



УДК 577.150

МОДИФИКАЦИЯ SH-СЕФАРОЗЫ 6В
2-ОКСИ-5-НИТРОБЕНЗИЛБРОМИДОМ
И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕЕ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

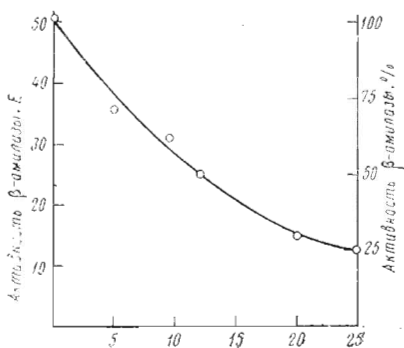
*Колдвел К., Аксен Р., Мевх А. Т.**

*Институт биохимии Упсальского Университета, Швеция;
Межфакультетская лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии Московского государственного университета **

2-Окси-5-нитробензилбромид реагирует с SH-сефарозой с образованием устойчивого тиоэфира. Модифицированная сефароза прочно сорбирует α -химотрипсин и β -амилазу с сохранением высокой удельной активности в реакторе с перемешиванием. В колонке иммобилизованная β -амилаза обладает 6% исходной активности фермента и способна непрерывно осуществлять гидролиз крахмала, сохраняя 1/4 начальной активности после 25 дней работы.

SH-Производные агарозы, введенные в практику в 1973 г. для ковалентной иммобилизации белков [1], сейчас широко распространены. Такие производные, полученные присоединением глутатиона к агарозе, активированной BrCN, были использованы для выделения и очистки ряда SH-белков, иммобилизации SH-ферментов, выделения SH-пептидов из белковых гидролизатов [1—4]. Несмотря на широкие возможности SH-агарозы, она имеет ряд недостатков, связанных с методом ее получения. К ним относятся прежде всего десорбция лиганда вследствие недостаточно высокой прочности связи между лигандом и носителем и невозможность введения значительных количеств лиганда.

Эти недостатки преодолеваются в методе, предложенном Аксеном и др. [5] в 1975 г., который включает в себя активацию агарозы эпихлоргидрином (или аналогичным реагентом с большей длиной цепи) и обработку агарозы с введенными эпоксидными группами тиосульфатом натрия. Образующийся устойчивый при длительном хранении гель легко превращается в SH-гель восстановлением тиосульфатной группы меркаптоэтанолом или дитиотреитом. В результате таких обработок лиганд, содержащий SH-группу, присоединяется к полисахаридному носителю прочной эфирной связью, и количество его можно варьировать условиями активации в достаточно широком диапазоне (0,5—50 мкмоль лиганда на 1 мл геля). Кроме того, полученный гель обладает повышенной механической прочностью по сравнению с исходной агарозой из-за дополнительных внутренних швов эпихлоргидрином. Все это позволяет вести работу с гелем в широком интервале pH, использовать органические среды и повышенные температуры. Существенным преимуществом этого метода является также возможность легко контролировать степень модификации геля на всех стадиях процесса. Полученный таким образом SH-гель можно не только более успешно использовать для изучения SH-белков, но и подвер-



Изменение активности иммобилизованной β-амилазы во времени при непрерывной работе колонки

ся 50 мкмоль лиганда на 1 мл геля. Проведение реакции в водной среде при рН 3,2 снижает выход желаемого продукта на 40—50%, что, очевидно, объясняется крайней неустойчивостью модифицирующего реагента в водных средах [6]. Следует отметить, что лиганд присоединяется к гелю в следовых количествах при проведении реакции в щелочной среде, оптимальной для его присоединения к цистеину [6], но приводящей к быстрой потере SH-групп в геле за счет их окисления.

Гидролитическую устойчивость тиоэфирной связи в полученном препарате исследовали в интервале рН 4—8. Было обнаружено, что лиганд связан с гелем достаточно прочно, что позволяет использовать синтезированный сорбент для иммобилизации ферментов. Так, при рН 8 гидролиз проходит на 1% за 7 сут, а при рН ниже 5—менее чем на 0,5% за то же время.

Способность геля связывать белки продемонстрирована на примере α-химотрипсина и β-амилазы. В случае α-химотрипсина сорбцию проводили в ацетатном буфере (рН 4) при комнатной температуре в течение 30 мин. В этих условиях 1 мл носителя сорбирует 21 мг химотрипсина, что соответствует 80% связывания. Активность иммобилизованного фермента при измерении в реакторе с перемешиванием практически соответствует его активности в растворе.

В связи с актуальностью разработки удовлетворительных методов иммобилизации β-амилазы для промышленной переработки крахмала получены образцы геля с различным содержанием фермента, определена его активность в реакторе с перемешиванием и в колонке и проведено изучение стабильности сорбированного фермента в режиме непрерывной работы колонки.

Сорбцию β-амилазы осуществляли в ацетатном буфере (рН 4,8), варьируя количество фермента в реакционной смеси. Содержание фермента в полученных препаратах было 7—84 мг/г седиментационного геля и соответствовало 75—80% сорбции. Активность иммобилизованной β-амилазы в реакторе с перемешиванием определяли для образца с наибольшим содержанием белка. Удельная активность фермента составила 60 Е/мг, т. е. 12,5% его активности в растворе.

