



УДК 577.15.02.152.342.1.1.042

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИМЕР–БЕЛОК В СМЕШИВАЮЩИХСЯ С ВОДОЙ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

© 1999 г. И. К. Сакодынская[#], Е. М. Сорокина*, Н. В. Ефремова*, И. Н. Топчиева*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119899, Москва, Воробьевы горы;*** Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва*

Поступила в редакцию 21.08.98 г. Принята к печати 20.11.98 г.

Исследована ферментативная активность нековалентных комплексов α -химотрипсина с полиэтиленгликолем и блок-сополимером оксидов полиэтилена и полипропилена (проксанолом) в водно-органических средах. Показано, что комплексообразование приводит к активации фермента в средах с высоким содержанием органического растворителя, тогда как в смесях с более чем 50% воды активность фермента в комплексах такая же, как у нативного. Активация оказывается более сильной в комплексах с полиэтиленгликолем, чем в комплексах с проксанолом той же молекулярной массы.

Ключевые слова: α -химотрипсин; комплекс полимер–белок; ферментативный катализ в водно-органических смесях; полиэтиленгликоль; блок-сополимер оксидов этилена и пропилена.

Водно-органические смеси как среда для проведения ферментативных реакций по сравнению с водными растворами имеют ряд преимуществ. К ним относятся: 1) улучшение растворимости гидрофобных субстратов и эффекторов; 2) сдвиг термодинамического равновесия многих практически важных реакций образования амидной или сложноэфирной связи в сторону требуемых продуктов; 3) подавление побочных реакций, протекающих под действием воды [1, 2]; 4) повышение термостабильности фермента по сравнению с водными растворами; 5) иная субстратная специфичность и энантиоселективность фермента, что открывает новые возможности синтеза и модификации сложных биомолекул при крайне высокой энантиоселективности. Как правило, можно выделить две области концентраций смешивающихся с водой органических растворителей, в которых ферменты проявляют каталитическую активность – область истинных растворов и область существования суспензий. Основным недостатком работы в гомогенных водно-органических растворах является инактивация фермента при сравнительно невысоких концентрациях органических растворителей [3]. В области существования суспензий ферменты, диспергированные в ряде практически важных растворителей, часто проявляют низкую каталитическую активность. Поэтому одна из важных проблем неводной энзи-

мологии – поиск путей активации ферментов в нетипичном для них окружении. Известно, что различные добавки, такие как сахара, аминокислоты, полиэтиленгликоли (PEG), соли полиэлектролитов и краун-эфиры могут оказывать активизирующее воздействие на ферменты в органических растворителях [4–9].

В то же время, ранее было показано, что ковалентное присоединение полиэтиленгликоля [10] или его амфифильного аналога, блок-сополимера оксидов этилена и пропилена (проксанола – Pgx) [11], содержащего наряду с гидрофильным блоком полиэтиленоксида гидрофобный блок пропиленоксида, приводит к увеличению ферментативной активности в водно-органических смесях, а также, в ряде случаев, к увеличению предельной концентрации органического растворителя, при которой фермент сохраняет свою активность. В системах с высоким содержанием органических растворителей PEG-модифицированные ферменты образуют суспензии [12], обладающие высокой ферментативной активностью в реакциях пептидного синтеза, перэтерификации, аминолиза и т.д. [13].

В настоящей работе нами были изучены возможности повышения активности ферментов в водно-органических средах за счет предварительного нековалентного комплексообразования между ферментом и полиэтиленгликолем или проксанолом. Для получения комплексов система полимер–белок подвергалась двум типам физических воздействий: повышению температуры или давления [14, 15]. Нами были исследованы каталитические свойства комплексов как в области истин-

Сокращения: СТ – α -химотрипсин; BTNA – *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина; PEG – полиэтиленгликоль; Pgx – проксанол.

[#] Автор для переписки (факс: 7095-939-54-17; e-mail: iks@enzyme.chem.msu.su).

