



УДК 577.15.036

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ  
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ТРИПСИНА И  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА

Можжаев В. В., Смирнов М. Д., Мартинек К., Березин П. В.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет*

Необратимо термически денатурированные ферменты (трипсин и  $\alpha$ -химотрипсин, иммобилизованные на сфарозе и в полиакриламидном геле соответственно), можно реактивировать почти со 100%-ными выходами, если сначала развернуть термоинактивированный фермент под действием мочевины при одновременном расщеплении S—S-связей, а затем в оптимальных условиях свернуть его в нативную конформацию. Показано, что можно многократно регенерировать каталитическую активность ферментов после их термоинактивации. Исследовано влияние условий термоинактивации (температура, концентрация кислорода в суспензии) на выход регенерированного трипсина. Сделан вывод, что при термоинактивации изученных ферментов не происходит изменения их первичной структуры, а лишь нарушается вторичная и третичная структуры белка.

Выяснение механизмов денатурации ферментов представляет чрезвычайный интерес. Исследование конформационных изменений, сопровождающих денатурацию белка, помогает решить центральную проблему энзимологии — о соотношении структуры и функции ферментов. Можно надеяться, что, познав механизмы денатурации, удастся решить важнейшую прикладную задачу, направленную на создание высокостабильных ферментных препаратов (см. обзоры [1, 2]), что приблизит широкое внедрение биокатализа в практику [3].

Несмотря на большое число работ, посвященных исследованию денатурации ферментов (см. обзоры [4–8] и литературу к ним), молекулярный механизм этого процесса до сих пор остается невыясненным. Не вызывает лишь сомнений, что необходимый этап денатурационного процесса — это конформационные изменения белка или, иными словами, разворачивание ферментной глобулы. Неясно также, что обуславливает необратимый характер денатурации. Принято считать, что денатурация ферментов становится необратимой лишь в результате вторичных процессов, таких, как агрегация, химическая модификация функциональных групп (например, окисление), автолиз или разрушение белка под действием примесей других ферментов, нарушение «нативных» дисульфидных связей (например, в результате внутри- или межмолекулярного тиол-дисульфидного обмена или их щелочного или каталитического расщепления) и др. [4, 5].

Часто это действительно так. Еще более 40 лет назад Ансон, изучая гемоглобин и некоторые другие белки, обнаружил, что при термоинактивации происходит агрегация макромолекул вплоть до образования осадка. Ему же впервые удалось реактивировать необратимо денатурированные белки, растворяя осадок в концентрированном растворе мочевины или

