



УДК 577.152.02

ГИДРОФИЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ ПОЛИВИНИЛОВОГО
СПИРТА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ*Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А.**Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

На основе поливинилового спирта синтезирован ряд гидрофильных носителей для иммобилизации ферментов. В качестве сшивающих агентов использованы *n*-ксилилендихлорид, эпихлоргидрин и глутаровый диальдегид. Проведена модификация носителей введением остатков этилендиамина, *n*-аминобензильных групп и остатков глутарового диальдегида. На модифицированных носителях осуществлена иммобилизация пенициллинамидогидролазы и изучены свойства образцов иммобилизованного фермента.

Среди гидрофильных синтетических органических носителей, используемых для иммобилизации ферментов различных классов, наибольшее распространение получили шитые полиакриламидные гели. Возможности гидрофильных носителей другого типа выявлены недостаточно.

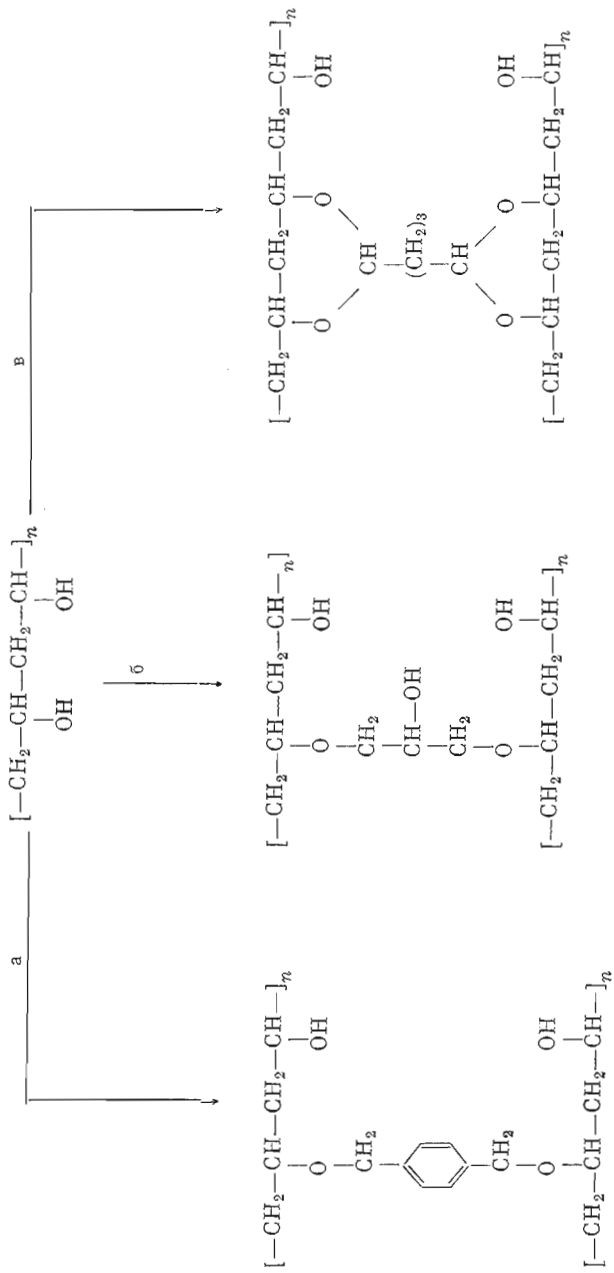
Данная работа посвящена изучению ряда новых гидрофильных гелей на основе поливинилового спирта в качестве носителей для иммобилизации ферментов. Первые публикации [1, 2] свидетельствуют о том, что поливиниловый спирт является удобным исходным продуктом для создания подобных структур.

Процесс иммобилизации и свойства иммобилизованного фермента исследовались на примере пенициллинамидогидролазы из *E. coli* (КФ 3.5.1.11), способной энантиоселективно гидролизовать рацемические *N*-фенацетильные производные аминокислот [3], в данном случае *N*-фенацетилфенилглицин [4].

В качестве исходного для получения гидрофильных носителей был использован поливиниловый спирт с $M \sim 20\,000$. Для создания трехмерной структуры гелей применены 3 различных типа сшивающих бифункциональных агентов: а) *n*-ксилилендихлорид — при проведении реакции гелеобразования в щелочной среде, б) эпихлоргидрин — в аналогичных условиях, в) глутаровый диальдегид — при проведении сшивания поливинилового спирта в кислой среде.