Таблица 1. Характеристики комплексов α -химотрипсина с полиэтиленгликолем и проксанолом

Комплекс*	Условия получения	Содержание СТ, мас. %
t -(Prx) ₇ -СТ	48°C	64.1
P -(Prx) ₆ -СТ	16 МПа	67.6
t -(PEG) ₅ -СТ	48°C	71.4
P -(PEG) ₇ -СТ	16 МПа	64.3

* Обозначение комплекса включает данные о мольном соотношении в нем Prx (или PEG) и СТ, а также о способе его получения (t – при нагревании, P – при повышенном давлении).

ных растворов, так и в области суспензий, а также комплексов, иммобилизованных на твердой подложке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Устойчивость комплексов α -химотрипсина с полимерами к действию смешивающихся с водой органических растворителей

Прежде чем использовать модифицированные полимерами препараты α -химотрипсина для исследования ферментативных свойств в водно-органических средах, необходимо было убедиться, что под действием органических растворителей не происходит диссоциации комплексов на отдельные компоненты. Для этого комплексы с полиалкиленоксидами (табл. 1) помещали в водно-органические смеси, содержащие 10, 40 и 90% 2-пропанола (или, соответственно, 10, 40 и 90% этанола) и инкубировали при 25°C в течение 1 ч (концентрация – 1 мг/мл белка в водно-органической смеси). Как показал ТСХ-контроль, ни в каких условиях появления свободного полимера не наблюдалось. Следовательно, комплексы кинетически

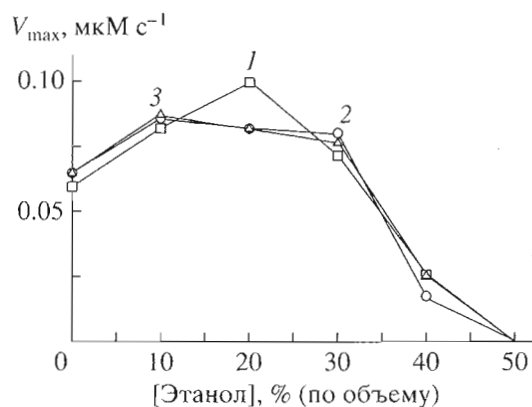
стабильны в водно-органических смесях в течение по крайней мере 1 ч.

Комплекс t -(Prx)₇-СТ растворяется в 2-пропаноле, в отличие от немодифицированного α -химотрипсина. Концентрация растворенного белка составляет 7 мкМ, но активность комплекса пренебрежимо мала по сравнению с активностью иммобилизованного препарата (в 600 раз ниже). Вероятно, растворяется преимущественно инактивированный под действием органического растворителя белок.

Каталитическая активность комплексов α -химотрипсина с полиэтиленгликолем и проксанолом в водно-органических смесях

Из рисунка видно, что зависимости каталитической активности α -химотрипсина, включенного в комплексы с проксанолом, а также нативного фермента от концентрации этанола в реакционной смеси практически идентичны. Такие же результаты были получены и для смесей 2-пропанола-вода (табл. 2). Таким образом, в области достаточно высоких концентраций воды в водно-органических смесях комплексообразование α -химотрипсина с полиалкиленоксидами не приводит ни к стабилизационному, ни к активационному эффекту, в отличие от того, что наблюдалось ранее для α -химотрипсина, модифицированного ковалентно присоединенными полиэтиленгликолем и проксанолом [11]. По-видимому, это объясняется различиями в конформационном состоянии полимерных цепей полиалкиленоксидов, ковалентно и нековалентно прикрепленных к белковой глобуле.

