



УДК 577.150.7

## СВОЙСТВА НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА СЕФАРОЗЕ

*Плаксина Е. А., Склякина В. А., Мевж А. Т.,  
Аваева С. М.*

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Получена иммобилизованная на сефарозе неорганическая пирофосфатаза из дрожжей с активностью 650 Е/мг белка и концентрацией белка 35 мкг/мл препарата. Зависимость устойчивости фермента от рН обнаруживает существенно большую стабильность иммобилизованного фермента в щелочной среде. Иммобилизация фермента не приводит к изменению рН-оптимума его активности и константы связывания субстрата — пирофосфата магния, но иммобилизованный фермент полностью утрачивает АТР-азную активность.

Неорганическая пирофосфатаза из пекарских дрожжей (К. Ф. 3.6.1-1) принадлежит классу гидролаз и катализирует в присутствии двухвалентных металлов гидролиз неорганического пирофосфата, а также моноэфиров пирофосфорной и трифосфорной кислот.

Сложность получения и большая лабильность фермента затрудняют его исследование. Одним из способов стабилизации ферментов, получившим широкое применение в последнее время, является их иммобилизация. Перевод фермента в нерастворимое состояние продлевает срок его использования, поскольку легкость отделения такого иммобилизованного фермента от продуктов реакции позволяет применять его многократно. В связи с этим в настоящей работе получена иммобилизованная неорганическая пирофосфатаза и проведено изучение некоторых ее свойств.

Фермент иммобилизовали на сефарозе 4В, слабоактивированной бромцианом, в фосфатном буфере. Для иммобилизации использовали белок с очень высокой удельной активностью (900 Е/мг). При выборе условий иммобилизации исходили из следующих соображений. Ковалентное связывание фермента с активированной бромцианом сефарозой осуществляется за счет  $\epsilon$ -аминогрупп лизина. В молекуле неорганической пирофосфатазы содержится  $\sim 50$  остатков лизина [1], причем два из них входят в состав активного центра [2]. Функционально важные остатки лизина не затрагиваются, если проводить модификацию в присутствии неорганического пирофосфата. Неорганический ортофосфат также защищает фермент от инактивации, хотя и менее эффективно.

Активированную сефарозу получали по методу Пората [3], используя для активации 1%-ный раствор бромциана. Реакцию с ферментом проводили в фосфатном буфере (рН 8,0) в течение 18 ч при 4°. Нерастворимый белок отфильтровывали, промывали фосфатным буфером и водой до отсутствия поглощения при 280 нм и нулевой ферментативной активности.

Для определения концентрации белка на смоле проводили полный кислотный гидролиз и состав гидролизата исследовали на аминокислотном анализаторе. Концентрацию белка рассчитывали по содержанию ряда аминокислот. Удельную активность иммобилизованного фермента определяли по количеству микромолей неорганического пирофосфата, расщепляемого до ортофосфата 1 мг фермента за 1 мин.

Проведенный анализ показал, что концентрация фермента на смоле составляет 35 мкг/мл препарата, а активность 650 Е/мг белка. Таким образом, была получена иммобилизованная неорганическая пирофосфатаза с высокой удельной активностью, которая составила 70% от активности исходного нативного фермента.

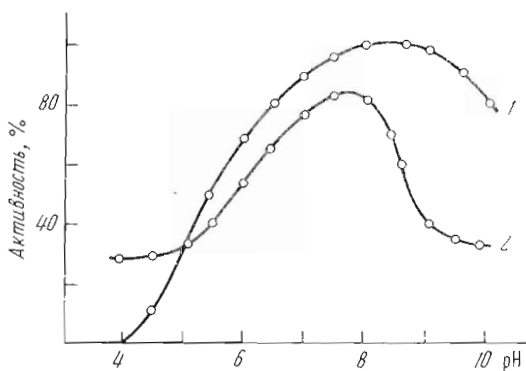


Рис. 1. Зависимость устойчивости иммобилизованной (1) и нативной (2) неорганической пирофосфатазы от pH (1 ч, 30°)

Далее, в работе была изучена устойчивость иммобилизованного фермента при различных значениях pH и разных температурах в сравнении с устойчивостью нативного фермента.