Опыты с иммобилизованным ферментом в колонке проводили с образцами геля, содержащими 7 мг фермента на 1 г седиментированного геля. Колонка содержала 250 мг геля с общей активностью 52 Е при измерении в протоке (6% активности фермента в растворе). Такая колонка в начальный момент работы производила 4,8—5 г мальтозы в 1 ч при пропускании через нее 5% раствора крахмала со скоростью 200 мл/ч. Ферментный реактор был способен осуществлять непрерывный гидролиз растворимого крахмала в течение длительного времени, сохраняя относительно высокую

ферментативную активность (рисунок). Так, его активность составляла 25% начальной после 25 дней непрерывной работы.

Экспериментальная часть

В работе использовали сефарозу 6В (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), α -химотрипсин (Worthington, Biochem. Corp., США), β -амилазу (Sigma Chemical Co, Англия) с уд. акт. 500 Е/мг (1Е активности соответствует способности фермента производить 1 мг мальтозы из растворимого крахмала при рН 4,8 и 25° за 1 мин). Растворимый крахмал, мальтоза и 3,5-динитросалициловая кислота были продуктами фирмы Merck A. G. (ФРГ).

Модификация сефарозы 2-окси-5-нитробензилбромидом. Сефарозу 6В активировали эпихлоргидрином и превращали в SH-сефарозу согласно [5]. Седиментированную свежеприготовленную SH-сефарозу (40 г) с содержанием серы 410 мкмоль/г сухого веса суспендировали к смеси 20 мл этиленгликоля и 20 мл 1 мМ EDTA в реакторе рН-стата. 2-Окси-5-нитробензилбромид (1,67 г) в 5 мл ацетона прибавляли по каплям к реакционной смеси, поддерживая рН 3,2 титрованием 5 М NaOH. Через 2 ч гель промывали 50% раствором этиленгликоля, этанолом и водой. Количество присоединенного лиганда определяли элементарным анализом на содержание азота.

Стабильность модифицированной сефарозы при различных значениях рН. Седиментированный гель (образцы по 500 мг) суспендировали в 2 мл ацетатного либо фосфатного буфера (рН 4; 4,8; 6; 7; 8). После 7 сут перемешивания при комнатной температуре гели отфильтровывали, рН каждой аликвоты доводили до 11 и степень гидролиза определяли по количеству 2-окси-5-нитробензилового спирта спектрофотометрически (ϵ_{410} 18 000) [7].

Иммобилизация α -химотрипсина на модифицированной сефарозе. Седиментированный гель (2 г) перемешивали 30 мин с 4 мл раствора фермента (5 мг/мл) в 0,2 М ацетатном буфере (рН 4). Гель отфильтровывали, промывали до исчезновения поглощения при 280 нм в промывных водах. Количество сорбированного фермента определяли по разности в содержании белка в исходном растворе и элюате. Активность иммобилизованного фермента определяли по скорости гидролиза *n*-нитрофенилацетата при рН 7,2 в реакторе с перемешиванием.

Иммобилизация β -амилазы на модифицированной сефарозе. К 1 г седиментированного геля в 2 мл 0,02 М ацетатного буфера (рН 4,8) прибавляли раствор фермента с уд. акт. 500 Е/мг. После 15 мин перемешивания при комнатной температуре гель отфильтровывали и промывали исходным буфером до исчезновения амилазной активности в элюате. Количество связанного фермента определяли по разности между исходной общей активностью и активностью в элюате.

Определение активности β -амилазы. Активность фермента рассчитывали по количеству мальтозы, образующейся при гидролизе 5% раствора крахмала при рН 4,8. Определение мальтозы проводили колориметрически после реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой [7]. При определении активности фермента в растворе β -амилазу инкубировали с раствором крахмала, отбирая аликвоты во времени. Аналогично определяли активность иммобилизованного фермента в реакторе с перемешиванием. При измерении активности иммобилизованного фермента в проточке количество мальтозы определяли в зависимости от скорости тока раствора крахмала через колонку.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J. (1973) Biochem. J., 133, 573—584.
2. Carlsson J., Svensson A. (1974) FEBS Lett., 42, 183—186.
3. Carlsson J., Axén R., Brocklehurst K., Crook E. M. (1974) Eur. J. Biochem., 44, 189—194.

4. Egorov T. A., Svensson A., Rydén L., Carlsson J. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 3029—3033.
5. Axén R., Drevin H., Carlsson J. (1975) Acta chem. scand., **B29**, 471—474.
6. Horton H. R., Koshland I. E. (1965) J. Amer. Chem. Soc., **87**, 1126—1132.
7. Bernfeld P. (1955) in Methods in Enzymology, vol. 1, p. 149, Acad. Press., N. Y

Поступила в редакцию
31.VIII.1977

SH-SEPHAROSE 6B MODIFICATION WITH 2-HYDROXY-5-NITROBENZYL BROMIDE AND ITS APPLICATION FOR ENZYME IMMOBILIZATION

CALDWELL K., AXÉN R., MEVKH A. T. *

Institute of Biochemistry, University of Uppsala, Sweden;

** A. N. Belozersky Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

SH-Sepharose-6B forms a thioether with 2-hydroxy-5-nitro benzyl bromide which is stable over the pH range 4-8. The adsorption capacity of the modified gel with respect to proteins was tested with α -chymotrypsin and β -amylase. Both enzymes were strongly adsorbed and retained high activity as determined in batch assay. Immobilized β -amylase exhibited 6% of initial activity the value being decreased to $1/4$ within 25 days.
