



УДК 577.152.113 *11.12.04

© 1994 И. А. Бутович, Т. В. Могилевич,
С. А. Огий, М. Ю. Кутняя, В. П. Кухарь

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОКСИГЕНАЗЫ ИЗ СОЕВЫХ БОБОВ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ КРЕМНЕЗЕМЕ

Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Ключевые слова: липоксигеназа из соевых бобов; иммобилизация; модифицированные кремнеземы; каталитическая активность; линолевая кислота.

Исследованы каталитические свойства липоксигеназы из соевых бобов, иммобилизованной на модифицированных кремнеземах. Фермент наиболее активен при иммобилизации на аминокремнеземе, активированном глутаровым альдегидом, и карбоксикремнеземе, активированном N-гидроксисукцинимидом, а также при физической сорбции на аминокремнеземе. Для липоксигеназы, иммобилизованной на аминокремнеземе, активированном глутаровым альдегидом, определены кинетические параметры реакции окисления линолевой кислоты. Препараты иммобилизованной липоксигеназы были использованы в синтезе гидропероксида линолевой кислоты (выход 96—98%), структура полученного продукта подтверждена методами УФ- и ИК-спектроскопии, ВЭЖХ; ТСХ и поляриметрии.

Уникальные каталитические свойства ферментов (высокая удельная активность, специфичность, функционирование при комнатной температуре и нормальном давлении) позволяют использовать их для получения различных природных соединений в лабораторных и промышленных масштабах [1, 2]. Биокатализаторы применяют как в растворимой, так и в иммобилизованной форме. Закрепление фермента на твердой матрице упрощает процесс синтеза, позволяет использовать катализатор многократно, повышает его стабильность в ходе реакции.

Ферментативный катализ имеет особые преимущества при получении малых количеств веществ, обладающих высокой биологической активностью, например стероидов, антибиотиков и эйкозаноидов [3, 4]. К последним относятся лейкотриены и липоксины — мощные биологические регуляторы с широким спектром действия [5, 6], в синтезе которых участвуют ферменты семейства липоксигеназ.

Липоксигеназы катализируют окисление полиненасыщенных жирных кислот (PUFA) до гидропероксидов, а затем трансформацию последних до кето-, эпокси- и гидроксипроизводных. В последнее время появились данные о биологической активности липоксигеназных метаболитов, не относящихся к классам лейкотриенов и липоксинов, — производных арахидоновой, линолевой, линоленовой кислот.

Используемые сокращения: PUFA — полиненасыщенные жирные кислоты; АСХ-1,5 — аминоксикремнезем с АСХ-1,5; ГА-производные — кремнеземные носители, активированные глутаровым альдегидом.

Адрес для переписки: 253094, Киев, Мурманская 1, Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины (тел.: 543-61-69).

Зависимость количества связавшегося с ГА-аминосилипором фермента от его начальной концентрации
Условия см. в «Экспериментальной части»

Концентрация исходного раствора фермента, мг/мл	Количество фермента, мг/г носителя		Активность иммобилизованной липоксигеназы, мкмоль/(мин·г)	Кажущаяся степень сохранения активности, %
	взято	связалось		
0,05	0,5	0,5	0,34	9,6
0,10	1,0	1,0	—	—
0,20	2,0	1,8	—	—
0,50	5,0	4,0	1,52	5,3
1,00	10,0	4,6	—	—

Хотя биологическая роль этих соединений изучена недостаточно полно, можно отметить их участие в реакциях иммунитета животных и растений [7], в процессах ионного транспорта [8], в формировании различных патологических состояний организма животных и человека [9].

Несомненный интерес представляет применение иммобилизованных липоксигеназ в регио- и стереоселективном синтезе биологически активных производных PUFA. Настоящая работа посвящена изучению свойств липоксигеназы (КФ 1.13.11.12) из соевых бобов, иммобилизованной на модифицированных кремнеземах, и ее использованию для получения гидропероксида линолевой кислоты.

В качестве носителей использовали пористые кремнеземы Silipor 030, силехром (СХ-1,5) и непористый дисперсный кремнезем аэросил-175. Модификацию носителей осуществляли аминированием γ -аминопропилтриэтоксисиланом [10] с последующим активированием аминопроизводного мутаровым альдегидом (ГА-аминосилипор, ГА-АСХ-1,5 и ГА-аминоаэросил соответственно) [11].