Характерные фрагменты образующихся при этом трехмерных структур представлены на схеме.

Для носителей типа I и II изучено влияние количества введенного сшивающего агента, температуры реакции гелеобразования, содержания и концентрации щелочи в растворе на физико-химические свойства конечных гелей. Показано, что при получении носителей типа I увеличение молярного отношения компонентов в исходной смеси от 1:1 до 10:1 приводит к увеличению объемной набухаемости носителей от 200 до 800%, однако в этом же направлении уменьшается механическая прочность

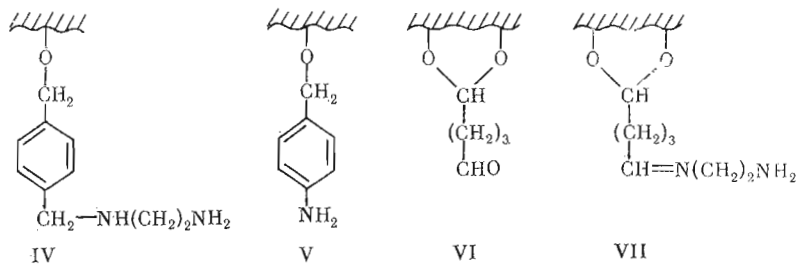


гелей. Повышение температуры реакции от 60 до 90° С существенно улучшает растворимость ксиллендихлорида в смеси и уменьшает время начала гелеобразования от 45–60 до 15–20 мин. Концентрация щелочи (NaOH) не должна превышать 10%, так как дальнейшее ее увеличение может приводить к частичному осмолению образующегося геля.

При использовании в качестве сшивателя эпихлоргидрина (носители типа II) оптимальная температура синтеза равна 95° С. Лучшими механическими свойствами обладают гели, полученные при отношении компонентов ~1:1. При этом время начала гелеобразования значительно меньше, чем для носителей типа I, и при одинаковом молярном содержании сшивающих агентов в смеси составляет 5–7 мин против 15–20 мин для носителей типа I. Это указывает на большую реакционную способность эпихлоргидрина по сравнению с ксиллендихлоридом в щелочной среде. Объемная набухаемость носителей типа II значительно выше, чем носителей типа I. Так, при отношении поливиниловый спирт — эпихлоргидрин, равном 1:1, она составляет 2000%, что указывает на большую гидрофильность носителей типа II, обусловленную большей гидрофильностью самого сшивающего агента.

Получение носителей типа III в отличие от носителей типа I и II проводилось при 20° С в кислой среде. Обычно использовались меньшие количества глутарового диальдегида по сравнению с ксиллендихлоридом и эпихлоргидрином, так как в этом случае все количество введенного сшивающего агента расходуется на образование «мостиков», тогда как ксиллендихлорид и эпихлоргидрин в значительной степени гидролизуются щелочью. При уменьшении отношения поливиниловый спирт — глутаровый диальдегид от 50:1 до 2:1 объемная набухаемость гелей уменьшается от 5000 до 450%. При малых степенях сшивки носители типа III несколько уступают по механической прочности носителям типа I, но при одинаковых количествах сшивающего агента, вводимых в реакцию гелеобразования, обладают большей набухаемостью. Изменение концентрации кислоты от 0,1 до 0,5 М не оказывает существенного влияния на скорость реакции, время начала гелеобразования составляет 5–10 мин. Интересно, что набухаемость носителей типа III зависит от режима перемешивания смеси в процессе гелеобразования: при проведении реакции в блоке без перемешивания объемная набухаемость возрастает на 20–50% по сравнению с набухаемостью носителей, полученных в аналогичных условиях при интенсивном перемешивании смеси.

Синтезированные носители типа I, II и III были модифицированы введением остатков этилендиамина, *n*-аминобензильных групп (Ar—NH₂) и остатков глутарового диальдегида с образованием следующих структур:



как было описано нами ранее [5]. Основные характеристики носителей типа I — VII приведены в таблице.