При рассмотрении нековалентных комплексов полиэтиленгликоля и проксанола с α -химотрипсином возникает аналогия с физической адсорбцией соответствующих полиалкиленоксидов на поверхности сорбента [16, 17]. Конформационное состояние сорбированных полимеров зависит от баланса взаимодействия полимера с белком и полимера с растворителем. Как показано в работе [16], полимерные цепи в нековалентных комплексах в водных средах образуют структуры типа “поезд” (train) и “петля” (loop), в которых часть полимерных цепей прочно сорбируется на поверхности белка, а другая часть экспонирована в воду. Характерно, что цепи сорбируются на поверхности белка вдали от активного центра. В водно-органических смесях при увеличении концентрации органического растворителя белковая глобула частично разворачивается. При этом, вероятно, в комплексах происходит перераспределение связанных (ковалентно или нековалентно) с белком полимерных цепей, стабилизирующее данную конформацию. По-видимому, более жесткое связывание полимерных цепей в ковалентных аддуктах делает невозможным свободное перераспределение полимерных фрагментов по поверхности белка при изменении содержания органического



Зависимость максимальной скорости (V_{max}) расщепления n -нитроанилида N -бензоил- L -тирозина α -химотрипсином (1) и его комплексами с проксанолом (t -(Prx)₇-СТ (2) и P -(Prx)₆-СТ (3) от концентрации этанола в водно-этанольной смеси. Концентрация фермента в растворах – 1 мкМ.

Таблица 2. Максимальная скорость (V_{\max} , нМс⁻¹) расщепления BTNA под действием α -химотрипсина и его комплексов в смесях 2-пропанол-вода (концентрация фермента 1 мкМ)

Доля воды, % (по объему)	<i>t</i> -(Prx) ₇ -СТ	<i>P</i> -(Prx) ₆ -СТ	<i>t</i> -(PEG) ₅ -СТ	18-Краун-6/СТ [18]	СТ
10%*	6.5	**	11.5	10	2.11
90%	132	131	**	**	180
100%	65	65	**	63	60

* В смеси с 10% воды использованы иммобилизованные препараты фермента.

** Нет данных.

Таблица 3. Кинетические параметры реакции расщепления 2-хлорэтилового эфира *N*-ацетил-*L*-фенилаланина под действием α -химотрипсина и его комплексов в ацетонитриле, содержащем 0.75 % (по объему) 1-пропанола (0.1 М), при 30°C и концентрации фермента в суспензии 1 мг/мл*

Ферментный препарат	$V_{\max}/K_m \times 10^7$, с ⁻¹	Ускорение по сравнению с СТ (V_{\max}/K_m)препарат/ $(V_{\max}/K_m)_{СТ}$
Немодифицированный СТ	4	1
<i>P</i> -(Prx) ₆ -СТ	9.3	2.3
<i>t</i> -(Prx) ₇ -СТ	6.2	1.6
<i>P</i> -(PEG) ₇ -СТ	187	47
18-Краун-6/СТ [19]	2650	660

* Содержание воды контролируется уравниванием над насыщенным водным раствором LiCl [4, 5, 7-9, 12].

растворителя, как в нековалентных комплексах, в которых взаимодействие полимер-белок обусловлено физической адсорбцией. В случае ковалентно модифицированного α -химотрипсина с ростом содержания органического растворителя полимерные цепи стабилизируют свернутую (близкую к нативной) конформацию белка, что и приводит к наблюдаемому повышению активности конъюгатов по сравнению с немодифицированным ферментом [11].

Каталитическая активность комплексов α -химотрипсина с полиэтиленгликолем и проксанолом в органических растворителях с низким содержанием воды

Увеличение концентрации органического растворителя до 90 % создает некоторые экспериментальные сложности, так как фермент не растворяется в таких смесях, поэтому в данном случае фермент был предварительно иммобилизован на вискозе [18]. Как видно из табл. 2, только в этих условиях комплексообразование α -химотрипсина с полиалкиленоксидами приводит к росту величины V_{\max} реакции расщепления BTNA. Таким образом, в водно-органических смесях эффект комплексообразования фермента с полиалкиленоксидами проявляется лишь при низком содержании воды. Комплексы PEG-СТ характеризуются большими значениями V_{\max} , чем комплексы Prx-СТ, что, вероятно, объясняется более прочным взаимодействием поверхности белка с полиэтиленгликолем.

