



УДК 577.154.31

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ *ASPERGILLUS*
НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ*Евеситадзе Г. И., Гвалиа Т. Ш., Сванидзе Р. С.,
Тохадзе З. В., Пуцубидзе П. Н.**Институт биохимии растений Академии наук ГССР, Тбилиси*

Показана возможность иммобилизации глюкоамилазы *Aspergillus niger* и *Aspergillus awamori* на силикатных носителях с помощью глутарового альдегида, растворимого карбодимида, методом diazосочетания, а также образованием комплексов с трех- и четыреххлористым титаном. Глюкоамилаза, иммобилизованная с помощью солей титана, характеризуется наибольшей удельной активностью и стабильностью при хранении. Регидроксилирование силохрома С-80 позволило существенно повысить удельную активность иммобилизованного фермента. Показано, что рН-оптимум силохром-связанной глюкоамилазы сдвинут в щелочную сторону. Установлена повышенная термостабильность в присутствии субстрата и устойчивость к протеолизу иммобилизованной глюкоамилазы по сравнению с растворимой.

В литературе описан ряд способов иммобилизации глюкоамилазы (КФ 3.2.1.3) из различных источников на органических и неорганических носителях [1—3]. Предпочтение следует отдать глюкоамилазам, ковалентно связанным на неорганических матрицах, поскольку использование этого типа носителей позволяет значительно шире регулировать ряд свойств нерастворимого фермента, таких, как оптимум и стабильность рН, температурный оптимум, удельная активность препарата. Изменение перечисленных свойств объясняется наличием заряженных групп, различной химической модификацией, разностепенной пористостью неорганических носителей и рядом других свойств.

Мы предприняли попытку подобрать наиболее эффективные силикатные носители и способ иммобилизации для глюкоамилазы *Aspergillus*. Для иммобилизации использовали два препарата глюкоамилазы: из мутантного штамма X-100 *Aspergillus awamori* [4] и из штамма 475 *Aspergillus niger* [5]. Оба фермента оказались идентичными по аминокислотному составу, рН-оптимуму и стабильности, N-концевой аминокислоте, величине *M* и др. Поэтому их иммобилизацию проводили в одинаковых условиях.

Присоединение фермента к аминосилицированным силикатам осуществляли по ε-аминогруппам лизина при помощи глутарового диальдегида [6], конденсацией глюкоамилазы растворимым карбодимидом [7] и методом diazосочетания, предложенным Витолом [8].

Как видно из данных табл. 1, глюкоамилаза ковалентно связывалась с аминосиликатами всеми перечисленными способами. При этом активность обоих использованных нами препаратов глюкоамилаз на аминосилохроме была почти в 2 раза выше, чем на других носителях. Поскольку максимальная активность была достигнута при иммобилизации на силохроме

Таблица 1

Активность глюкоамилазы (ед./г), иммобилизованной на силикатных носителях

Носитель	Способ присоединения фермента к носителю	Глюкоамилаза <i>Aspergillus</i>	
		<i>niger</i>	<i>awamori</i>
Силохром С-80	Карбонимидный	172	156
	Глутаральдегидный	190	160
	Диазосочетания	240	198
Пористое стекло	Карбонимидный	96	88
	Глутаральдегидный	148	98
	Диазосочетания	141	122
Силикагель	Карбонимидный	74	85
	Глутаральдегидный	108	103
	Диазосочетания	138	100

фермента из *Aspergillus niger*, дальнейшая работа по иммобилизации на разных типах силохромов была проведена именно с этой глюкоамилазой.

Учитывая, что концентрация ОН-групп на разных образцах силохрома колеблется от 0,2 до 0,9 ммоль/г, носитель регидроксилировали кипячением в воде и сушили в вакууме при 200° [9].

На регидроксилированных и исходных формах силохромов разными методами были получены иммобилизованные формы глюкоамилазы, в том числе с помощью солей титана, образованием комплексов фермента с носителем.

Наиболее активные иммобилизованные формы глюкоамилазы на 1 г носителя были получены с помощью трех- и четыреххлористого титана, в то же время эти формы характеризовались наибольшей стабильностью (табл. 2). При хранении титановых комплексов глюкоамилазы в 0,005 М ацетатном буфере (рН 4,7) при 4° в течение 3 мес активность иммобилизованных глюкоамилаз практически не менялась. Многократное (до 50 раз) использование иммобилизованной глюкоамилазы также не уменьшало остаточной активности иммобилизованных ферментов.

