



УДК 577.152.342\*11.03

© 1994 Л. В. Сиголаева, Н. Л. Еремеев,  
Н. Ф. Казанская

### АНОМАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММОБИЛИЗОВАННОГО $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет*

Каталитическая активность препаратов  $\alpha$ -химотрипсина, ковалентно включенного в матрицу поли-N-изопропилакриламида, не подчиняется уравнению Аррениуса выше некоторой температуры. Начиная с нижней критической температуры растворения полимера, при которой изменяется его структура (гидрофобизация), повышение температуры вызывает падение скорости реакции, катализируемой ферментом. Полученный эффект обратим. Наблюдается корреляция температурных зависимостей активности иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина и степени обезвоживания носителя. Уменьшение содержания воды в матрице приводит к смене субстратной специфичности иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина.

Одно из интересных направлений современной инженерной энзимологии — использование для иммобилизации биокатализаторов матриц, способных обратимо и многократно перестраивать свою структуру в ответ на внешний физический сигнал (температура, свет, электрические или магнитные поля, pH и т. д.). При этом иммобилизованные белки приобретают изначально несвойственную им функцию, а именно способность включать-выключать ферментативную активность при пороговых значениях интенсивности соответствующего физического воздействия, причем эта способность может быть обусловлена изменениями, происходящими в структуре матрицы. При этом в таких системах в допороговых областях воздействия наблюдаемая кинетика ферментативной реакции определяется свойствами иммобилизованного фермента, а в запороговых — свойствами матрицы.

Для создания систем, в которых активность фермента регулируется под действием тепла, в качестве матриц для иммобилизации используют гидрогели, способные менять степень гидратации в зависимости от температуры. Такие температурно-чувствительные гели могут быть изготовлены, например, на основе N-замещенных акриламидов [1]. Известно, что растворы этих полимеров способны обратимо расслаиваться при повышении температуры, начиная с некоторой критической величины (нижняя критическая температура растворения — НКТР), из-за того, что выше НКТР энергетически более предпочтительными оказываются взаимодействия типа полимер-полимер, а не полимер-растворитель [2, 3]. Для водных растворов линейных цепей поли-N-изопропилакриламида (ПИИА) зна-

Сокращения: НКТР — нижняя критическая температура растворения, ПИИА — поли-N-изопропилакриламид, АТЭЕ — этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина, ВАЭЕ — этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина, ВТЭЕ — этиловый эфир N-бензоил-L-тирозина.

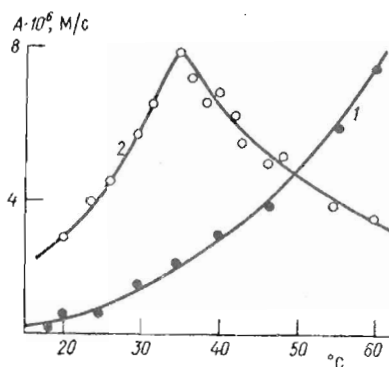


Рис. 1

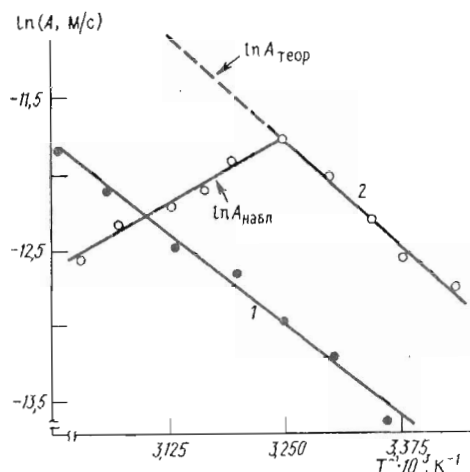


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость активностей нативного (1) и иммобилизованного в ПИАА-гель (2)  $\alpha$ -химотрипсина от температуры. Условия определения: рН 8,0, 0,2 М NaCl, 0,02 М CaCl<sub>2</sub>

Рис. 2. Зависимости активностей нативного (1) и иммобилизованного в ПИАА-гель (2)  $\alpha$ -химотрипсина от температуры в координатах Аррениуса. Расчет проведен по данным рис. 1. Штриховой линией обозначена экстраполяция низкотемпературной ветви зависимости иммобилизованного препарата в область температур выше НКТР геля

чение НКТР составляет 32—33° С [4] — температура, при которой большинство ферментов не подвергается термоинактивации.