Зависимость устойчивости белка от pH исследовали в диапазоне pH 4—10 при 30°. Иммобилизованный и нативный фермент параллельно выдерживали в соответствующем буфере в течение часа и определяли ферментативную активность. Полученные результаты представлены на рис. 1. Иммобилизация фермента сопровождается резким уменьшением устойчивости в кислой области (pH < 5). Напротив, при переходе к нейтральным pH и особенно в щелочной области устойчивость нерастворимого фермента существенно увеличивается. Так, при pH 9 иммобилизованный фермент сохраняет 90% активности, в то время как активность нативного белка падает до 40%. Стабильность иммобилизованного белка в щелочной среде позволит в дальнейшем провести кинетические исследования фермента в этой области pH, где лежат рК ряда функциональных групп белков.

Термостабильность иммобилизованного белка была изучена при температурах 30, 40 и 50°. Поскольку максимальную разницу в устойчивости иммобилизованного и нативного фермента наблюдали в щелочной среде, то тепловую инактивацию исследовали при pH 9,0—9,5.

Фермент инкубировали в 0,05 М боратном буфере и через определенные промежутки времени измеряли его активность. Наибольшие различия между нерастворимым и нативным белком наблюдались при 30°. Как видно из рис. 2, тепловая инактивация как нерастворимой, так и нативной пирофосфатазы происходит в две стадии. Иммобилизация сопровождается уменьшением скорости первой быстрой стадии, что приводит к большему сохранению удельной активности препарата, т. е. увеличивает его термостабильность.

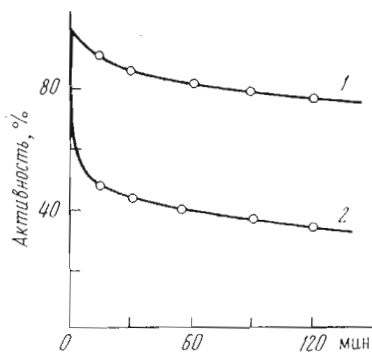


Рис. 2

Рис. 2. Инактивация иммобилизованной (1) и нативной пиррофосфатазы (2) при 30° (рН 9,4) в зависимости от времени

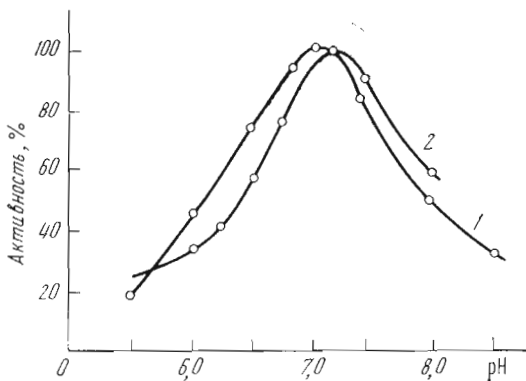


Рис. 3

Рис. 3. Ферментативная активность иммобилизованной (1) и нативной (2) неорганической пиррофосфатазы при различных рН

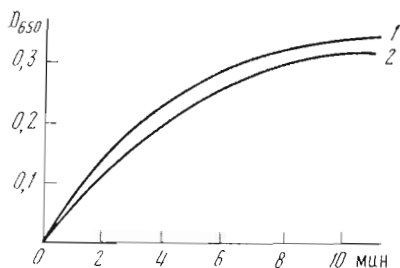


Рис. 4

Рис. 4. Кинетическая кривая зависимости гидролиза пиррофосфата натрия иммобилизованной (1) и патиивной (2) пиррофосфатазой при постоянной высокой концентрации ионов магния ( $2 \cdot 10^{-3}$  M)

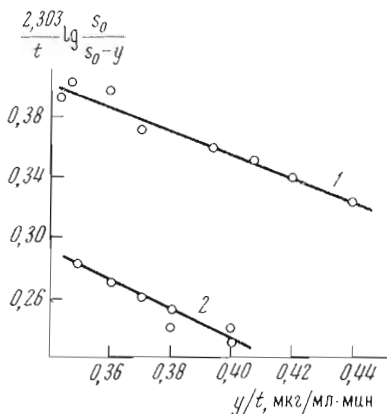


Рис. 5

Рис. 5. Определение  $K_m$  иммобилизованной (1) и нативной (2) пиррофосфатазы

Особый интерес представляет характеристика каталитических свойств иммобилизованной пиррофосфатазы — зависимости ферментативной активности от рН, константы связывания пиррофосфата магния и субстратной специфичности.