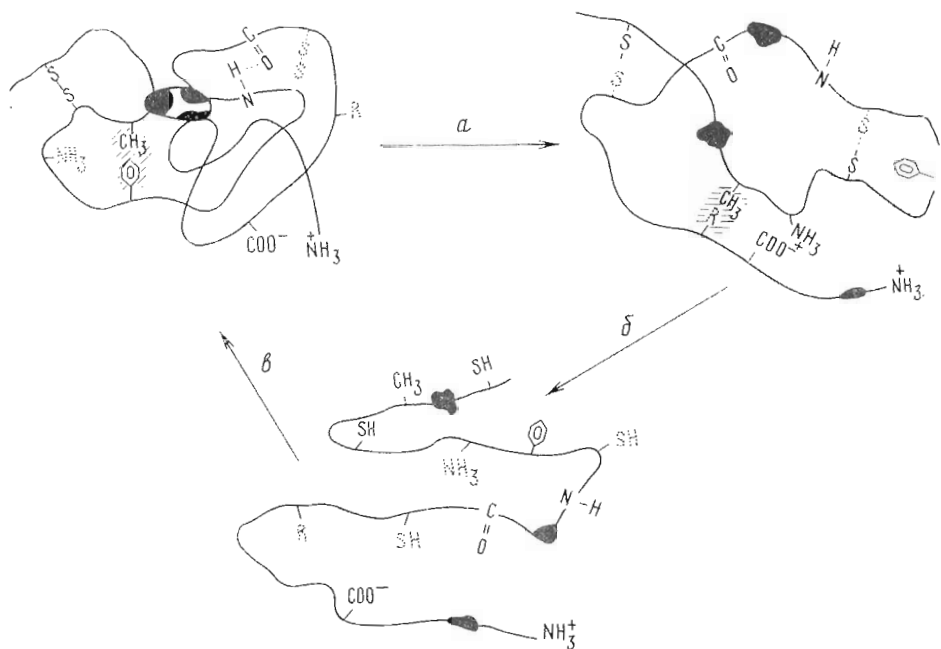


Рис. 1. Схематическое изображение изменения конформации фермента в ходе необратимой денатурации (а) и последующей регенерации, которая включала разворачивание необратимо денатурированного фермента с расщеплением в нем S-S-связей (б) и сворачивание белка в нативную конформацию в результате реокисления S-S-связей в присутствии катализаторов тиол-дисульфидного обмена (в)

варьируя значения pH (см. литературу к [4]). Аналогичную процедуру с успехом применили к денатурированной  $\beta$ -лактаме, которая, находясь в растворе при  $60^\circ$ , образовала осадок: в результате инкубации осадка в 5 M гуанидинхлориде или 8 M мочевины и последующем удалении денатурантов наблюдалась ренатурация этого фермента [9]. Другой пример — это фосфорилаза (субъединичный фермент, содержащий большое число SH-групп), которая инактивируется при блокировании сульфгидрильных групп *n*-меркурибензоатом; это приводит к диссоциации белка на мономеры. Мадсену и Кори [10] удалось его реактивировать, добавляя к меркаптидированной фосфорилазе цистеин, конкурирующий за *n*-меркурибензоат; в результате образуется исходная тетрамерная структура фермента.

Однако причина необратимости денатурационного процесса может быть и принципиально другой. Известно, что конформационные изменения, сопровождающие необратимую денатурацию, бывают иногда весьма значительными [11, 12]. Поэтому представляется весьма вероятным механизм, сущность которого состоит в следующем [13]: при высоких температурах в ферменте нарушаются «правильные» нековалентные взаимодействия, поддерживающие нативную структуру, существующую при обычной температуре, и образуются термодинамически обусловленные «ненативные» связи (рис. 1а). При понижении температуры эти «неправильные» нековалентные взаимодействия, хотя и становятся термодинамически неустойчивыми, могут сохраниться по чисто кинетическим причинам, поскольку молекулярная подвижность полипептидных цепей с понижением температур должна падать, и белок не может самопроизвольно ренатурировать.

На справедливость предложенного мономолекулярного физического механизма необратимой денатурации указывает тот факт, что термочувствительный фермент (трипсин, иммобилизованный на сефарозе) уда-

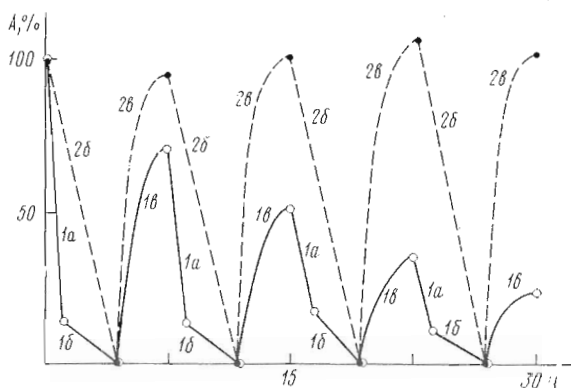


Рис. 2. Многократная регенерация каталитической активности (A) иммобилизованного на сефарозе 4 В трипсина. В ходе каждого цикла проводилась термоинактивация фермента (1a) и регенерация, которая включала восстановление S-S-связей в присутствии 8 М мочевины (1б) и последующее их окисление (1в). Для сравнения пунктиром показано изменение активности в результате многократного восстановления (2б) и реокисления (2в) S-S-связей в препарате, не подвергавшемся термоинактивации

лось реактивировать следующим образом: при одновременном действии 8 М мочевины и дитиотрепта в ферменте были разрушены все (в том числе и «ненативные») нековалентные взаимодействия и S-S-связи; тем самым белок был переведен в состояние невзаимодействующего статистического клубка (рис. 1б). Из этого состояния, согласно Анфинсену [14], белок в благоприятных условиях должен самопроизвольно сворачиваться в нативную конформацию (см. рис. 1в). Действительно, при удалении денатуранта и в оптимальных для тиол-дисульфидного обмена условиях белок ренатурировал с весьма высоким выходом (более 50%) [13].