Исследовали каталитические свойства липоксигеназы, иммобилизованной на ГА-аминосилипоре, в реакции окисления линолевой кислоты. Зависимость количества фермента, связавшегося с носителем, от его начальной концентрации в растворе приведена в табл. 1. Активность липоксигеназы измеряли в исходном растворе и в надосадочной жидкости (см. «Экспериментальную часть») после иммобилизации и из полученных данных рассчитывали количество связанного фермента. При начальной концентрации фермента 0,05—0,20 мг/мл наблюдали практически полное связывание его с носителем. Дальнейшее увеличение содержания белка в исходном растворе приводило к уменьшению процента связывания липоксигеназы. Кажущаяся степень сохранения активности фермента при иммобилизации составила 4—10%. С ростом количества связанного фермента наблюдалась тенденция к снижению кажущейся степени сохранения активности (табл. 1), что может свидетельствовать о влиянии фактора диффузии субстрата или продукта в порах носителя на свойства иммобилизованного фермента.

Зависимость стационарной скорости окисления линолевой кислоты липоксигеназой, иммобилизованной на ГА-аминосилипоре, от концентрации субстрата (рис. 1) описывается уравнением Михаэлиса — Ментен в диапазоне концентраций 0,01—0,10 мМ. Рассчитанная величина $K_{m(каж)}$ составила $0,104 \pm 0,020$ мМ. Ранее было показано, что значение K_m для растворимого (неиммобилизованного) фермента равно 0,01 мМ [10]. Более высокое значение $K_{m(каж)}$ для иммобилизованного фермента может быть связано с влиянием диффузии на процесс катализа (увеличение значения $K_{m(каж)}$ при иммобилизации на пористых носителях описано для целого ряда ферментов [12]).

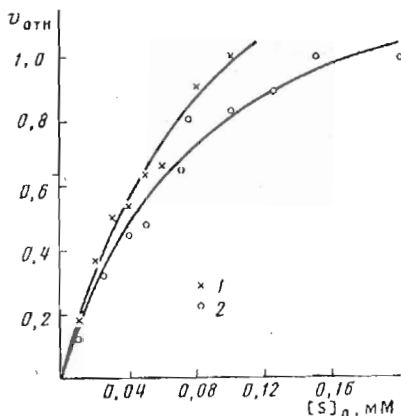


Рис. 1

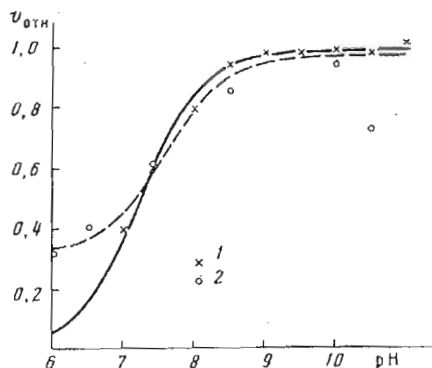


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость относительной стационарной скорости ($v_{отн}$) окисления линолевой кислоты под действием иммобилизованной липоксигеназы от концентрации субстрата. Носитель — ГА-аминосилипор (1) и ГА-аминоаэросил (2). За единицу $v_{отн}$ приняты значения скорости реакции в присутствии 1 г препарата липоксигеназы: 1 — 0,026 ммоль/мин ($[S]$ 0,1 мМ; $[E]$ 4,6 мг/г носителя); 2 — 0,950 ммоль/мин ($[S]$ 0,1 мМ, $[E]$ 10,0 мг/г носителя)

Рис. 2. Зависимость относительной стационарной скорости реакции окисления линолевой кислоты ($v_{отн}$) растворимой (1) и иммобилизованной на ГА-аминосилипоре (2) липоксигеназой от pH. За единицу $v_{отн}$ приняты значения скорости реакции: 1 — 1,7 мМ/мин, 2 — 0,068 мМ/мин ($[S]$ 0,1 мМ, pH 9,5)

Рис. 3. ИК-спектр поглощения продукта окисления линолевой кислоты (1) иммобилизованной липоксигеназой. Для сравнения приведен ИК-спектр гидропероксида трет-бутила (2)