Трехмерные полимерные сетки (гели), синтезированные на основе этих же полимеров, претерпевают аналогичные структурные изменения при повышенных температурах. При этом наблюдается сильная гидрофобизация гелевой матрицы и уменьшение ее объема [5, 6].

При изучении поведения ферментов, иммобилизованных в такие матрицы, было показано, что при температурах выше НКТР наблюдаемая активность биокатализатора уменьшается. Это явление было продемонстрировано для аспарагиназы [7, 8],  $\beta$ -галактозидазы [9, 10] и  $\alpha$ -химотрипсина [11—13].

Помимо достижения чисто практических целей (разделение и концентрирование веществ [14], изготовление лекарственных препаратов с контролируемой скоростью выделения активного начала [15—17], различные варианты иммуноанализа [18, 19]) получение и изучение подобных препаратов способно пролить свет на фундаментальные аспекты энзимологии, такие, как связь функции фермента с его окружением.

В данной работе изучали влияние температуры на скорости реакций гидролиза низкомолекулярных эфиров замещенных аминокислот, катализируемых  $\alpha$ -химотрипсином, ковалентно иммобилизованным в ПИАА-гель.

На рис. 1 представлены данные по зависимости от температуры начальных скоростей гидролиза АТЭЕ, катализируемого нативным и иммобилизованным в ПИАА-гель  $\alpha$ -химотрипсином. Видно, что в используемом интервале температур зависимость начальной скорости гидролиза субстрата в присутствии нативного  $\alpha$ -химотрипсина подчиняется закону Аррениуса и может быть спрямлена в полулогарифмических координатах  $\ln A - 1/T$  (рис. 2). В то же время температурная зависимость активности иммобилизованного в ПИАА-гель  $\alpha$ -химотрипсина подчиняется закону Аррениуса только в области 20—36° С. Дальнейшее повышение температуры вызывает снижение наблюдаемой активности иммобилизованного препарата (рис. 1), что выражается в координатах Аррениуса по-

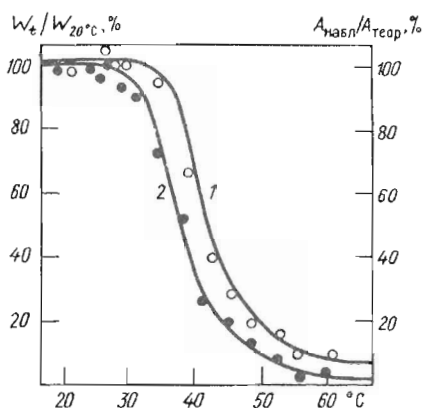


Рис. 3. Температурные зависимости доли наблюдаемой ферментативной активности (1) и относительного набухания ПИАА-геля (2). Условия определения: pH 8,0, 0,2 М NaCl, 0,02 М CaCl<sub>2</sub>

явлением участка с кажущейся отрицательной энергией активации (рис. 2). Точка пересечения двух отрезков прямых принималась нами за НКТР иммобилизованного фермента.

В более ранних работах [11, 12] было показано, что такое падение наблюдаемой ферментативной активности не связано с термоинактивацией фермента при повышенных температурах, а является результатом структурной перестройки гелевой матрицы. Понижение температуры до НКТР иммобилизованного фермента приводит к тому, что активность иммобилизованного препарата увеличивается до величины, соответствующей этой температуре (рис. 2). Было показано [11], что препараты иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина способны к многократной работе в режиме повторяющихся температурных циклов нагревание-охлаждение. При этом не происходит разрушения гелевой матрицы, а уровень активности фермента при конкретных температурах сохраняется постоянным от цикла к циклу.