Влияние рН на ферментативную активность иммобилизованного белка было изучено в диапазоне рН 5,5—8,5. Представленная на рис. 3 зависимость гидролиза неорганического пиррофосфата от рН обнаруживает наличие рН-оптимума, равного 7,0—7,1. Для сравнения приведены литературные данные для нативного фермента. Оптимумы гидролиза иммобилизованного и нативного фермента практически совпадают.

Определение константы связывания субстрата — пиррофосфата магния иммобилизованным ферментом  $K_m$  проводили при постоянной высокой концентрации магния, рН 7,2 и 25°. Поскольку при гидролизе пиррофосфата магния ферментом не происходит ингибирования продуктом реакции [6], для этой цели использовали интегральное уравнение Михаэлиса — Ментен. Кинетическую кривую накопления продукта (рис. 4) представля-

ли в координатах

$$\left( \frac{2,303}{t} \lg \frac{s_0}{s_0 - y}; \frac{y}{t} \right),$$

где  $s_0$  — начальная концентрация субстрата, а  $y$  — его убыль к моменту времени  $t$ . Величину  $K_m$  определяли по тангенсу угла наклона полученной прямой (рис. 5).

Найдено, что  $K_m$  иммобилизованного и нативного ферментов соответственно равны  $2,3 \cdot 10^{-5}$  и  $2,4 \cdot 10^{-5}$ , т. е. иммобилизация фермента не сказывается на константе связывания пирофосфата магния.

Как было сказано выше, неорганическая пирофосфатаза гидролизует неорганический пирофосфат в присутствии ионов двухвалентных металлов, из которых наиболее эффективными являются ионы  $Mg^{2+}$ . При замене ионов  $Mg^{2+}$  на ионы  $Zn^{2+}$  фермент приобретает АТР-азную активность. В настоящей работе было найдено, что иммобилизация неорганической пирофосфатазы на сефарозе сопровождается утратой способности гидролизовать АТР. Поскольку образование активного комплекса фермента, способного превращаться в продукты реакции, связано с конформационными перестройками его молекулы [7—9], возможно, что в ферменте, связанном с сефарозной матрицей, эта конформационная перестройка затруждена.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали сефарозу 4В фирмы «Pharmacia» (Швеция). Бромциан синтезировали по методу работы [10]. Неорганическую пирофосфатазу выделяли из маточных пекарских дрожжей по методу Купермана и соавт. [11]. Активность фермента составляла 900 Е/мг. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрическим методом, считая, что при концентрации белка 1 мг/мл раствор имеет величину экстинкции 1,45 при 280 нм [5]. Ферментативную активность определяли при 30° по скорости расщепления пирофосфата натрия до ортофосфата при рН 7,2 в 0,03 М трис-НСl буфере, содержащем  $1,7 \cdot 10^{-3}$  М  $Mg^{2+}$  и  $1,7 \cdot 10^{-3}$  М пирофосфат натрия. Количество неорганического фосфата определяли по методу работы [4].

*Иммобилизация неорганической пирофосфатазы.* 20 мл сефарозы 4В обрабатывали 40 мл 1%-ного раствора бромциана при рН 10,5—11,5 в течение 8 мин при 20°. Активированный гель фильтровали, промывали в течение 2 мин 400 мл холодного раствора 0,1 М бикарбоната натрия рН 9 и прибавляли к раствору 3,6 мг фермента в 20 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 8,0). Иммобилизацию фермента проводили 18 ч при 4°. Сефарозу с иммобилизованным белком отфильтровывали, промывали 500 мл 0,05 М фосфатного буфера, 500 мл 0,2 М раствора хлористого натрия и водой до полного отсутствия в промывных водах поглощения при 280 нм и пирофосфатазной активности.

*Определение количества иммобилизованного белка.* Для определения концентрации белка 1—3 мл отстоявшегося геля подвергали полному кислотному гидролизу (6 н. НСl, 105°, 48 ч). Состав гидролизата анализировали на аминокислотном анализаторе. Количество белка рассчитывали по содержанию глутаминовой кислоты, аланина и валина.

*Определение удельной активности иммобилизованной пирофосфатазы.* Хорошо отстоявшийся сефарозный гель со связанным белком разбавляли в 4 раза 0,05 М трис-НСl буфером (рН 7,2). Аликвоту суспензии смолы (0,1 мл) вносили в 6 мл 0,03 М трис-НСl буфера (рН 7,2), содержащего  $1,7 \cdot 10^{-3}$  М пирофосфат натрия и  $1,7 \cdot 10^{-3}$  М  $MgSO_4$ , и инкубировали при 30° в течение 3 мин при постоянном перемешивании. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 5%-ного раствора молибдата аммония в 4 н.  $H_2SO_4$  и определяли количество ортофосфата.