Настоящая работа посвящена изучению следующих вопросов: 1) можно ли повторить цикл «термоинактивация — регенерация каталитической активности» многократно и 2) применим ли предложенный в работе [13] подход к реактивации также и других ферментов, кроме трипсина?

*Многократная регенерация термоинактивированного иммобилизованного трипсина.* Мы проводили серию последовательных экспериментов, в ходе каждого из которых иммобилизованный на сефарозе трипсин инактивировали при 80° с сохранением ~15% остаточной активности, а затем регенерировали по стандартной схеме, представленной на рис. 1: a → б → в. Было проведено четыре последовательных цикла «инактивация — реактивация» (см. рис. 2) с соответствующими выходами 70, 50, 37 и 23% от каталитической активности исходного препарата (до первой термоинактивации), т. е. в среднем выход каждого цикла составил около 70%. Таким образом, показана принципиальная возможность многократной регенерации необратимо денатурированных ферментов.

Для сравнения нами было изучено изменение каталитической активности иммобилизованного на сефарозе трипсина, наблюдаемое в результате многократного проведения цикла «разворачивание (расщепление S-S-связей) — сворачивание (реокисление S-S-связей)» без предварительной термоинактивации фермента. Из рис. 2, 2 видно, что при многократном воспроизведении этого цикла каталитическая активность иммобилизованного трипсина практически не изменяется, оставаясь на исходном уровне 100%.

Исходя из полученных результатов (рис. 2), можно заключить, что наблюдаемые на опыте потери каталитической активности (~30% в результате каждого цикла) обусловлены наличием именно термоинактивационной стадии.

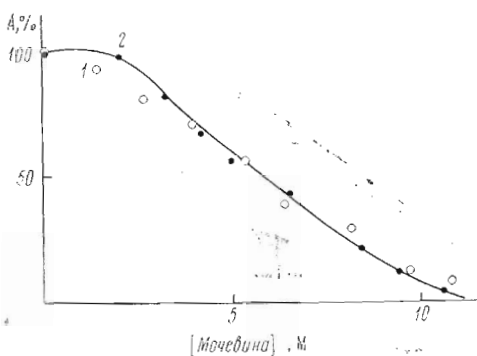


Рис. 3

Рис. 3. Изменение каталитической активности иммобилизованного на сефарозе 4 В трипсина в присутствии разных концентраций мочевины (рН 8,0). Исследовались препараты, подвергавшиеся термоинактивации с последующей регенерацией (1) и не подвергавшиеся этой процедуре (2)

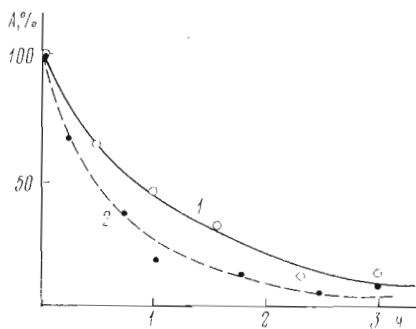


Рис. 4

Рис. 4. Кинетические кривые термоинактивации иммобилизованного на сефарозе 4 В трипсина. Исследовались препараты, подвергавшиеся термоинактивации с последующей регенерацией (1) и не подвергавшиеся этой процедуре (2)

Причины неполной регенерации каталитической активности можно искать, например, в том, что, во-первых, реактивированный трипсин сворачивается в несколько иную, отличную от нативной, конформацию, которая характеризуется другим (~70%) значением относительной каталитической активности. Во-вторых, нельзя исключить, что при высоких (~80°) температурах наряду с мономолекулярной «физической» денатурацией протекают химические термоинактивационные процессы, в частности окисление (возможно, катализируемое примесями катионов металлов) некоторых функциональных групп белка. Следует учесть также, что иммобилизованный фермент может смываться с носителя при нагревании. Все эти возможности нами были исследованы.