Таблица 2

Иммобилизация глюкоамилазы *Aspergillus niger*, штамм 475, на силохромах (1 г)

Носитель	Способ присоединения образца к носителю	Активность ферментного раствора до иммобилизации, ед.	Активность образца, ед/г	Активность ферментного раствора и пропыльной жидкости после иммобилизации, ед.	Активность образца через 3 мес хранения, % к исходной активности
Силохром С-80	Ti ³⁺	1300	350	610	100
	Ti ⁴⁺	1425	1080	172	95
Силохром С-120	Ti ³⁺	1300	460	629	100
	Ti ⁴⁺	1425	1200	113	94
Регидроксилированный	Ti ³⁺	1425	780	511	100
Силохром С-80	Ti ⁴⁺	1425	1200	99,5	95
	Диазосочетание	1300	480	521	85
	Глутаральдегидный	1300	330	733	81
Силохром 780 А	Ti ³⁺	1425	600	473	100
	Ti ⁴⁺	1425	1000	190	97
	Диазосочетание	1300	750	401	87
	Глутаральдегидный	1300	700	409	74

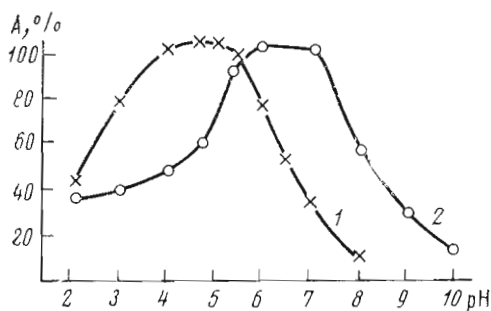


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость активности растворимой (1) и силихроме связанной глюкоамилазы (2) от pH

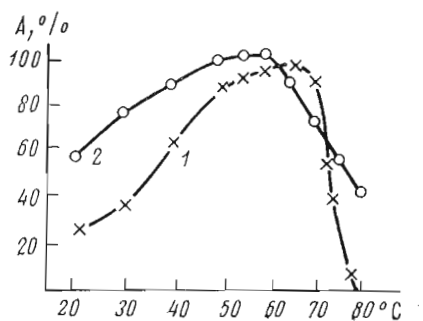


Рис. 2

Рис. 2. Влияние температуры инкубационной среды на активность растворимой (1) и силихроме связанной глюкоамилазы (2)

При хранении всех форм полученных нами иммобилизованных препаратов глюкоамилаз в виде сухого препарата через месяц наблюдалась полная потеря активности фермента.

По нашему мнению, полученные титановые комплексы глюкоамилазы *Aspergillus* благодаря высокой активности и прочности фиксации могут быть использованы в практических целях для расщепления α -1,4-глюкановых связей.

Ранее было показано [10, 11], что пористые стекла и силихромы обладают способностью к частичному растворению в щелочных условиях, теряя за время эксперимента до 5% веса образца. Учитывая, что реакция гидролиза крахмала и подобных поли- и олигосахаридов, катализируемая глюкоамилазой, протекает в слабокислых условиях (pH-оптимум действия 4,5—6,0), можно предположить, что и носитель и фермент проявляют достаточно высокую стабильность в указанных условиях.

В работе использовали опытную партию силихрому с диаметром пор 760 Å и с удельной поверхностью 130 м²/г. При этом полагали, что увеличение размеров пор носителя будет способствовать более быстрой диффузии как субстрата (средний молекулярный вес крахмала > 200 000), так и продуктов гидролиза. Однако увеличение активности наблюдалось только в тех случаях, когда сочетание фермента проводилось при помощи глутарового альдегида и диазосочетанием. По-видимому, при других методах иммобилизации размеры пор не имеют решающего значения, а следует принимать во внимание удельную поверхность носителя.

При всех методах иммобилизации глюкоамилазы регидроксилованный силихром С-80 является более эффективным носителем, чем исходный силихром С-80. Это объясняется введением добавочных реакционно-способных групп и большей удельной потенциальной способностью связывания носителя.

Изучение растворимой и силихроме связанной глюкоамилазы показало, что по ряду свойств они отличаются друг от друга. Так, например, pH-оптимум действия силихроме связанной глюкоамилазы во всех случаях сдвигался в щелочную сторону с 4,7 для растворимого фермента до 6,0 для иммобилизованного (рис. 1). Кроме того, у силихроме связанной глюкоамилазы увеличивается диапазон pH-действия.

Сравнительное изучение термостабильности растворимой и силихроме связанной глюкоамилазы показало, что в обоих случаях наблюдалась полная потеря активности фермента при 85° в течение 15 мин, в то же время по термостабильности в присутствии субстрата эти формы глюкоамилазы существенно различаются (рис. 2). Если у растворимой глюкоамилазы в интервале 70—80° активность резко падает до нуля, то силихроме-

связанная глюкоамилаза в этих же условиях сохраняет 40% исходной активности, вместе с тем у иммобилизованной глюкоамилазы отмечается некоторое смещение температурного оптимума до 55—60°.