*pH-Стабильность иммобилизованного фермента.* 0,025 мл сефарозного геля, содержащего 1,7 мкг фермента, инкубировали в 1 мл соответствующего буфера (рН 4—10) при 30° в течение 60 мин, определяли ферментативную активность и ее отношение к величине активности фермента без предварительной инкубации. Одновременно аналогичной обработке подвергали нативный белок.

*Тепловая инактивация иммобилизованного фермента.* 0,025 мл сефарозного геля, содержащего 1,7 мкг фермента, выдерживали при 30—50° и рН 9,0—9,5. Через определенные промежутки времени (0—2 ч) к суспензии прибавляли 6 мл смеси для определения ферментативной активности и определяли остаточную активность, как описано выше. Параллельно в тех же условиях исследовали инактивацию нативного фермента.

*Гидролиз неорганического пирофосфата иммобилизованной пирофосфатазой при различных рН.* 1,7 мкг иммобилизованного фермента прибавляли к 6 мл трис-малеатного буфера (рН 5,5—8,5), содержащего  $1,7 \cdot 10^{-3}$  М пирофосфат и  $1,7 \cdot 10^{-3}$  М сульфат магния, перемешивали 3 мин и определяли количество ортофосфата.

*Исследование АТР-азной активности иммобилизованной пирофосфатазы.* 1,7 мкг иммобилизованного фермента инкубировали в 4,5 мл 0,05 М трис-малеатного буфера, содержащего 1 мМ АТР, 2 мМ хлористый цинк, в течение 30 мин и прибавляли 5%-ный раствор молибдата аммония в 4 н. серной кислоте. Параллельно ставили опыт с 0,6 мкг нативного фермента.

*Определение константы Михаэлиса иммобилизованной пирофосфатазы.* 50 мл 0,04 М трис-НСI буфера, содержащего  $4,2 \cdot 10^{-5}$  М пирофосфат,  $2 \cdot 10^{-3}$  М сульфат магния, перемешивали 10 мин при 25° в термостатированном сосуде и добавляли 1,4 мкг иммобилизованного фермента. За ходом реакции следили по количеству образующегося ортофосфата [12]. В аналогичных условиях проводили опыт с 1,4 мкг нативного фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Heinrikson R., Sterner R., Noyes C., Cooperman B., Bruckmann R. (1973) J. Biol. Chem., 218, 2521—2528.
2. Скляпкина В. А., Медведова И. В., Аваева С. М. (1973) Докл. АН СССР, 214, 494—496.
3. Axen R., Porath I., Snaaback S. (1967) Nature, 214, 1302—1304.
4. Weil-Malherbe H., Green R. (1951) Biochem. J., 49, 286—292.
5. Kunitz M. (1961) Arch. Biochem. Biophys., 92, 270—272.
6. Cooperman B., Chiu N. (1973) Biochemistry, 12, 1670—1676.
7. Шафранский Ю. А., Аваева С. М. (1973) Биохимия, 38, 1248—1254.
8. Шафранский Ю. А., Аваева С. М., Котельников А. И. (1975) Биоорг. химия, 1, 203—207.
9. Braga E. A., Awaeva S. M. (1972) FEBS Lett., 27, 251—255.
10. Снятезы органических препаратов (1949) 2, 123—124, И. Л., М.
11. Cooperman B., Chiu N., Bruckmann R., Bunik C., McCenna G. (1973) Biochemistry, 12, 1665—1669.
12. Baykov A., Awaeva S. (1973) Eur. J. Biochem., 32, 136—142.

Поступила в редакцию  
16. X. 1974

#### THE PROPERTIES OF YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE IMMOBILIZED ON SEPHAROSE

PLAKSINA E. A., SKLYANKINA V. A., MEVKH A. T., AWAIEVA S. M.

Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov  
State University, Moscow

Yeast inorganic pyrophosphatase immobilized on Sepharose of an activity of about 650 U/mg and a protein concentration of 35  $\mu$ g/ml has been prepared. The pH dependence of the enzymatic activity shows that the immobilized enzyme has an increased stability in alkaline media. When immobilized, the enzyme has the same pH optimum and the substrate (magnesium pyrophosphate) binding constant. However, the ATPase activity is thereby completely lost.