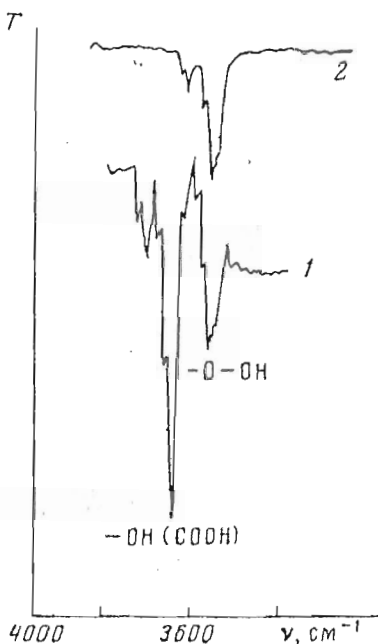


Рис. 3

Для проверки этого предположения были исследованы каталитические свойства липоксигеназы, иммобилизованной на непористом носителе — ГА-аминоаэросиле. Зависимость скорости окисления линолевой кислоты от концентрации субстрата (рис. 1) в этом случае описывалась уравнением Михаэлиса — Ментен в диапазоне концентраций 0,01—0,15 мМ, величина $K_{m(каж)}$ составила $0,087 \pm 0,018$ мМ, при иммобилизации фермент сохранял до 16% исходной активности. Увеличение степени сохранения активности и некоторое снижение значения $K_{m(каж)}$ фермента при иммобилизации на аэросиле по сравнению с пористым носителем подтверждает существование внутридиффузионного торможения в катализе липоксигеназой, иммобилизованной на ГА-аминосилипоре. Низкая в целом степень сохранения активности фермента при иммобилизации, а также высокое значение $K_{m(каж)}$

Влияние способа связывания с носителем на активность иммобилизованной липоксигеназы из соевых бобов *

Носитель	Степень связывания, %	Активность, мкмоль/(мин·г)·10 ²
ГА-АСХ-1,5	100	111,1
ЦН-АСХ-1,5	100	6,0
НФ-АСХ-1,5	100	3,3
СИ-АСХ-1,5	92	147,2
АСХ-1,5	100	69,5
СООН-АСХ-1,5	100	3,3
Аминосилипор	100	213,2

* Условия иммобилизации см. «Экспериментальную часть». Начальная концентрация фермента в растворе 0,05 мг/мл.

могут быть следствием изменения конформации молекулы липоксигеназы в результате химического связывания с носителем, а также стерических затруднений при взаимодействии фермента с субстратом.

Зависимость стационарной скорости ферментативной реакции от величины рН для липоксигеназы, иммобилизованной на ГА-аминосилипоре, приведена на рис. 2. Общий вид кривой и значение рН-оптимума каталитической реакции (рН 9,0) совпадают с аналогичными данными, полученными для растворимого фермента [13]. Уменьшение активности иммобилизованного препарата при значениях рН 10 и выше может быть связано с деструкцией носителя в щелочной среде [14].

Для изучения влияния природы поверхности носителя и способа иммобилизации фермента на его активность были получены препараты иммобилизованной липоксигеназы, различающиеся типом связи фермент—носитель (табл. 2). С использованием аминированного силохрома СХ-1,5 был получен ряд модифицированных носителей. АСХ-1,5 активировали хлористым циануром (ЦН-АСХ-1,5) [11]. Карбоксилсодержащие носители получали обработкой АСХ-1,5 янтарным ангидридом, а затем незамещенные аминогруппы, блокировали уксусным ангидридом (СООН-производное) [15]. Полученные СООН-производные активировали *л*-нитрофенолом (НФ-производное) или *N*-гидроксисукцинимидом (СИ-производное) [15]. Во всех случаях наблюдали практически полное связывание фермента с носителями. Вместе с тем активность полученных препаратов была различной. В ходе измерения скорости реакции не наблюдалось смывания фермента с поверхности изучаемых носителей. Наиболее высокой активностью обладали препараты липоксигеназы: 1) сорбированной на аминокремнеземах (аминосилипор, АСХ-1,5); 2) иммобилизованной на ГА-АСХ-1,5; 3) иммобилизованной на СИ-АСХ-1,5. Можно отметить, что фермент проявлял высокую активность на поверхности, содержащей аминогруппы. В то же время активность препаратов липоксигеназы, физически сорбированной на кремнеземе, содержащем карбоксильные группы, существенно ниже.