Энергия активации, рассчитанная по уравнению Аррениуса, у силохромсвязанной глюкоамилазы понижена на 10—15% по сравнению с растворимой формой, составляет 4600 кал/моль в пределах 30—40° и стремится к нулю при 60°.

Устойчивость к протеолизу растворимой и силохромсвязанной глюкоамилазы исследовали с использованием пепсина, проназы, трипсина, химо трипсина и карбокси пептидазы А. Если обе формы фермента выявляли практически полную устойчивость по отношению к трипсину, химо трипсину и карбокси пептидазе А, судя по их остаточной активности, то силохромсвязанная глюкоамилаза оказалась значительно более устойчивой при взаимодействии пепсина и проназы по сравнению с растворимой. Так, активность силохромсвязанной глюкоамилазы под действием пепсина понижается на 20% через 30 мин, а под действием проназы — на 40%, в то время как растворимая глюкоамилаза теряет соответственно 60 и 80% активности.

Силохромсвязанная глюкоамилаза проявляла полную устойчивость против 8 М мочевины в 0,05 М ацетатном буфере (рН 4,7) в течение 30 мин при 37°, а растворимая в этих же условиях теряла более 20% ферментативной активности.

Экспериментальная часть

В работе использовали ферментные препараты глюкоамилазы, выделенные из глубинных культур *Aspergillus niger* [5], штамм 475, с активностью 2800 ед./г и *Aspergillus awamori* X-100 (мутант) с активностью 2500 ед./г. Активность (А) глюкоамилазы определяли по методу Дальквиста [12]. Для определения активности иммобилизованной глюкоамилазы была сконструирована термостатирующая ячейка при постоянном перемешивании реакционной среды. За единицу глюкоамилазной активности принимали такое количество фермента, которое вызывает образование 1 мг глюкозы из растворимого крахмала за 1 ч при 30° и рН 4,7. Белок определяли по методу Лоури [13].

В качестве носителей были использованы пористое стекло, стеклянные шарики Controlled Pore Glass (Англия), силикагель марки КСК, силохром С-80, силохром С-120, а также опытные партии силохрома с диаметром пор 760 Å, изготовленные во ВНИИЛе г. Ставрополя.

В работе были использованы следующие протеолитические ферменты: пепсин (Schuchardt, ФРГ), проназа (Calbiochem, США), трипсин (Spofa, Чехословакия), не обладающий активностью химо трипсина, карбокси пептидаза А (Serva, ФРГ), свободная от активности трипсина и химо трипсина, и химо трипсин Олайнского завода химреактивов.

Комплексообразование при помощи трех- и четыреххлористого титана проводили по методу, предложенному Емери [14]. Носитель (1г) суспендировали в 5 мл дистиллированной воды при охлаждении до 4° и порциями по 0,1 мл через каждые 5 мин добавляли при интенсивном перемешивании 0,5 мл $TiCl_4$. Через 40 мин носитель отделяли, промывали 0,01 н. HCl, затем бидистиллированной водой до нейтральной реакции и прокачивали 1 ч при 540°.

При использовании треххлористого титана 1 г носителя заливали 5 мл 12% $TiCl_3$, растворенного в абсолютном этиловом спирте, интенсивно перемешивали 1 ч и выдерживали 24 ч при 45°, затем реакцию смесь отсасывали, носитель промывали 1 н. NaCl, бидистиллятом и 0,05 М ацетатным буфером, рН 4,7.

Активированные трех- и четыреххлористым титаном носители инкубировали с 20 мл ферментного раствора, содержащего 80—100 мг фермента

в 0,05 М ацетатном буфере, рН 4,7, при умеренном перемешивании для $TiCl_4$ 20 ч при 4°, а для $TiCl_3$ 2 ч при 20°. Имобилизованный фермент отфильтровывали и промывали ацетатным буфером (рН 4,7), затем 1 н. NaCl и бидистиллятом до полного исчезновения светопоглощения при 280 нм. Препараты с иммобилизованными ферментами хранили в 0,005 М ацетатном буфере, рН 4,7.

Для иммобилизации с помощью водорастворимого карбодимида к 1 г носителя, предварительно обработанного γ -аминопропилтриэтоксисиланом [7], добавляли 5 мл ферментного раствора, содержащего 10—20 мг фермента в бидистилляте, подкисляли 0,2 н. HCl до рН 4,7, добавляли 100 мг 1-циклогексил-3-(2-морфолил(4)этил)карбодимида и перемешивали 20 ч при 4°. В течение первых 2 ч поддерживали значение рН 4,7 при помощи 0,1 н. HCl. Имобилизованный препарат фермента отделяли фильтрованием на стеклянном фильтре № 3 и промывали бидистиллятом, 0,05 М NaCl и 0,05 М ацетатным буфером, рН 4,7, до полного исчезновения поглощения при 280 нм.