Для оценки синтезированных гелей I — VII в качестве носителей для иммобилизации ферментов нами было проведено ковалентное связывание пенициллинамидогидролазы (препарат содержал 40% белка) с использованием следующих методов: А) через хлористый цианур для носителей типа I, II, IV; Б) реакцией азосочетания (—N=N—) для носителей типа V;

Основные свойства носителей и препаратов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы

Образец	Сшивающий агент *	Тип носителя	Компоненты смеси, моль/моль поливинилового спирта		Функциональные группы для иммобилизации	Содержание введенных функциональных групп, ммоль/г	Объемная нагрузка, %	Способ иммобилизации **	Содержание белка, мг/г носителя	Активность препарата		Сохранение активности иммобилизованным ферментом, %
			сшивающий агент	NaOH (НС)						мкмоль г носителя · ч	мкмоль мг бел-ка · ч	
1	а	I	0,5	1	-OH	-	250	A	6	270	45	10
2	а	I	0,4	0,2	-OH	-	780	A	7	360	51	11
3	б	II	4,4	4,1	-OH	-	4900	A	8	4400	175	35
4	б	II	0,9	0,9	-OH	-	2300	A	9	1500	167	34
5	в	III	0,02	0,5	-OH	-	650	B	30	1800	60	13
6	а	IV	0,1	0,6	-NH(CH ₂) ₂ NH ₂	0,8	620	A	9	200	22	5
7	а	IV	0,1	0,6	-NH(CH ₂) ₂ NH ₂	0,8	620	B	4	2300	580	80
8	а	V	0,1	0,2	-ArNH ₂	1,2	780	B	44	3100	70	10
9	а	V	0,1	0,2	-ArNH ₂	1,2	780	B	35	2350	67	10
10	а	V	0,1	1	-ArNH ₂	1,0	340	B	38	700	18	3
11	в	V	0,05	0,25	-ArNH ₂	0,3	600	B	26	6500	250	55
12	в	VI	0,5	1	-CHO	0,3	450	Г	40	4900	122	28
13	а	VI	1	0,1	-CHO	0,4	780	Г	4	1200	300	67
14	в	VII	0,05	0,25	-NH(CH ₂) ₂ NH ₂	0,2	600	B	10	1600	160	35

* а — *п*-ксилилендихлорид; б — эпихлоргидрин; в — глутаровый диальдегид.

** А — через хлористый дианур, В — реакцией азосочетания, Б — через глутаровый диальдегид, Г — непосредственным взаимодействием фермента с носителем.

В) через глутаровый диальдегид для носителей типа I—IV и VII;
Г) непосредственным взаимодействием фермента с носителем типа VI.

Некоторые свойства полученных образцов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы представлены в таблице. Активности препаратов рассчитана из динамики изменения оптической активности раствора *N*-фенацетил-*D*, *L*-фенилглицина, как описано в работе [4]. Удельную активность и процент сохранения активности фермента, а также содержание белка на носителях рассчитывали аналогично [4]. Энантиоселективность гидролиза рацемического *N*-фенацетилфенилглицина доказана лигандообменной хроматографией продуктов гидролиза, как описано в работе [4].

Из таблицы видно, что ксилилендихлоридные гели оказались малоэффективными при иммобилизации пенициллинамидогидролазы через хлористый цианур (препараты 1, 2, 6). Уменьшение количества ксилилендихлорида в 5 раз увеличивает набухаемость, но почти не изменяет ни количества белка на носителе, ни активность иммобилизованного фермента. Введение в каркас ноногенных аминных группировок и изменение способа иммобилизации позволяет в ряде случаев повысить на порядок активность препаратов, а при связывании фермента на этилендиаминсодержащих носителях с помощью глутарового диальдегида удается существенно повысить и его удельную активность (препарат 7). Таким образом, можно предположить, что наличие ароматических колец (ксилилендихлорида и хлористого цианура) в структуре геля отрицательно сказывается на сохранении функциональных свойств фермента. Интересно, что для образца 10, полученного в избытке щелочи, и набухаемость и активность иммобилизованной пенициллинамидогидролазы значительно уступают образцам 8 и 9, полученным при эквивалентном отношении NaOH — ксилилендихлорид. Из сравнения образцов 6 и 7 становятся очевидными преимущества иммобилизации с помощью глутарового диальдегида перед использованием гидрофобных остатков хлористого цианура, хотя оба реагента взаимодействуют с аминоклассами белковой молекулы фермента. Образец 13, полученный обработкой геля I глутаровым диальдегидом с последующим взаимодействием с пенициллинамидогидролазой, содержит меньшее количество белка по сравнению с образцами 8 и 9, но отсутствие дополнительных гидрофобных группировок ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}-$) дает более высокую удельную активность иммобилизованного фермента. Таким образом, глутаровый диальдегид представляется наиболее удобным агентом для иммобилизации пенициллинамидогидролазы на гелях, полученных с помощью ксилилендихлорида, как в случае предварительной модификации последних, так и при непосредственном связывании фермента с носителем.

Свойства образцов 3 и 4 свидетельствуют о том, что при иммобилизации с помощью хлористого цианура применение гелей, сшитых эпихлоргидрином, более эффективно по сравнению с гелями, полученными с помощью ксилилендихлорида, в плане как активности препаратов, так и удельной активности фермента, что, вероятно, связано с высокой набухаемостью эпихлоргидриновых гелей и отсутствием в их трехмерной структуре ароматических колец.

Наиболее перспективным оказалось использование глутарового диальдегида в качестве сшивающего агента для поливинилового спирта. Так, образец 11, несмотря на меньшую степень модификации *n*-аминоарильными группами по сравнению с образцами 8 и 9, обладает много лучшими характеристиками. Видно также, что сшивание поливинилового спирта большими количествами глутарового диальдегида (образец 12) сразу приводит к наличию в геле альдегидных групп, которые непосредственно могут использоваться для иммобилизации. Дополнительным преимуществом использования глутарового диальдегида в качестве сшивающего агента является возможность легкого получения гелей в виде гранул при проведении реакции гелеобразования в эмульсии водного раствора компонентов в силиконовом масле.

Таким образом, сравнение трех различных типов сшивающих агентов для получения носителей на основе поливинилового спирта показало сильное влияние природы и количества сшивки, условий проведения реакции гелеобразования на свойства как самих носителей, так и образцов иммобилизованного фермента. Высокая набухаемость носителей далеко не всегда коррелирует с высокой активностью препаратов. Предварительные результаты по сорбции органических красителей на исследованных носителях говорят о быстроте установления равновесия между раствором и фазой геля, что должно обеспечивать легкость и быстроту процесса диффузии молекул субстрата. Из опробованных нами способов сшивания поливинилового спирта и иммобилизации пенициллинамидогидролазы предпочтение следует отдать использованию глутарового диальдегида. В ряде случаев при иммобилизации пенициллинамидогидролазы получены препараты, не уступающие препаратам фермента, иммобилизованного на полиакриламидных гелях.

Экспериментальная часть

Препарат пенициллинамидогидролазы из *E. coli* (КФ 3.5. 1.11), содержащий 40% белка, предоставлен Всесоюзным научно-исследовательским институтом антибиотиков. Активность пенициллинамидогидролазы в зависимости от партии фермента составляла 450—720 мкмоль субстрата на 1 мг белка в 1 ч.

*Сшивание поливинилового спирта *n*-ксилилендихлоридом* (носитель типа I) проводили аналогично [5], изменяя молярные отношения поливинилового спирта — ксилилендихлорид от 1:1 до 10:1 и концентрацию NaOH от 2 до 20%. Реакцию гелеобразования проводили при температурах 60, 70, 80 и 90° С.

Сшивание поливинилового спирта эпихлоргидрином (носитель типа II) проводили аналогично [5] при 60, 70, 80, 90, 95°С, изменяя отношение компонентов от 1:1,5 до 10:1 и концентрацию NaOH от 5 до 15%.

Сшивание поливинилового спирта глутаровым диальдегидом (носитель типа III) осуществляли аналогично [5] при отношениях компонентов от 50:1 до 2:1 и концентрациях HCl 0,1—0,5 М при 20° С.

*Сшивание поливинилового спирта *n*-ксилилендихлоридом с одновременным введением остатков этилендиамина* (носитель IV) осуществляли аналогично [5]. Содержание остатков этилендиамина — 0,8 ммоль на 1 г носителя.

*Модификация сшитых гелей *n*-аминобензильными группами.* К 2,3 г поливинилового спирта, сшитого ксилилендихлоридом, эпихлоргидрином или глутаровым диальдегидом, добавляли раствор 0,8 г NaOH в 60 мл системы диоксан — вода, 1:1. Смесь перемешивали 2 ч при 60°С для набухания геля, добавляли 4,32 г *n*-нитробензилбромида и продолжали перемешивание смеси в течение 3 ч при 70°С. Гель отфильтровывали, промывали 100 мл смеси диоксан — вода (1:1), 300 мл воды, 300 мл ацетона до обесцвечивания промывной жидкости и высушивали на фильтре. Найдено: N 1,77% (образец 8).

Полученный гель с *n*-нитробензильными группами заливали раствором 7 г Na₂S₂O₄ в 50 мл 10% водного пиридина и нагревали при перемешивании в течение 1 ч. Гель отфильтровывали, промывали 500 мл воды и 200 мл ацетона и высушивали в вакууме при 60°С. Найдено: N 1,80%. Содержание NH₂-групп, определенное титрованием, — 1,2 ммоль на 1 г (носитель V).

Модификация гелей типа I и III глутаровым диальдегидом. К 1 г набухшего в воде геля типа I или III добавляли 1 мл конц. HCl и 1 мл 25% водного глутарового диальдегида и смесь перемешивали 10 мин при комнатной температуре. Гель быстро отфильтровывали и промывали водой до нейтральной реакции, абс. этанолом и высушивали в вакууме при 60° С. Содержание CHO-групп — 0,4 ммоль на 1 г (носитель VI).

Модификация геля типа III этилендиамином проведена аналогично [5]. Содержание остатков этилендиамина 0,2 ммоль на 1 г (носитель VII).

Иммобилизация пенициллинамидогидролазы. А) На носителях типа I, II и IV через хлористый цианур. Носители (1 г) указанных типов выдерживали 2 ч для набухания в 10 мл смеси диоксан — вода, 7:3. Носитель отфильтровывали, обрабатывали 10 мл раствора хлористого цианура в диоксане (40 мг/мл) при 20°C в течение 15 мин, добавляли 3 мл воды, выдерживали еще 5 мин. Затем носитель промывали 50% водным диоксаном (200 мл), ацетоном (200 мл) и водой (100 мл). К полученному набухшему носителю добавляли 10 мл раствора пенициллинамидогидролазы (8 мг белка/мл, 4000 ед. акт./мл) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,6) и суспензию перемешивали 2 ч при 35°C и далее 15 ч при комнатной температуре. Полученный препарат отфильтровывали, промывали 1 М раствором NaCl (300 мл), водой (300 мл) и 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,6 (100 мл). Продукт хранили под слоем буфера при 5°C.

Б) На носителях типа V реакцией азосочетания аналогично [4].

В) На носителях типов IV, V и VII через глутаровый диальдегид аналогично [4].

Г) На носителях типа VI. К 1 г набухшего в фосфатном буфере носителя добавляли 10 мл раствора фермента (8 мг белка/мл, 4000 ед. акт./мл) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,6) и суспензию перемешивали 16 ч при 20°C. Полученный препарат отфильтровывали, промывали 1 М раствором NaCl (300 мл), водой (300 мл) и 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,6 (100 мл). Продукт хранили под слоем буфера при 5°C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Манеске G., Vogt H. G. (1976) *Макромолек. Chem.*, **177**, 725—739.
2. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1977) Тезисы докладов научной конференции по методам получения и анализа биохимических препаратов, Олайн, с. 95.
3. Cole M. (1964) *Nature*, **203**, 519—520.
4. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 604—610.
5. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 757—767.

Поступила в редакцию
26.IV.1979

POLYVINYL ALCOHOL HYDROPHILIC CARRIERS FOR ENZYME IMMOBILIZATION

YAMSKOV I. A., BUDANOV M. V., DAVANKOV V. A.

*Institute of Organo-Element Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A number of polyvinyl alcohol hydrophilic carriers for the enzyme immobilization have been synthesized. As coupling agents, 1,4-bis(chloromethyl)benzene, epichlorohydrin and glutaraldehyde were used. Subsequent reactions with ethylenediamine, 4-nitrobenzyl bromide and glutaraldehyde gave the carriers which were used to immobilize the penicillin amidohydrolyase. The properties of the immobilized enzyme were studied.