Так как при структурном переходе уменьшается содержание воды в гелевой матрице, была предпринята попытка связать наблюдаемое падение ферментативной активности именно со степенью гидратации полимерного носителя. Экстраполяция низкотемпературной ветви аррениусовской зависимости (рис. 2) для иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина в область высоких температур позволяет теоретически описать поведение препарата в области температур выше НКТР полимера в отсутствие влияния на активность фермента фазового перехода матрицы. Рассчитанные из экстраполяционной прямой на рис. 2 теоретические значения активностей препарата для температур выше НКТР ( $A_{теор}$ ) должны были бы наблюдаться в эксперименте. Отношение  $A_{набл}/A_{теор}$  — доля ферментативной активности, реально видимая в эксперименте. На рис. 3 приведены данные рис. 2 в координатах  $A_{набл}/A_{теор}$  — температура для иммобилизованного фермента, а также зависимость относительного набухания ПИАА-геля от температуры. Общий ход температурных зависимостей набухания геля и наблюдаемой доли ферментативной активности идентичен, что позволяет сделать вывод о том, что изменение ферментативной активности иммобилизованного в ПИАА-гель

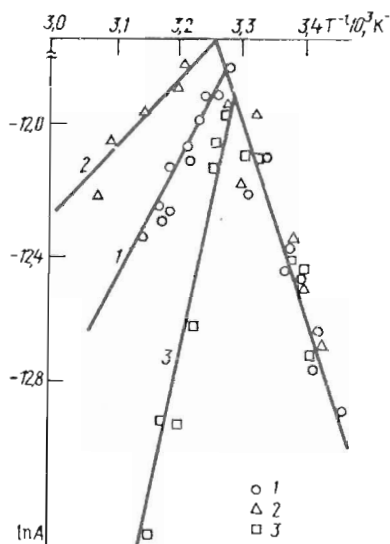


Рис. 4. Температурная зависимость активности иммобилизованного в ПИАА-гель  $\alpha$ -химотрипсина при использовании в качестве субстрата АТЭЕ (1), ВАЭЕ (2) и ВТЭЕ (3). Условия определения: pH 8,0, 0,2 М NaCl, 0,02 М CaCl<sub>2</sub>

$\alpha$ -химотрипсина связано с изменением степени гидратации матрицы в процессе фазового температурного перехода, протекающего в полимере-носителе.

Следует отметить, что наблюдаемый эффект нельзя объяснить просто уменьшением размера пор геля при структурном переходе и уменьшением при этом скорости диффузии субстрата в гель, т. е. переходом реакции из кинетического режима в диффузионный. В работе [12] нами было специально показано, что даже при использовании самого быстрогидролизующегося субстрата, АТЭЕ, в исследуемой системе отсутствуют внутридиффузионные эффекты при температурах как ниже, так и выше НКТР иммобилизованного фермента. В связи с этим мы предположили, что аномальное температурное поведение препаратов иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина обусловлено тем, что сжатие геля при температурном переходе может вызывать обратимые конформационные изменения белковой глобулы. Для проверки этого предположения было проведено сравнительное исследование температурных зависимостей скоростей гидролиза нескольких низкомолекулярных субстратов, катализируемых препаратами иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина.