В табл. 3 приведены кинетические параметры, характеризующие активность α -химотрипсина и его комплексов в ацетонитриле с минимизированным (необходимым для обеспечения конформационной подвижности фермента) содержанием воды. Система получена путем предварительного уравнивания растворителя и ферментного препарата над насыщенным водным раствором хлорида лития [4, 5, 7-9, 12]. Видно, что в этих условиях наблюдается повышенная активность комплексов по сравнению с нативным ферментом, причем уменьшение концентрации воды (по сравнению с системой 2-пропанол – 10% воды, табл. 2) приводит к более выраженному проявлению эффекта. Аналогичная закономерность наблюдалась в работе [18] для влияния макроциклического аналога полиэтиленгликоля – краун-эфира, на ферментативную активность: максимальные эффекты достигаются при минимальном содержании воды в органическом растворителе. В системе, содержащей 10% воды ([18], табл. 2), эффект 18-краун-6 оказывается сравнимым по величине с эффектами полиалкиленоксидов.

В ацетонитриле скорость реакции, катализируемой препаратами α -химотрипсина, пропорциональна концентрации субстрата в исследуемом интервале концентраций (2×10^{-3} – 5×10^{-2} М), поэтому определение V_{\max} и K_m для этих условий невозможно, и активность охарактеризована величиной отношения V_{\max}/K_m . Комплекс с полиэтиленгликолем оказывается существенно более активным, чем нативный фермент, а модификация фермента проксанолом приводит к значительно

меньшей его активации. Подобная же закономерность проявлялась и в смеси 2-пропанол–10% воды (ср. табл. 2 и табл. 3).

Наблюдаемую разницу в активации фермента при образовании его комплексов с полиэтиленгликолем и проксанолом можно объяснить, вновь обратившись к аналогии с физической сорбцией [16, 17]. Поскольку термодинамическое сродство проксанола, содержащего гидрофобный фрагмент полипропиленоксида, к органическим растворителям выше, чем для полиэтиленгликоля, в системах с высоким содержанием органического растворителя полимерный слой в комплексах P_{гх}–белок становится более “рыхлым”, чем в комплексах PEG–белок. Это означает, что полиэтиленгликоль имеет большее количество участков связывания с поверхностью белка, чем блок-сополимер–проксанол той же молекулярной массы. Полиэтиленгликоль прикрепляется к поверхности белка путем многоточечного присоединения, что и обеспечивает большее защитное действие по отношению к ферменту (по сравнению с проксанолом), предотвращающее денатурацию фермента под действием органического растворителя и, следовательно, более значительную активацию.

В работах [7–9] было показано, что лиофилизированный в присутствии 500-кратного избытка 18-краун-6 α -химотрипсин проявляет крайне высокую активность в органических растворителях – в 660 раз выше по сравнению с нативным. Сопоставление влияния краун-эфиров и полиалкиленоксидов подтверждает, что в случае краун-эфиров большую роль играет именно их макроциклическая природа, обуславливающая специфическое связывание с аминокруппами поверхности белка [7, 9], причем поверхность белка оказывается “закрытой” за счет комплексообразования с краун-эфиром, и наблюдается более высокая активация.

Таким образом, активационные эффекты краун-эфиров и полиалкиленоксидов, по-видимому, имеют различную природу. Несмотря на то что связывание происходит по-разному, “модификация” поверхности и в том, и в другом случае оказывает благоприятное стабилизирующее действие на фермент в присутствии органических растворителей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: кристаллический α -химотрипсин (Sigma, США), 40–60 ед. акт./мг, метоксипег со среднечисловой молекулярной массой 1900 (Serva, Германия), монобутиловый эфир блок-сополимера оксидов этилена и пропилена, проксанол производства ГНЦ “НИОПИК” со среднечисловой молекулярной массой 2000, содержащий 40 % (по массе) звеньев оксида этилена: C₄H₉O–(CH(CH₃)CH₂O)₁₄–(CH₂CH₂O)₂₅–H. В качестве субстратов α -химотрипсина использовали

BTNA (Sigma, США) и 2-хлорэтиловый эфир *N*-ацетил-*L*-фенилаланина [19].

Получение комплексов α -химотрипсина с полимерами индуцировали повышением давления или температуры, как описано ранее в работах [14, 15].

