



УДК 577.15.012

## ПОЛУЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ

*Торчилин В. П.*

*Научно-исследовательский институт кардиологии им. А. Л. Мясникова  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Разработан способ иммобилизации  $\alpha$ -амилазы на карбоксилсодержащих полимерных носителях с использованием различных карбодимидов. Показано, что высокоактивные препараты иммобилизованного фермента могут быть получены при иммобилизации как в водной, так и в спиртовой среде. Синтезированы образцы, содержащие до 200 мг активного фермента на 1 г носителя и обладающие повышенной рН- и термостабильностью.

К настоящему времени известно несколько способов иммобилизации  $\alpha$ -амилазы. Так, например, иммобилизованная  $\alpha$ -амилаза была получена при использовании в качестве носителей для ковалентного связывания производных целлюлозы [1], акриловых полимеров [2], полиальдегида [3], а также включением в полиакриламидный гель [4]. Однако, как правило, полученные препараты не содержали большого количества активного фермента, к тому же определенную сложность представляла предварительная обработка — активирование соответствующих носителей.

Мы осуществили иммобилизацию  $\alpha$ -амилазы на носителях, содержащих карбоксильные группы, с помощью сочетающего агента — карбодимида. Хотя в принципе для описываемого способа пригодны любые карбоксилсодержащие материалы, мы использовали полипропиленовую ткань, содержащую до 120% (по весу) привитой акриловой кислоты и полиэтилентерефталатную пленку, предварительно подвергнутую частичному гидролизу обработкой концентрированной HCl при нагревании.

Иммобилизацию  $\alpha$ -амилазы (препарат «Амилоризин П10х» Рассказовского химического завода с удельной активностью 2300 ед/г белка) проводили из раствора в водном ацетатном буфере при рН 5 с использованием в качестве сочетающего агента водорастворимого карбодимида и из суспензии в органическом растворителе — этиловом спирте при использовании в качестве сочетающего агента дициклогексилкарбодимида. Во всех случаях иммобилизацию проводили перемешиванием образцов носителя в растворе или в суспензии фермента в присутствии соответствующего карбодимида при температурах 0—+5° с последующей тщательной отмывкой препарата. Количество связываемого фермента удавалось легко регулировать изменением времени реакции и концентрации карбодимида. В обоих случаях были получены высокоактивные препараты иммобилизованной  $\alpha$ -амилазы, содержащие до 200 мг активного фермента на 1 г носителя при общем количестве связанного белка 250—280 мг/г носителя. При этом оказалось, что при проведении иммобилизации из водного

раствора и из спиртовой суспензии при одинаковом соотношении всех компонентов (фермента, носителя и сочетающего агента) получают препараты с примерно одинаковым максимальным содержанием активного фермента, которого удается достичь за время реакции 18 ч в воде и 24 ч в спиртовой среде.

Нами были изучены некоторые свойства иммобилизованной на карбоксилсодержащих носителях  $\alpha$ -амилазы. (Поскольку они оказались практически одинаковы для препаратов, полученных в водной и в спиртовой среде, то далее мы не будем различать препараты иммобилизованной  $\alpha$ -амилазы по методике получения.)

Оказалось, что для иммобилизованной  $\alpha$ -амилазы заметно расширяется pH-интервал ее активности: если для «Амилоризина П10х» он составлял 3,5—5,6, то для иммобилизованного препарата — 2,5—7,0, при этом pH-оптимум (при использовании в качестве субстрата водорастворимого крахмала) для нативного и иммобилизованного ферментов соответствовал значению pH 4,7. Кроме того, иммобилизованная  $\alpha$ -амилаза, в отличие от нативной, не теряет своей активности в 2М водном растворе NaCl и сохраняет до 20% начальной активности после выдерживания в течение суток при температуре 60°.

Таким образом, иммобилизация  $\alpha$ -амилазы на карбоксилсодержащих носителях с помощью соответствующих карбодинимидов возможна в водных и в спиртовых средах и позволяет получить высокоактивный препарат с повышенной термо- и pH-стабильностью.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Barker S. A., Somers P. J., Epton R. (1968) Carbohydr. Res., 8, 491—497.
2. Barker S. A., Somers P. J., Epton R. (1970) Carbohydr. Res., 14, 323—326.
3. Epton R., McLaren J. V., Thomas R. H. (1970) Biochem J., 123, 21—28.
4. Bernfeld P., Wan J. (1963) Science, 142, 678—679.

Поступила в редакцию  
19.XII.1974

#### PREPARATION AND SOME PROPERTIES OF IMMOBILIZED $\alpha$ -AMYLASE

TORCHILIN V. P.

*A. L. Myasnikov Institute of Cardiology, Academy  
of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

A new procedure for  $\alpha$ -amylase immobilization on carboxylic polymer carriers is described which involves the use of various carbodiimides. Highly active preparations of immobilized enzyme were obtained in aqueous media as well as in ethanolic suspension. The samples prepared contained up to 200 mg of the enzyme per g of the carrier and possessed high pH- and thermostability.