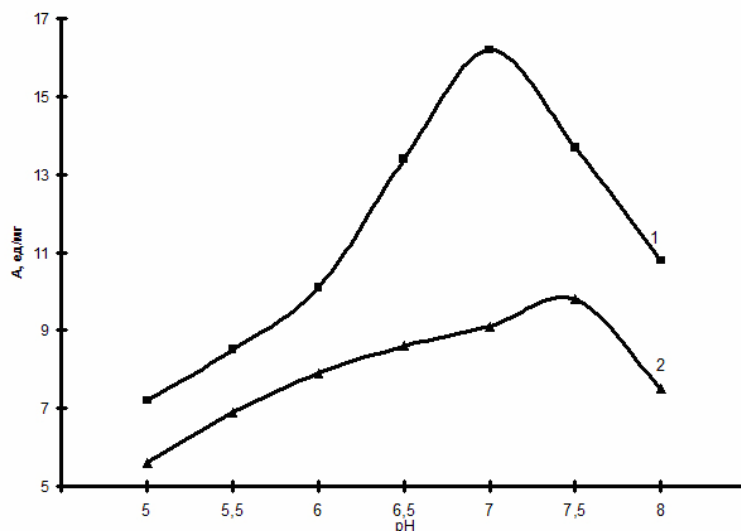


Рис.3 Зависимость каталитической активности нативной и иммобилизованной липазы от значения pH

Незначительное увеличение абсолютного значения $\Delta S_{\text{акт}}$, наблюдаемое при иммобилизации липазы, свидетельствует, вероятно, о более направленном взаимодействии фермента с субстратом.

Таблица 2. Значения кинетико-термодинамических параметров реакции гидролиза трибутирина, катализируемой свободной и иммобилизованной на АВ-17-2П липазой

Фермент	K_m , ммоль/л	V_{max} , ммоль/мин	$E_{\text{акт}}$, кДж/моль	ΔH , кДж/моль	ΔS , кДж/моль.К
Свободная липаза	3,22	71,42	23,54	2,62	-8,39
Иммобилизованная липаза	1,56	37,04	30,70	4,01	-8,56

Заключение

Таким образом, с целью удешевления целевого продукта и утилизации отходов пищевой промышленности в качестве носителя для иммобилизации гидролитических ферментов целесообразно применение отработанного в сахарорафинадном производстве анионита АВ-17 – 2П.

Экологическая безопасность анионита и его относительно низкая себестоимость позволяют рекомендовать полученные на его основе препараты иммобилизованных ферментов для использования в ряде отраслей легкой, пищевой, химической промышленности, медицине. Разработанный модифицированный способ глутаральдегидного метода иммобилизации, заключающийся в наращивании промежуточного звена («вставки», «ножки») на носителе, обеспечивает повышение активности иммобилизованного фермента по сравнению с обычным глутаральдегидным способом в 2 раза и позволяет сохранить мобильность третичной структуры, необходимую для гидролиза полимерного субстрата.

Список литературы

1. Давранов К.Д. Современное состояние исследования микробных липаз / К.Д. Давранов, В.Б. Халамейзер // Химия природ. соед. – 1997. – №2. – С. 150-169.
2. Диксон М. Ферменты / М. Диксон. – М. : Мир, 1966. – Т.1. – 396 с.
3. Аре Р.Ю. Очистка, физико-химические и каталитические свойства микробных липаз / Р.Ю. Аре, Б.Я. Лусина, М.Г. Плата // Изд. АН Латвийской ССР. – 1979. – №6. – С. 93–106.
4. Березин И.В. Структура и функции активных центров ферментов / И.В. Березин, К. Мартинек. – М. : Наука, 1974. – 238 с.
5. Олигомерные белки: структурно – функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В.Г. Артюхов [и др.]. – Воронеж : Изд-во Воронежского государственного ун-та, 1997. – 264 с.
6. Капранчиков В.С. Некоторые физико-химические свойства липазы зародышей семян пшеницы / И.С. Капранчиков, Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова // Биотехнология. – 2003. – №5. – С. 44-52.
7. Компьютерный анализ пространственной структуры некоторых гидролитических ферментов / В.Г. Артюхов [и др.]. // Биохимия. – 2005. – Т.70, №10. – С. 1318-1327.
8. Дужак А.Б. Выделение и свойства препаратов внеклеточных липаз природного (В-10) и мутантного (М-1) штаммов *Serratia marcescens* / А.Б. Дужак, З.И. Панфилова, Е.А. Васюнина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т.36, №4. – С. 402–411

Ковалева Тамара Андреевна - профессор кафедры биофизики и биотехнологии, доктор биологических наук Воронежского государственного университета, тел. 8(4732)208586

Kovaleva Tamara A. - professor of biophysics and biotechnology department, doctor of biological science, Voronezh State University, e-mail: Tamara_kovaleva@inbox.ru

Беленова Алена Сергеевна - аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, тел. 8(4732)593152

Belenova Alena S. - postgraduate (student) of biophysics and biotechnology department, Voronezh State University e-mail: Alenca198322@mail.ru

Кожокина Оксана Михайловна - ассистент кафедры биохимии, кандидат биологических наук Воронежской государственной медицинской академии им. Бурденко

Kozhokina Oksana M. - assistant of biochemistry department, Voronezh N.N.Burdenko State Medical Academy, e-mail: Tamara_kovaleva@inbox.ru

Трофимова Ольга Дмитриевна – к.б.н., ассистент Воронежский государственный университет

Trophimova Olga D. - assistant of biochemistry department, Voronezh State University, e-mail: Pfi.pharm@mail.ru

Багно Ольга Петровна – аспирант Воронежского государственного университета

Bagno Olga P. - post-graduate Voronezh State University, e-mail: ole200381@mail.ru