Препараты липоксигеназы, иммобилизованной на ГА-аминосилипоре, были использованы для получения гидропероксидов РУФА, в том числе линолевой кислоты [16, 17]. Метод состоит в пропускании раствора субстрата через слой гранул модифицированного кремнезема, на котором иммобилизована липоксигеназа, после чего следует концентрирование продукта на гидрофобизованном силикагеле и элюирование его органическим растворителем (метанол). Выход гидропероксида составил 96—98%. В УФ-спектре поглощения продукта окисления линолевой кислоты иммобилизованной липоксигеназой обнаружен один максимум

при 235 нм, что свидетельствует об образовании сопряженного диенового хромофора гидропероксида линолевой кислоты. В ИК-спектрах продукта реакции и гидропероксида *трет*-бутила (модельное соединение) (рис. 3) полоса поглощения 3400—3600 см⁻¹ соответствует валентным колебаниям связи —О—Н гидроперекисной группировки [18]. Полученный продукт проявляет оптическую активность, $[\alpha]_D^{25} = -8^\circ$. Продукт окисления линолевой кислоты, иммобилизованной липоксигеназой, достаточно гомогенен по данным тонкослойной хроматографии (пластинки Silufol UV 254) в системе гексан—диэтиловый эфир, 65 : 35 (проявление парама иода, анисовым альдегидом [19]) и ВЭЖХ. R_f линолевой кислоты и гидропероксида линолевой кислоты составляют 0,49 и 0,18 соответственно. Пятно на пластинке ТСХ, соответствующее гидропероксиду линолевой кислоты, проявляется специфическим реактивом для определения пероксидных групп — N, N-диметил-*n*-фенилендиамин [20]. Время удерживания продукта окисления линолевой кислоты при обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонокка Lichrosorb RP 18; 4,6 × 250 мм; элюент — метанол — вода — уксусная кислота, 70 : 30 : 0,01, скорость 1 мл/мин) составляет 69,9 мин.

Таким образом, в работе были исследованы каталитические свойства липоксигеназы соевых бобов, иммобилизованной на модифицированном кремнеземе. Препараты липоксигеназы, иммобилизованной на ГА-аминосилепоре, были использованы в синтезе 13(L₂)-гидропероксида линолевой кислоты с выходом 96—98%.

Экспериментальная часть

В работе использовали липоксигеназу из соевых бобов (Fluka, Швейцария), кремнеземные носители Silpor 030 (ЧСФР) и силохром СХ-1,5 («Реахим», СССР) с размерами частиц 0,125—0,16 и 0,25—0,5 мм соответственно, аэросил-175 («Реахим», СССР), линолевую кислоту (Sigma, США), органосиланы («Реахим», СССР).

Кинетические измерения проводили на спектрофотометрах Ultrospek II (ЛКВ, Швеция), СФ-46 (СССР). Спектры поглощения продуктов реакции в ультрафиолетовой и инфракрасной области регистрировали на спектрофотометрах Specord M40 и Specord M80 (Carl Zeiss, Jena, ГДР). Разделение реакционной смеси методом обращенно-фазовой ВЭЖХ осуществляли на хроматографической системе фирмы ЛКВ (Швеция).

При иммобилизации 1 г активированного носителя суспендировали в 10 мл раствора фермента (0,95—1,00 мг/мл) в 0,1 М Na-боратном буфере, pH 8,5, и выдерживали 12—14 ч при 4° С. Несвязавшийся фермент отмывали 1 М NaCl в 0,1 М Na-боратном буфере, pH 8,5.

Активность растворимой и иммобилизованной липоксигеназы определяли в реакции окисления линолевой кислоты спектрофотометрически по росту оптического поглощения при длине волны 235 нм [21]. Молярный коэффициент поглощения гидропероксида линолевой кислоты принимали равным 23 000 М⁻¹ см⁻¹ [22]. Активность иммобилизованного фермента определяли с использованием проточной кюветы и проточного реактора, заполненного иммобилизованным ферментом, при концентрации субстрата 0,1 мМ. Раствор субстрата рециркуляционно прокачивали через проточный реактор и кювету. Скорость прокачивания выбирали таким образом, чтобы ее значение не влияло на начальную скорость ферментативной реакции. Активность липоксигеназы, иммобилизованной на аэросиле, определяли амперометрически с помощью кислородного электрода Кларка [14]. Из спектрофотометрических и амперометрических измерений рассчитывали значения активности липоксигеназы как начальную скорость ферментативной реакции (мкмоль·мин⁻¹), отнесенную к 1 мг лиофилизированного фермента или к 1 г сухого препарата иммобилизованного фермента.