*Изучение свойств регенерированного трипсина.* Важным представляется вопрос: принимает ли белковая глобула после регенерации именно нативную конформацию (или отличную от нативной, но тоже каталитически активную)? К сожалению, исследовать структуру иммобилизованного белка прямыми физико-химическими методами (флуоресценция, абсорбция и др.) оказывается непросто [15]. Косвенными характеристиками конформации (особенно в области активного центра белка) можно считать ее устойчивость к действию денатурантов (мочевины) и нагреванию. Из данных на рис. 3 видно, что устойчивость иммобилизованного трипсина к обратимой денатурации растворами мочевины разной концентрации не изменяется в результате цикла «инактивации — регенерации»; почти не изменяется и кинетика термоинактивации регенерированного фермента по сравнению с исходным неденатурированным трипсином (см. рис. 4). На основании этих данных можно считать, что конформации иммобилизованного трипсина до термоинактивации и после регенерации «необратимо» денатурированного фермента одинаковы.

*Влияние условий «необратимой» денатурации на кинетику термоинактивации и выход регенерации иммобилизованного трипсина.* Для проверки мономолекулярного характера термоинактивации была изучена зависимость кинетики процесса от концентрации иммобилизованного фермента в суспензии. Тот факт, что ход кинетических кривых термоинактивации не зависит от концентрации иммобилизованного фермента в суспензии говорит о малом вкладе бимолекулярных процессов (например, автолиза) в кинетику термоинактивации.

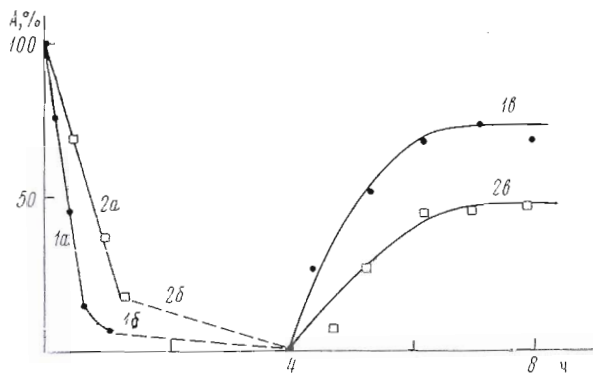


Рис. 5. Изменение активности иммобилизованного на сефаразе 4 В трипсина в ходе термоинактивации при пробулькивании азота (1а) и воздуха (2а) и последующей регенерации, включавшей разворачивание инактивированных ферментов с восстановлением S-S-связей (1б, 2б) и их реокисление (1в, 2в)

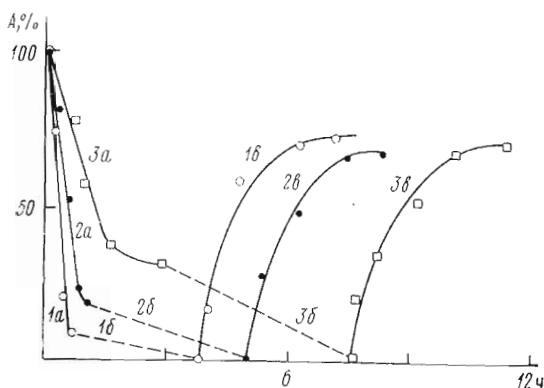


Рис. 6. Изменение активности иммобилизованного на сефаразе 4 В трипсина в ходе термоинактивации ( $5 \cdot 10^{-3}$  М трис, рН 8,5) при  $90^\circ$  (1а),  $80^\circ$  (2а),  $70^\circ$  (3а) и последующей регенерации, включавшей разворачивание денатурированных препаратов с расщеплением S-S-связей (1б, 2б, 3б) и их реокисление (1в, 2в, 3в)

Мы исследовали влияние концентрации кислорода в суспензии и температуры на кинетику термической денатурации и выход активного фермента при последующем цикле регенерации. Иммобилизованный на сефаразе трипсин подвергался необратимой термоинактивации при пробулькивании азота или воздуха (рис. 5, 1а, 2а). Согласно литературным данным [16], концентрация кислорода изменяется при  $80^\circ$  от  $10^{-4}$  М при пробулькивании воздуха до  $10^{-9}$  М при пропуски азота (ос. ч., из баллонов).