Соответствующие данные для АТЭЕ, ВАЕЕ и ВТЭЕ, представленные в координатах Аррениуса (рис. 4), свидетельствуют, что все три зависимости имеют характерный излом, причем НКТР иммобилизованного фермента различаются незначительно. В области низких температур зависимости совпадают. Это может служить указанием на то, что иммобилизованный  $\alpha$ -химотрипсин в данных условиях проявляет одинаковую специфичность по отношению ко всем трем субстратам. Совершенно иная картина, однако, наблюдается в области повышенных температур: температурные зависимости скоростей гидролиза различны, причем наиболее быстро гидролизует ВАЕЕ, а наиболее медленно — ВТЭЕ. По-видимому, изменение степени гидратации полимерного геля приводит к тому, что субстратная специфичность иммобилизованного фермента меняется.

Мы не беремся пока обсуждать, какие именно конформационные изменения белковой глобулы вызывают смену субстратной специфичности иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина. Для выяснения этого вопроса требуется, во-первых, отдельно определить кинетические и равновесные константы данной реакции, а во-вторых, расширить круг исследуемых субстратов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали  $\alpha$ -химотрипсин марки А (мясокомбинат им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург), АТЭЕ (BDH, Англия), ВАЕЕ, ВТЭЕ, N,N'-метиленбисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) и персульфат аммония (Реанал, Венгрия), ПИАА синтезирован по методике [20], акрилоилхлорид — по методике [21].

Модификацию  $\alpha$ -химотрипсина акрилоилхлоридом проводили по методике [22]. К 5,5 мл  $2 \cdot 10^{-4}$  М раствора  $\alpha$ -химотрипсина в 0,1 М ацетатно-аммиачном буфере с 0,05 М  $\text{CaCl}_2$ , рН 8,0, при 0° С и постоянном перемешивании добавляли с интервалом в 15 мин три порции акрилоилхлорида по 0,01 мл. Смесь инкубировали 40 мин при комнатной температуре. К 1 мл полученного акрилоилхимотрипсина добавляли 0,2 г ПИАА и 0,36 мг N,N'-метиленбисакриламида, инициаторы (0,02 мл водного 0,78 М раствора персульфата аммония и 0,01 мл ТЕМЕД) и проводили сополимеризацию в блоке. Полученный блок-сополимер измельчали в гомогенизаторе (до частиц размером 20—200 мкм) и промывали солевым раствором (0,2 М  $\text{NaCl}$ , 0,02 М  $\text{CaCl}_2$ , рН 8,0), разделяя частицы геля и надосадок центрифугированием в течение 15 мин при 4800 об/мин. Промывание повторяли до тех пор, пока в промывных водах не оставалось ферментативной активности. К осадку добавляли 15—20 мл солевого раствора и получали 20—25 мл готовой суспензии, содержащей ковалентно иммобилизованный  $\alpha$ -химотрипсин.

Активность нативного и иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина определяли

по начальной скорости гидролиза соответствующего субстрата потенциометрическим методом на рН-стате марки RTS822 (Radiometer, Дания) в термостатируемой ячейке при рН 8,0. Объем ячейки 5 мл, концентрация АТФ в ячейке составляла  $10^{-2}$  или  $10^{-3}$  М, ВАФЕ —  $10^{-2}$  М, ВТФЕ —  $10^{-3}$  М. Ионная сила создавалась 0,2 М NaCl и 0,02 М CaCl<sub>2</sub>. Интервал температур 20—65° С.