Метод 1. Получение температурно-индуцированных комплексов α -химотрипсина с полиэтиленгликолем и проксанолом. К раствору α -химотрипсина (2 мг/мл) в 0.02 М фосфатном буфере, рН 7.0, добавляли 20-кратный мольный избыток проксанола (или полиэтиленгликоля) и перемешивали до полного растворения. Раствор помещали в термостат и нагревали от 20 до 48°C со скоростью 1 град/мин. После окончания прогрева раствор охлаждали до 0°C на ледяной бане, затем проводили диализ против воды в течение 16 ч при 4°C. Раствор концентрировали до половины первоначального объема, и выделяли комплекс *t*-(P_{гх})₇–СТ (или *t*-(PEG)₅–СТ) путем осаждения охлажденным ацетоном. Отсутствие примеси свободного полимера в продукте контролировали методом ТСХ на пластинках “Silufol” (Kavalier, Чехословакия) в системе хлороформ–этанол–вода, 36 : 12 : 1. Хроматограммы проявляли в иодной камере. Для α -химотрипсина и комплексов R_f 0, для PEG – 0.9, для P_{гх} – 0.95.

Метод 2. Получение комплексов α -химотрипсина с полиэтиленгликолем и проксанолом под действием повышенного давления. К раствору α -химотрипсина (2 мг/мл) в 0.02 М фосфатном буфере, рН 7.0, добавляли 200-кратный мольный избыток полиэтиленгликоля или проксанола. После полного растворения компонентов раствор центрифугировали при 142000 g (16 МПа) в течение 1 ч. Выделение комплексов *P*-(PEG)₇–СТ и *P*-(P_{гх})₆–СТ проводили так же, как и в методе 1.

Содержание белка в комплексах определяли спектрофотометрически при 280 нм (ϵ 36000 М⁻¹ см⁻¹) и с помощью биуретовой реакции [20]. Содержание полимера в комплексе определяли с использованием ³H-меченого полимера по методу, описанному в работе [16]. Характеристики полученных комплексов приведены в табл. 1.

Ферментативную активность α -химотрипсина и его комплексов в бинарных смесях этанол–вода и 2-пропанол–вода определяли по скорости гидролиза BTNA при 30°C. Водный раствор фермента или его комплекса с полимером добавляли к водно-органической смеси, содержащей 0.01 мольный буфер MOPS (3-[*N*-морфолино]пропансульфоната натрия), рН 7.45, так, что конечная концентрация фермента составляла 1 мкМ. Затем добавляли запасной раствор BTNA в 1,4-диоксане в объеме 5–20 мкл, так, чтобы конечная концентрация субстрата составляла 0.04–1 мМ. Скорость реакции измеряли спектрофотометрически при 20°C по поглощению *n*-нитроанилина при 390 нм. Коэффициент молярного поглощения для него был определен отдельно для каждого соотноше-

ния вода/органический растворитель. Значения максимальной скорости гидролиза V_{\max} были определены из зависимостей Лаинуивера-Берка.

Измерение ферментативной активности α -химотрипсина и его комплексов с полимерами в 2-пропанол с низким содержанием воды. Препарат α -химотрипсина (нативный фермент или комплекс) иммобилизовали на вискозе по методике, описанной в работе [18], и помещали в 2-пропанол, содержащий 10 % воды по объему. При инкубации в 2-пропаноле иммобилизованного таким образом препарата не происходит разрушения комплекса фермент-полимер (контроль ТСХ). Ферментативную активность определяли по скорости реакции расщепления ВТНА при 30°C, за ходом реакции следили спектрофотометрически по накоплению продукта – *n*-нитроанилина [18].