Полученные таким образом необратимо денатурированные препараты с остаточной активностью  $\sim 15\%$  подвергались регенерации. Сначала проводили восстановление S-S-связей фермента при его разворачивании в 8 М мочеvine, при этом каталитическая активность фермента полностью терялась (рис. 5, 1б, 2б). Далее, после удаления денатурантов, проводили сворачивание белка с одновременным реокислением его S-S-связей в присутствии катализаторов тиол-дисульфидного обмена (см. «Экспериментальную часть»). При этом каталитическая активность восстанавливалась на  $70\%$ , если термоинактивацию проводили, пробулькивая

**Исследование смывания иммобилизованного на сефарозе  
4 В трипсина с носителя**

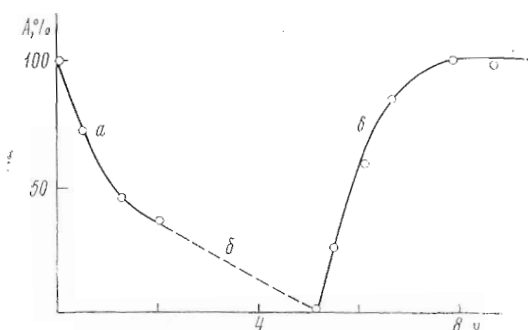
Время термоинактивации при 80°, мин	Остаточная активность, %	Доля смытого белка, %	Выход регенерации трипсина, %
30	38	46	70
120	10	69	20
480	1	86	3,5

азот (рис. 5, 1в), и на 45% при пробулькивании воздуха (рис. 5, 2в). Тот экспериментальный факт, что кинетика термической денатурации не зависит от концентрации кислорода в суспензии (ср. кривые 1а и 2а на рис. 5), означает, что окислительные процессы не играют существенной роли в механизме необратимой денатурации. Во всяком случае, не окисление функциональных групп белка обуславливает необратимую потерю активности фермента в ходе цикла «инактивация — реактивация». Так, пробулькиванием азота через суспензию иммобилизованного трипсина удается создать концентрацию кислорода и суспензии, которая ~ в 100 раз меньше концентрации иммобилизованного фермента. Однако и в этих условиях, когда окисление функциональных групп белка практически невозможно, наблюдается потеря 30% активного трипсина при регенерации необратимо денатурированного фермента. Можно было бы предположить, что с ростом температуры существенно ускоряется окисление функциональных групп белка, что привело бы к снижению выхода активного фермента после его реактивации. Однако это не так. Проводя термоинактивацию иммобилизованного трипсина при 70, 80 и 90° и далее регенерируя его активность по обычной схеме (см. рис. 1), получили во всех случаях выход реактивации ~70% (см. рис. 6). Таким образом, окислительные процессы, по-видимому, не происходят при термоинактивации иммобилизованного трипсина и, во всяком случае, не приводят к его необратимой денатурации.

*Исследование смывания иммобилизованного трипсина с носителя (сефарозы).* Причиной того, что ~30% активности иммобилизованного трипсина теряется в каждом цикле «термоинактивация — регенерация», является смывание фермента с сефарозы. Трипсин присоединен к активированному бромцианом носителю уретановой связью, которая при низких температурах и нейтральных рН устойчива к гидролизу [17]. Однако, как показано в работе [17], при увеличении рН и температуры скорость гидролиза уретановой связи существенно возрастает и при длительной (часы) инкубации препарата иммобилизованного трипсина при 80° его смывание с сефарозы становится заметным. Долю смытого трипсина определяли, условно считая, что весь иммобилизованный белок обладает каталитической активностью. Это грубое приближение, однако известно, что при бромциановой прививке ферментов к полисахаридным носителям доля каталитически неактивного белка в препарате иммобилизованного фермента невелика [19]. Из данных, приведенных в таблице, видно, что наблюдается хорошее соответствие между долей смытого белка и остаточной после термоинактивации активностью трипсина. Более того, попытки регенерировать по стандартной методике трипсин, термоинактивация которого шла дольше и прошла до больших глубин (10 и 1%), привели к низким выходам реактивации (20 и 4%). Это обусловлено тем, что за длительные времена инкубации при высокой температуре большая часть белка перешла в раствор и реактивация ее стала принципиально невозможной.