Для иммобилизации с помощью глутарового альдегида к 1 г носителя, предварительно обработанному γ -аминопропилтриэтоксисиланом, добавляли 12,5 мл 1% водного раствора глутарового альдегида и перемешивали 30 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывали на стеклянном фильтре № 1 и промывали 5—7 раз водой. К полученному активированному носителю в 7—10 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 8) добавляли 20—30 мг фермента. Реакционную смесь перемешивали 2—3,5 ч при 4°. Промывку и хранение фермента производили так же, как и в случае использования растворимого карбодимида.

Для иммобилизации глюкоамилазы методом диазосочетания носитель активировали по методу [8]. К 1 г носителя, суспендированного в 7—10 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 9), добавляли 15—20 мг фермента и перемешивали 30 мин при комнатной температуре или 1,5 ч при 4°. Промывку и хранение препарата осуществляли как и в случае использования растворимого карбодимида.

Энергию активации вычисляли по уравнению Аррениуса

$$E = \frac{4,576 \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \lg \frac{k_2}{k_1}$$

в пределах 30—40°. Учитывая, что реакции проводились в абсолютно идентичных условиях, константы реакции k_1 и k_2 заменяли их скоростями v_1 и v_2 .

Термостабильность глюкоамилазы определяли в пределах 30—90° с интервалом в 5° и инкубацией фермента в течение 15 мин.

Влияние температуры на активность растворимой и иммобилизованной глюкоамилазы в присутствии субстрата 1% крахмала при рН 4,7 устанавливали инкубацией ферментов в пределах 30—80° с интервалом в 5° в течение 10 мин.

Устойчивость глюкоамилазы ($1,1 \cdot 10^{-5}$ М) к протеолизу находили при ее инкубации с 2 мг пепсина в 3 мл 0,05 М ацетатного буфера (рН 4) или с 1,8 мг проназы в 3 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 8,5).¹

ЛИТЕРАТУРА

1. Marsh D. R., Lee Y. Y., Tsao S. T. (1973) *Biotechnol. and Bioeng.*, 15, 483—492.
2. Maeda H., Suzuki H. (1972) *Agr. and Biol. Chem.*, 36, 1581—1594.
3. Beck S. R. (1972) *Diss. Abstr. Int. B.*, 34, 4345—4346.
4. Дурмишидзе С. В., Квеситадзе Г. И., Коконашвили Г. Н. (1974) Докл. АН СССР, 217, 470—471.
5. Тохадзе З. В., Квачадзе Л. Л., Квеситадзе Г. И. (1975) Прикл. биохимия и микробиол., 11, 515—518.
6. Ryle A. P. (1972) *Int. Pept. and Protein Res.*, 4, 123—125.
7. Line W. E., Kwong A., Weetall H. H. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 242, 194—202.

8. Weetall H. H. (1969) *Science*, **166**, 615—617.
9. Рогожин С. В., Варламов В. П., Вальковский Д. Г. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **8**, 1718—1721.
10. Weetall H. H., Havevala L. J. (1971) *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, **3**, 241—245.
11. Шаина Т. М., Гельман Н. Э., Кипаренко Л. М. (1965) *Ж. аналит. химии*, **20**, 118—124.
12. Dahlqvist A. (1961) *Biochem. J.*, **109**, 80—83.
13. Lowry O. H., Roserbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
14. Emery A. N., Barker S. A., Novais J. M. (1972) Патент ФРГ 2206360.
15. Hasselberger F. X., Allen B., Paruchuri E. K., Charles M., Coughlin R. W. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **57**, 1054—1062.

Поступила в редакцию
9.XI.1976

После доработки
4.I.1977

IMMOBILIZATION OF *ASPERGILLUS* GLUCOAMYLASE ON INORGANIC CARRIERS

KVESITADZE G. I., GVALIA T. Sh., SVANIDZE R. S.,
TOCHADZE Z. V., NUTSUBIDZE N. N.

Institute of Plant Biochemistry, Tbilisi

The possibility was shown for immobilizing the *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori* glucoamylases on silicate carriers using glutaric aldehyde, soluble carbodiimide, as well as diazo coupling and complex formation with titanium tri- and tetrachlorides. Glucoamylase immobilized by means of titanium salts possesses greater specific activity and stability on storage. Rehydroxylation of silochrome C-80 allowed to gain a considerable increase in the specific activity of the immobilized enzyme. Silochrome-bound glucoamylase was demonstrated to have the pH-optimum shifted into alkaline region. As compared to soluble enzyme, immobilized glucoamylase is characterized both by enhanced thermostability in the presence of a substrate and higher resistance to proteolysis.