Ферментативную активность α -химотрипсина и его комплексов в ацетонитриле определяли по скорости расщепления (1-пропанолиза) 2-хлорэтилового эфира *N*-ацетил-*L*-фенилаланина. Растворитель – ацетонитрил, содержащий 0.75% по объему 1-пропанола (0.1 М), – и ферментные препараты предварительно уравнивали в эксикаторе над насыщенным водным раствором хлорида лития [4, 5, 7–9, 12] в течение 24 ч при 4°C для поддержания контролируемого низкого содержания воды (термодинамическая активность воды a_w при этом составляет 0.113 [4, 5, 7–9, 12]). Ферментный препарат суспендировали в растворе субстрата и следили за накоплением продукта – 1-пропилового эфира *N*-ацетил-*L*-фенилаланина, реакционную смесь анализировали методом ГЖХ, как описано в работе [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahern T.J., Klibanov A.M. // Science. 1985. V. 228. P. 1280–1284.
2. Volkin D.B., Staubli A., Langer R., Klibanov A.M. // Biotechnol. Bioeng. 1991. V. 37. P. 843–853.
3. Khmelnskiy Y.L., Belova A.B., Levashov A.V., Mozhaev V.V. // FEBS Lett. 1991. V. 284. P. 267–269.
4. Klibanov A.M. // Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 141–144.
5. Dabulus K., Klibanov A.M. // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 41. P. 566–571.
6. Triantafyllou A.O., Wehtje E., Aldercreutz P., Mattiasson B. // Biotechnol. Bioeng. 1995. V. 45. P. 406–414.
7. Broos J., Engbersen J.F.J., Sakodinskaya I.K., Verboom W., Reinhoudt D.N. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1995. № 22. P. 2899–2905.
8. Broos J., Sakodinskaya I.K., Engbersen J.F.J., Verboom W., Reinhoudt D.N. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995. № 2. P. 255–256.
9. Van Unen D.-J., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D.N. // Biotechnol. Bioeng. 1998. V. 59. P. 553–556.
10. Takahashi K., Nishimura H., Yoshimoto T., Okada M., Ajima A., Matsushima A., Tamaura T., Saito V., Inada Y. // Biotechnol. Lett. 1984. V. 6. P. 765–770.
11. Mozhaev V.V., Kudryashova E.V., Efremova N.V., Topchieva I.N. // Biotechnol. Techniques. 1996. V. 10. P. 849–854.
12. Khan S.A., Halling P.J. // Enzyme Microb. Technol. 1992. V. 14. P. 96–100.
13. Takahashi K., Saito Y., Inada Y. // J. Am. Oil Chem. Soc. 1988. V. 65. P. 911–916.
14. Sorokina E.M., Topchieva I.N., Efremova N.V. // Polymer Preprints. 1997. V. 38. P. 603–604.
15. Ефремова Н.В., Сорокина Е.М., Курганов Б.И., Топчиева И.Н. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 524–531.
16. Топчиева И.Н., Сорокина Е.М., Ефремова Н.В., Ксенофонтов А.Л. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 87–94.
17. Takahashi A. // Polym. J. 1991. V. 23. P. 715–724.
18. Каменская Э.О., Сакодынская И.К., Левашов А.В. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 825–827.
19. Sakodinskaya I.K., van Unen D.-J., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D. // Biotechnol. Bioeng. (в печати).
20. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. школа, 1980. 222 с.

Enzymic Activity of Polymer-Protein Complexes in Water-miscible Organic Solvents

I. K. Sakodinskaya*#, E. M. Sorokina**, N. V. Efremova**, and I. N. Topchieva*

*Moscow State University, Chemical Faculty, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

**Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The enzymic activity of noncovalent complexes of α -chymotrypsin with polyethylene glycol and a block-copolymer of polyethylene oxide and polypropylene oxide (proxanol) was studied in aqueous-organic media. It was shown that complex formation activated the enzyme in media with a high content of the organic solvent, whereas in systems containing more than 50% water the enzymic activity of complexes was the same as that of the native enzyme. The activation in polyethylene glycol-containing complexes was greater than in complexes with proxanol of the same molecular mass.

Key words: block-copolymer of ethylene and propylene oxides, α -chymotrypsin, enzymic catalysis in aqueous-organic media, polyethylene glycol, polymer-protein complex

To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 939-5417; e-mail: iks@enzyme.chem.msu.su.