Значения $K_{п(каж)}$ и v_{max} рассчитывали по уравнению Михаэлиса — Ментен методом нелинейной регрессии, использующим алгоритм Марквардта (программа Tabl Curve, Jandel Scientific).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Whitesides G. M., Wong C. H.//*Angev. Chem. Int. Ed. Engl.* 1985. V. 24. P. 617—638.
2. Martinek K., Semenov A. N.//*J. Appl. Biochem.* 1981. V. 3. № 3. P. 93—126.
3. Шваядас В. К.//*Биотехнология/Ред. А. А. Баев. М.: Наука, 1984. С. 138—149.*
4. Corey E. J., Albright J. O., Barton A. E., Hashimoto S.-I.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1980. V. 102. № 4. P. 1435—1436.
5. Hamberg M., Samuelsson B.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1974. V. 71. P. 3400—3404.
6. Serhan C. N., Hamberg M., Samuelsson B.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 5335—5339.
7. Авдюшко С. А., Чилова Л. И., Озерецковская О. Л., Чаленко Г. И., Имбс А. В., Безуглов С. Г., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д.//*Докл. АН СССР.* 1987. Т. 296. № 4. С. 1012—1014.
8. Aisen P. S., Haines K. A., Given W., Abramson S. B., Pras M., Serhan C., Hamberg M., Samuelsson B., Weisman G.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 1232.
9. Liu V., Timar J., Howleft J., Diglio C. A., Honn K. V.//*Cell Regul.* 1991. № 2. P. 1045—1055.
10. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии./Ред. Г. В. Лисичкин. М.: Химия, 1986. 247 с.
11. Имобилизованные ферменты/Ред. И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек. М.: МГУ, 1976. Т. 1. 296 с.
12. Имобилизованные ферменты/Ред. И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек. М.: МГУ, 1976. Т. 2. 358 с.
13. Бутович И. А., Могилевич Т. В., Кухарь В. П.//*Укр. биохим. журн.* 1989. Т. 61. № 2. С. 54—58.
14. Тертых В. А., Яцишпольский В. В., Котляр С. С.//*Докл. АН УССР.* 1981. № 11. С. 52—55.
15. Туркова Я. Аффинная хроматография. Пер. с англ. Л. В. Козлова. М.: Мир, 1980. 471 с.
16. Бутович И. А., Могилевич Т. В., Цысь Е. В., Кухарь В. П.//*Тез. докл. IV Всес. симпоз. «Синтез и исследование простагландинов».* Минск, 1989. С. 109.
17. Бутович И. А., Кухарь В. П., Бридня В. П., Цысь Е. В. Способ получения гидропероксида линолевой кислоты: А. с. 1631086 СССР//Б. И. 1991. № 8. С. 72.
18. Общая органическая химия/Ред. Бартон Д. и Оллис У. Д. Т. 2. Кислородсодержащие соединения/Ред. Стоддарт Дж. Ф.: Пер. с англ. М.: Химия, 1982. 856 с.
19. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография: Пер. с англ. М.: Мир, 1976. 541 с.
20. Regdel D., Schewe T., Rapoport S. M.//*Biomed. et biochim. acta.* 1985. V. 44. № 10. P. 1411—1428.
21. Holman R. T., Bergstrom F.//*The Enzymes/Ed. B. Sumner.* 1954. V. 2. P. 559—580.
22. Gibian M., Vanderberg B.//*Analyt. Biochem.* 1987. V. 163. P. 343—349.

Поступила в редакцию 3.VI.1993

После доработки 4.III.1994

*I. A. Butovich, T. V.-Mogilevich, S. A. Ogiy, M. U. Kutniaya,
V. P. Kukhar*

CATALYTIC PROPERTIES OF SOYBEAN LIPOXYGENASE,
IMMOBILIZED ON MODIFIED SILICA

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, Academy of Sciences of
Ukraine, Kiev*

Catalytic properties of soybean lipoxygenase immobilized on silica have been studied. Lipoxygenase had the highest activity in the case of covalent immobilization on aminosilica activated by glutaraldehyde or on carboxysilica activated by N-hydroxysuccinimide and after physical sorption on aminosilica. Kinetic properties of immobilized lipoxygenase in the reaction of oxygenation of linoleic acid proved to be as follows: optimal pH 9.0; observed K_m 0.104 ± 0.20 mM. The observed residual activity of the immobilized enzyme was 4—16%. The immobilized lipoxygenase has been used for the synthesis of 13(S)-hydroperoxide of linoleic acid with a 96—98% yield. The product's structure was studied by UV and IR spectrometry, HPLC, TLC and polarimetry.