Степень набухания геля определяли как отношение веса геля при данной температуре ( $w$ ) к весу геля при комнатной температуре ( $w_{20}$ ). Блок-сополимер, полученный по описанной выше методике, уравнивали в течение 24 ч в солевом растворе с ионной силой, создаваемой 0,2 М NaCl и 0,02 М CaCl<sub>2</sub>, периодически заменяя солевой раствор на свежий, для того чтобы отмыть остатки непрореагировавших веществ. Набухший блок-сополимер разрезали на пластины размером 1×0,5×0,2 см. Пластины уравнивали в солевом растворе при заданной температуре в течение 24 ч, вынимали из раствора, снимали внешнюю влагу фильтровальной бумагой и взвешивали. Для каждой температуры рассчитывали среднее значение из трех независимых экспериментов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Priest J. H., Murray S. L., Nelson R. J., Hoffman A. S.//Reversible Polymeric Gels and Related Systems. ACS Symposium Series. V. 350. Washington, 1987. P. 255—264.
2. Heskins M., Guillet J. E.//J. Macromol. Sci. Chem. 1968. A2. V. 8. P. 1441—1455.
3. Taylor L., Cerankowski L. D.//J. Polym. Sci. Polym. Chem. Edit. 1975. V. 13. P. 2551—2570.
4. Chiantore O., Guaita M., Trossarelli L.//Macromol. Chem. 1979. V. 180. P. 969—973.
5. Tanaka T.//Phys. Rev. Lett. 1978. V. 40. P. 820—823.
6. Nirokawa Y., Tanaka T.//J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 6379—6380.
7. Dong L.-C., Hoffman A. S.//J. Control. Release. 1986. V. 4. P. 223—227.
8. Dong L.-C., Hoffman A. S.//Reversible Polymeric Gels and Related Systems. ACS Symposium Series. V. 350. Washington, 1987. P. 236—244.
9. Park T. G., Hoffman A. S.//Appl. Biochem. and Biophys. 1988. V. 19. P. 1—9.
10. Park T. G., Hoffman A. S.//J. Biomed. Mater. Res. 1990. V. 24. P. 21—38.
11. Еремеев Н. Л., Сиголаева Л. В., Казанская Н. Ф.//Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1992. Т. 33. № 5. С. 511—515.
12. Eremeev N. L., Sigolaeva L. V., Kazanskaya N. F.//J. Chem. Biochem. Kinetics. 1992. In press.
13. Сиголаева Л. В., Еремеев Н. Л., Казанская Н. Ф.//Биотехнология. 1993. № 5. С. 36—40.
14. Freitas F. A., Cussler E. L.//Chem. Eng. Sci. 1987. V. 42. P. 97—103.
15. Dong L.-C., Hoffman A. S.//J. Control. Release. 1990. V. 13. P. 21—31.
16. Hoffman A. S., Afrassiabi A., Dong L.-C.//J. Control. Release. 1986. V. 4. P. 213—222.
17. Afrassiabi A., Hoffman A. S., Cadwell L. A.//J. Membr. Sci. 1987. V. 33. P. 191—200.
18. Monji N., Hoffman A. S.//Appl. Biochem. and Biophys. 1987. V. 14. P. 107—120.
19. Chen J. P., Hoffman A. S.//Biomaterials. 1990. V. 11. P. 631—643.
20. Plaut H., Ritter J. J.//J. Amer. Chem. Soc. 1951. V. 73. P. 4076—4077.
21. Weigand C., Hilgestag D.//Organisch-Chemische Experimentierkunst. J. A. Marth Verlag. Leipzig, 1964. B. 2. P. 612.
22. Лукашева Е. В., Айсина Р. Б., Казанская Н. Ф., Еремеев Н. Л.//Биохимия. 1980. Т. 45. С. 449—454.

Поступила в редакцию  
2.VII.1993

*L. V. Sigolaeva, N. L. Ereemeev, N. F. Kazanskaya*

**AN ANOMALOUS TEMPERATURE DEPENDENCE OF IMMOBILIZED  
 $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN PREPARATIONS**

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow*

Catalytic activity of  $\alpha$ -chymotrypsin preparations covalently included in the matrix of the poly-N-isopropylacrylamide gel does not follow Arrhenius equation above the low critical temperature of the polymer dissolution. Starting from this temperature, at which the changes of polymer structure takes place (hydrophobization), the temperature increase results in a rate lowering for the chemical reaction catalyzed by the enzyme. This phenomenon is reversible. A correlation between temperature dependence of the immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin activity and the dehydration degree of the carrier is observed. The decrease of the water content in the matrix causes a change of the substrate specificity of the immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin.