



УДК 577.152.02+547.463.22:541.632

ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ N-ФЕНАЦЕТИЛ-*D*, *L*-С-ФЕНИЛГЛИЦИНА ПЕНИЦИЛЛИНАМИДОГИДРОЛАЗОЙ ИЗ *E. coli* И ЕЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А.

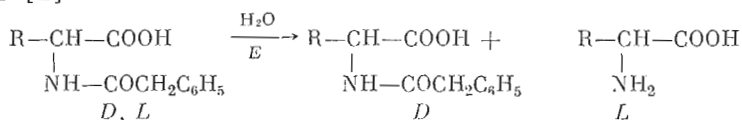
Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва

Ныс П. С., Савицкая Е. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков, Москва

Синтезирован ряд носителей на основе силхрома и полистирола, содержащих в качестве активных центров ароматические и алифатические аминогруппы. Изучен процесс иммобилизации пенициллинамидогидролазы по аминогруппам реакцией азосочетания и с помощью глутарового диальдегида. Изучен энантиоселективный гидролиз рацемического N-фенацетил-С-фенилглицина пенициллинамидогидролазой из *E. coli* и ее иммобилизованными препаратами. Кинетику гидролиза изучали с помощью поляриметрии в проточной кювете. Энантиоселективность гидролиза подтверждена лигандообменной хроматографией продуктов реакции.

В настоящее время ферментативные методы получения оптически активных аминокислот из их рацемических производных с помощью иммобилизованных ферментов начинают находить применение в промышленности и лабораторной практике [1]. В основе этих процессов лежат энантиоселективные взаимодействия фермента с субстратом. Известно, что пенициллинамидогидролаза (КФ 3.5.1.11) из *E. coli* способна энантиоселективно гидролизовать рацемические N-фенацетильные производные аминокислот [2].



Мы изучили процесс гидролиза, осуществляемого пенициллинамидогидролазой (образцы, содержащие от 20 до 40% белка без дополнительной очистки) и ее иммобилизованными препаратами, используя в качестве субстрата рацемический N-фенацетил-С-фенилглицин, по отношению к которому гидролитическая активность фермента достаточно высока [3].

Кинетические кривые гидролиза получены поляриметрическим методом. Для исследования препаратов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы использовалась проточная термостатированная поляриметрическая кювета, соединенная в замкнутый цикл с реактором, позволяющая осуществлять непрерывный кинетический контроль за ходом гидролиза,

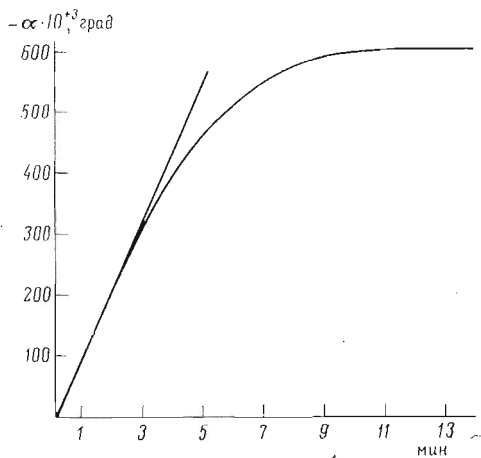


Рис. 1

Рис. 1. Кинетическая кривая гидролиза пенициллинамидогидролазой 0,02 М рацемического N-фенацетил-S-фенилглицина при 40°

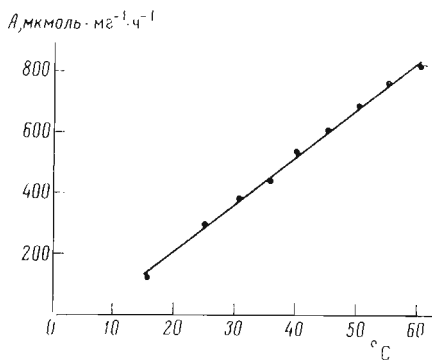


Рис. 2

Рис. 2. Температурная зависимость активности пенициллинамидогидролазы в растворимом состоянии

что значительно проще обычного фотометрического метода определения количества свободной аминокислоты в растворе [4]. Типичная кинетическая кривая, полученная этим методом, приведена на рис. 1. По конечной величине угла вращения раствора гидролизата оценивали глубину и энантиоселективность гидролиза рацемического субстрата, а по начальной скорости изменения угла вращения — активность фермента.

Для выбора оптимальных условий реакции ферментативного гидролиза растворимой пенициллинамидогидролазой были изучены зависимости активности фермента от концентрации субстрата, температуры и pH. Показано, что зависимость активности фермента от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса — Менген. Оптимум pH лежит в области 7,5—7,7, что согласуется с литературными данными для гидролиза бензилпенициллина [5, 6]. В значительном интервале температур скорость ферментативной реакции линейно растет с повышением температуры (рис. 2). Однако при температурах выше 45° заметно уменьшается стабильность фермента.

Активность пенициллинамидогидролазы при проведении гидролиза в подобранных нами оптимальных условиях (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,6; 40°) колеблется в зависимости от партии ферментного препарата от 500 до 700 мкмоль L-фенилглицина, образующегося за 1 ч на мг белка в препарате.

Контроль за энантиоселективностью гидролиза рацемического субстрата осуществляли также с помощью лигандообменной хроматографии продуктов гидролиза на диссимметрическом сорбенте с группировками L-оксипролина, заряженном ионами меди (2+) [7]. Профиль элюции доказывает, что фермент энантиоселективно гидролизует рацемический N-фенацетил-S-фенилглицин, так как среди продуктов гидролиза отсутствует D-фенилглицин (рис. 3).

Мы изучили возможность ковалентной иммобилизации пенициллинамидогидролазы на органическом носителе — полистироле и неорганическом — силиохроме. Были синтезированы следующие модифицированные носители: пористый γ -аминопропилсилиохром, содержащий 0,7 ммоль аминогрупп на 1 г носителя (I); пористый *n*-аминоарилсилиохром, содержащий 0,15 ммоль аминоарильных групп на 1 г носителя (II); изопористый и ге-

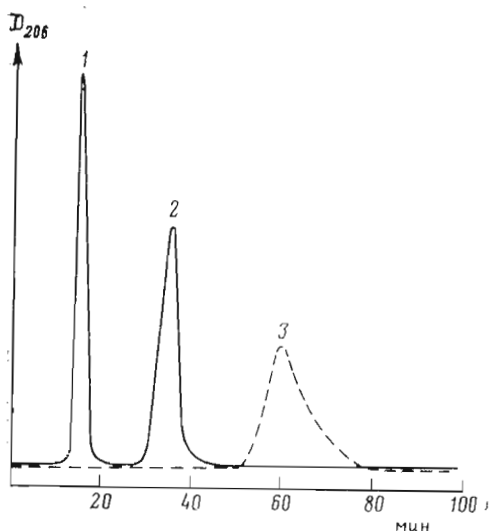


Рис. 3

Рис. 3. Профиль элюции рацемического *N*-ацетил-*L*-фенилглицина (1) и продукта его гидролиза *L*-фенилглицина (2) на сорбенте с *L*-оксипролином, заряженным ионами Cu^{2+} . Пик 3 соответствует *D*-фенилглицину

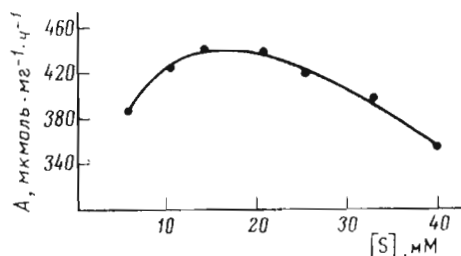


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость активности пенициллинамидогидролазы, иммобилизованной на *n*-аминоарилсилохроме, от концентрации субстрата (S)

теропористый *n*-аминополистиролы, содержащие 1,2 ммоль аминогрупп на 1 г носителя (III).

Таким образом, имелся набор носителей, содержащих в качестве активных центров алифатические и ароматические аминогруппы, по которым и проводили иммобилизацию пенициллинамидогидролазы.

Силохромы благодаря своей развитой внутренней поверхности широко используются для иммобилизации различных ферментов [8–10]. Ранее мы показали, что они могут быть использованы и для иммобилизации пенициллинамидогидролазы [11, 12]. В данной работе для иммобилизации применялся силохром с внутренней поверхностью $73 \text{ м}^2/\text{г}$ носителя и со средним диаметром пор 630 Å. Модификацию силохрома проводили по известным методикам [13].

n-Аминополистиролы с различной структурой полистирольного каркаса также применялись для иммобилизации ферментов [8, 14]. Нашей задачей явилось сравнение свойств ранее не исследованного для иммобилизации изопористого полистирола, сшитого 7 мол. % *n*-ксилилендихлорида, не содержащего гетеропор, с гетеропористыми полистиролами, сшитыми 40 мол. % монохлордиметилового эфира с объемным содержанием крупных пор 0, 20 и 40%. Было показано, что во все полистирольные образцы при нитровании вводится около 5 ммоль нитрогрупп, а их восстановление приводит к *n*-аминополистиролам, содержащим 1,2 ммоль аминогруппы на 1 г носителя независимо от пористости образца.

Иммобилизацию пенициллинамидогидролазы на перечисленных выше носителях проводили двумя способами [8]: азосочетанием для носителей типа II, III (способ 1) и через глутаровый диальдегид для носителей типа I, III (способ 2).

Было показано, что помимо ковалентного связывания фермента с носителями имеет место его сорбция. Она наиболее высока на силохромах, где может достигать 30% от количества ковалентно связанного фермента. В случае полистирольных носителей сорбция не превышает 5–10% и сорбированный фермент легко удаляется с носителя после обработки его раствором субстрата.

Таблица 1

Активность пенициллинамидогидролазы на изопористом полистироле при разной концентрации фермента в растворе при иммобилизации азосочетанием

Концентрация белка, мг/мл	Содержание белка, мг/г носителя	Активность, мкмоль/ч·г носителя	Активность, мкмоль/ч·мг белка	Сохранение активности, %
0,2	5	67	13,4	2,5
1	15	336	22,4	4,1
2	18	396	26,4	4,9
4	21	495	23,6	4,3

Таблица 2

Активность пенициллинамидогидролазы, иммобилизованной (реакция азосочетания) на *n*-аминополистиролах с различными свойствами

Мольный % сшивки	Объемное содержание пор, %	Содержание белка, мг/г носителя	Активность, мкмоль/ч·г носителя	Активность, мкмоль/ч·мг белка	Сохранение активности, %
7	0	18	396	26,4	4,9
40	0	96	3135	32,0	6,1
40	20	108	4950	46,1	9,2
40	40	83	6050	73,2	13,2

Таблица 3

Характеристики полученных препаратов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы

Тип носителя	Способ иммобилизации	Содержание белка, мг/г носителя	Активность, мкмоль/ч·г носителя	Активность, мкмоль/ч·мг белка	Сохранение активности
I	2	34	13500	398	79
II	1	24	11600	588	100
II	2	135	16200	120	24
III *	1	83	6050	73,2	13,2
III *	2	3	473	165	33

* Гетеропористый, с объемным содержанием пор 40%.

Содержание белка на полистирольных носителях определяли кислотным гидролизом белка, связанного с носителем, с последующим разделением и количественным анализом аминокислот на аминокислотном анализаторе. Следует отметить, что метод Лоури, применяемый для других типов носителей, в этом случае обычно дает завышенное на 10–15% содержание белка по сравнению с аминокислотным анализом, ошибка которого в данном случае не превышает 3–5%.

Для изопористого слабосшитого полистирольного носителя была изучена зависимость активности полученных образцов от концентрации фермента в растворе при проведении иммобилизации реакцией азосочетания. Из табл. 1 следует, что содержание фермента на данном носителе растет с увеличением его концентрации в растворе, но удельная активность его и процент сохранения активности проходят через максимум, соответствующий 18 мг белка на 1 г носителя; таким образом, показано существование оптимальной загрузки ферментом для носителей данного типа.

Было изучено влияние объемного содержания крупных пор в *n*-аминополистирольных носителях III типа на активность препаратов иммобилизованного фермента и проведено сравнение с изопористым низкосшитым

полистиролом. Как видно из табл. 2, применение гетеропористых полистирольных каркасов позволяет более чем на порядок повысить активность препаратов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы, удельная активность и процент сохранения активности возрастают вдвое. Удельная активность фермента на гетеропористых носителях растет с увеличением объемного содержания пор в носителе. Все это позволяет надеяться на успешное использование этих носителей для иммобилизации ферментов, особенно в случае проведения ферментативных реакций в водно-органических средах.

Полученные нами образцы иммобилизованной пенициллинамидогидролазы (табл. 3) обладают достаточно высокой активностью, однако иммобилизация фермента указанными выше методами не приводит к значительной его стабилизации.

Для всех образцов иммобилизованного фермента изучалась рН-зависимость активности препаратов. Для носителей типа I и III максимум активности иммобилизованного фермента лежит в области 7,6 и форма кривой практически совпадает с рН-зависимостью растворимого фермента. Для пенициллинамидогидролазы, иммобилизованной на носителе типа II, наблюдается сдвиг оптимума рН по меньшей мере до 8,0. Более высокие значения рН не испытывались, так как это привело бы к увеличению растворимости носителей на основе силохрома и связанному с этим резкому падению активности препаратов.

Мы показали, что для иммобилизованных ферментов, как и для растворимого, зависимость активности от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса — Ментен. Для фермента, иммобилизованного на *n*-аминоарилсилохроме, обнаружена аномальная зависимость (см. рис. 4). Подобный характер кривой связи, по-видимому, не с ингибированием фермента субстратом или продуктами реакции, а, вероятно, со специфической сорбцией субстрата или фенилуксусной кислоты на носителе II, что приводит к появлению отрицательного заряда на поверхности сорбента. Это затрудняет транспорт отрицательно заряженного субстрата и приводит к некоторому снижению активности образца иммобилизованного фермента.

Для доказательства энантиоселективности действия иммобилизованного фермента на другие субстраты был проведен гидролиз *D,L-N*-фенацетилсерина пенициллинамидогидролазой, иммобилизованной на силохроме через глутаровый диальдегид. Показано, что препарат иммобилизованного фермента энантиоселективно гидролизует этот субстрат и обладает удельной активностью 477 мкмоль *L*-серина/мг белка·ч. Таким образом, полученные препараты иммобилизованной пенициллинамидогидролазы могут применяться для энантиоселективного гидролиза *N*-фенацетильных производных аминокислот, отличных от *N*-фенацетил-*S*-фенилглицина.

Энантиоселективность гидролиза рацемического *N*-фенацетил-*S*-фенилглицина для ряда образцов иммобилизованного фермента подтверждена лигандообменной хроматографией гидролизатов. Профили элюции полностью аналогичны рис. 3, приведенному для растворимого фермента. Таким образом, иммобилизация пенициллинамидогидролазы на рассмотренных выше носителях не приводит к потере энантиоселективности действия фермента.

Экспериментальная часть

Активность пенициллинамидогидролазы (*A*) и энантиоселективность действия фермента определяли поляриметрическим методом в 0,1 М фосфатном буфере NaH_2PO_4 — Na_2HPO_4 в 10-см клетке при $\lambda 365$ нм по скорости гидролиза *L-N*-фенацетил-*S*-фенилглицина и выражали в мкмоль свободного *L*-фенилглицина, образующегося под действием 1 мг белка в течение 1 ч. Скорость ферментативной реакции под действием как растворимого, так и иммобилизованного фермента рассчитывали из наклона прямоли-

нейного участка кинетических кривых гидролиза при степенях конверсии субстрата, не превышающих 10—15%. В процессе гидролиза угол вращения плоскости поляризации света раствором изменяется от нуля до достаточно больших отрицательных значений, позволяющих определять активность фермента с точностью до 1—2%.

При концентрации субстрата, большей 0,02 М (все концентрации приведены в расчете на рацемический N-фенацетил-S-фенилглицин), скорость гидролиза перестает зависеть от концентрации субстрата (при концентрации фермента 0,1 мг на мл раствора). Таким образом, все определения максимальной активности фермента проводили при 0,02 М концентрации субстрата (рН 7,6; 40°).

Кинетические параметры ферментативного гидролиза получали обработкой в координатах Лайнуивера — Берка зависимостей начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата при концентрациях последнего, много больших концентрации фермента. При этом $K_{m(\text{каж})}$ 5 ± 1 мМ, а максимальная скорость ферментативной реакции равна 850 мкмоль на 1 мг белка в 1 ч при 40° и рН 7,6.

γ -Аминопропилсилохром получен реакцией силохрома с γ -аминопропилтриэтоксисиланом аналогично [13]. Найдено, %: С 2,6; N 1,0.

n-Аминобензоилсилохром получен взаимодействием γ -аминопропилсилохрома с *n*-нитробензоилхлоридом и последующим восстановлением полученного продукта $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ аналогично [13]. Найдено, %: С 5,2; N 1,4.

Изопористый полистирол получен сшиванием полистирола 7 мол.% *n*-ксилилендихлорида аналогично [15].

Гетеропористый полистирол получен сшиванием полистирола в дихлорэтане 40 мол.% монохлордиметилового эфира [16] в присутствии 0,20 и 40% (по объему) инертного разбавителя.

n-Аминополистирол. К 1 г сшитого изопористого полистирола с размером частиц 0,1—0,4 мм добавляли 10 мл дихлорэтана, полимер выдерживали 1 ч и заливали смесью 10 мл конц. H_2SO_4 (d 1,84 г/мл) и 10 мл конц. HNO_3 (d 1,35 г/мл). Смесью нагревали при перемешивании при 80° в течение 3 ч. Полимер отфильтровывали и промывали 100 мл воды и 50 мл ацетона и высушивали в вакууме при 60°. Выход 1,3 г.

К 1,3 г полученного *n*-нитрополистирола добавляли 6 г металлического олова, приливали 25 мл конц. HCl и перемешивали полимер при 100° в течение 24 ч. Непрореагировавшее олово отделяли, полимер промывали водой до нейтральной реакции, 5% водным аммиаком, водой до нейтральной реакции, 20 мл ацетона и высушивали в вакууме при 60°. Выход 1,1 г. Содержание азота 7,5%. Содержание аминогрупп по данным титрования 1,2 ммоль/г.

Аналогичные результаты получены для гетеропористого полистирола.

Содержание белка в препаратах иммобилизованной пенициллинамидогидролазы определяли по методу Лоури, по убыли концентрации белка в растворе фермента в процессе иммобилизации за вычетом сорбции белка на носителях, которую определяли «холостым» опытом также по методу Лоури, и по активности полученных сорбционных образцов.

Процент сохранения активности пенициллинамидогидролазы, иммобилизованной на носителе, рассчитывали из отношения ее активности на носителе к активности такого же количества фермента в растворимом состоянии при прочих равных условиях.

Иммобилизация пенициллинамидогидролазы на носителях типов II и III азосочетанием. 0,5 г носителей типов II и III заливали охлажденной до 0° свежеприготовленной смесью 10 мл 2,5 н. HCl и 5 мл 7% водного раствора NaNO_2 . Суспензию перемешивали 1 ч при 0°, носитель отфильтровывали и промывали на фильтре ледяной водой (200 мл) и охлажденным до 0° 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,6 (100 мл). Полученное диазопроизводное обрабатывали при 0° 5 мл раствора фермента (8 мг белка/мл, 4000 ед. акт./мл) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,6) и перемешивали

3–5 ч при температуре от 0 до 5° и далее в течение 10–15 ч при комнатной температуре. Полученный препарат промывали на фильтре 1 М раствором NaCl (200 мл), водой (200 мл) и фосфатным буфером, рН 7,6 (20 мл). Продукт хранили под слоем буфера при 0–5°.

Иммобилизация пенициллинамидогидролазы на носителях типов I–III через глутаровый диальдегид. К 1 г носителей I–III типов добавляли 10 мл 25% водного раствора глутарового диальдегида. Суспензию перемешивали 1 ч при 20°. Носитель отфильтровывали, промывали 200 мл дистиллированной воды и 20 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,6. Добавляли к носителю 10 мл раствора фермента в том же буфере (8 мг белка/мл, 4000 ед. акт./мл) и суспензию перемешивали 20 ч при комнатной температуре. Полученный препарат промывали на фильтре 1 М раствором NaCl (300 мл), водой (300 мл) и 30 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,6. Продукт хранили под фосфатным буфером при 0–5°.

Лигандообменную хроматографию гидролизатов проводили на колонке размером 140×8 мм, заполненной полистирольным сорбентом, содержащим 3 ммоль/г группировок L-оксипролина, заряженных на 75% ионами меди (2+). Элюцию осуществляли 0,1 н. аммиаком со скоростью 15 мл/ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Izumi Y., Chibata J., Itoh I. (1978) *Angew. Chemie Int. Ed.*, 17, 176–183.
2. Cole M. (1964) *Nature*, 203, 519–520.
3. Vojtisek V., Slezak J. (1975) *Folia Microbiologica*, 20, 224–230.
4. Wandrey C. (1976) *Chem. Ing. Tech.*, 48, 537–540.
5. Савицкая Е. М., Ныс П. С., Шелленберг Н. Н. (1977) *Антибиотики*, 22, 121–125.
6. Savitskaya E. M., Nys P. S., Levitov M. M., Shellenberg N. N. (1975) *Advances in Enzyme Engineering*, 1, Proceedings of the 1st Joint US/USSR Enzyme Engineering Seminar, 395–421.
7. Даванков В. А., Золотарев Ю. А., Тевлин А. В. (1978) *Биоорган. химия*, 4, 1164–1168.
8. Березин И. В., Антопов В. К., Мартинек К. (1976) *Иммобилизованные ферменты*, т. 1, с. 99, 106–110, МГУ, М.
9. Варламов В. П., Львова Т. Н., Вальковский Д. Г., Мокеев В. Я., Татарская Р. И., Рогожин С. В. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 816–819.
10. Кумарев В. П., Райт А. С., Райт В. Л., Салганик Р. И. (1976) *Биоорган. химия*, 2, 700–704.
11. Ныс П. С., Савицкая Е. М., Шелленберг Н. Н. (1977) *Антибиотики*, 22, 130–136.
12. Ямсков И. А., Будапов М. В., Даванков В. А., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1977) *Тезисы докладов II Всесоюзного симпозиума по получению и применению иммобилизованных ферментов*, г. Абовян, с. 129.
13. Рогожин С. В., Варламов В. П., Вальковский Д. Г. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 8, 1718–1721.
14. Filippuson H., Hornby W. E. (1970) *Biochem. J.*, 120, 215–219.
15. Марцинкевич Р. В., Солдатов В. С., Даванков В. А., Цюрупа М. П., Рогожин С. В. (1977) *Ж. физ. химия*, 51, 1465–1467.
16. Davankov V. A., Tsyurupa M. P., Rogozhin S. V. (1976) *Angew. Makromol. Chem.*, 53, 19–27.

Поступила в редакцию
25.IX.1978

ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF N-PHENACETYL-D, L-C-PHENYLGLYCINE BY THE NATIVE AND IMMOBILIZED PENICILLINAMIDOHYDROLASE FROM *E. COLI*

YAMSKOV I. A., BUDANOV M. V., DAVANKOV V. A.,
NYS P. S., SAVITSKAYA E. M.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; All-Union Research Institute
of Antibiotics, Moscow*

Enantioselectivity of the racemic N-phenacetylphenylglycine hydrolysis by the native and immobilized forms of penicillinamidohydrolyase from *E. coli* has been studied by kinetic methods using a polarimetric flow-cell. The polystyrene and silochrome matrices, bearing aromatic and aliphatic amino groups were used for the enzyme immobilization performed either by azocoupling, or using glutaric dialdehyde. The enantioselectivity of the hydrolysis was proved by the ligand-exchange chromatographic separation of the reaction products.