*Регенерация каталитической активности термоинактивированного α-химотрипсина, ковалентно иммобилизованного в полиакриламидном*

Рис. 7. Регенерация каталитической активности иммобилизованного в полиакриламидном геле  $\alpha$ -химотрипсина после необратимой термоденатурации ( $90^\circ$ ;  $5 \cdot 10^{-3}$  М трис, рН 8,5) (а) в результате восстановления S—S-связей в присутствии 8 М мочевины (б) с последующим их реокислением (в)



геле. В качестве другого исследуемого фермента нами был выбран  $\alpha$ -химотрипсин. Этот выбор может показаться необдуманным, поскольку молекула этого белка состоит из 3 полипептидных цепей. В результате разворачивания денатурированного белка и расщепления в нем пяти S—S-связей должны расщепиться также и 2 межцепочечных дисульфидных мостика [20]. В таком случае следует ожидать, что 3 полипептидные цепи должны разъединиться в пространстве, и последующая ренатурация белка может не произойти. Именно так себя ведет, как показал Анфинсен [20], фермент в растворе. Другое дело, если проводить эксперимент в иммобилизованном состоянии и присоединить фермент многоточечно к комплементарной поверхности носителя [21]. В этом случае каждая из цепей может оказаться присоединенной к носителю хотя бы одной связью, и тогда эксперимент по регенерации может в принципе привести к таким же благоприятным результатам, как и в случае ранее изученного одноцепочечного белка трипсина.

Чтобы избежать недостатка бромцианового метода присоединения фермента к сепарозе (где происходит смывание белка с носителя), мы использовали для иммобилизации ковалентное вшивание  $\alpha$ -химотрипсина в полиакриламидный гель [21].

Каталитическая активность иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина после необратимой денатурации при  $95^\circ$  в течение 2 ч упала до 40% от исходного значения; далее фермент подвергали стандартной процедуре регенерации. При восстановлении S—S-связей в присутствии 8 М мочевины сохранялось менее 5% ферментативной активности. Как видно из рис. 7 (кривая в), последующее реокисление S—S-связей кислородом воздуха в присутствии катализаторов тиол-дисульфидного обмена привело практически к 100%-ному восстановлению каталитической активности.

*Общие замечания.* В настоящей работе исследован вклад различных процессов в механизм необратимой тепловой денатурации белка. Важно подчеркнуть, что исследование проводилось с ферментами в иммобилизованном состоянии, где отсутствуют различные межмолекулярные процессы, такие, как агрегация, автолиз, разрушение под действием примесей других ферментов и т. п. На примере исследуемых ферментов ( $\alpha$ -химотрипсин и трипсин) видно, что при их термоденатурации отсутствуют (вплоть до температуры, близкой к  $100^\circ$ ) процессы, которые могли бы изменить первичную структуру белка (гидролиз пептидных связей или деструкция, например окисление функциональных групп и др.). Иначе не удалось бы осуществить полную реактивацию необратимо денатурированных ферментов под действием мочевины (затрагивающей лишь вторичную и третичную структуры) и катализаторов тиол-дисульфидного обмена (взаимодействующих лишь с S—S-мостиками).

Эти данные подтверждают представление о том, что в принципе существует мономолекулярный механизм чисто физической необратимой денатурации. Остается, однако, невыясненным вопрос о возможной роли внутримолекулярного дисульфидного обмена. На наш взгляд, внутримо-

лекулярный дисульфидный обмен может иногда сопровождать «физическую» денатурацию. Но представить себе дисульфидный обмен, происходящий в белке независимо от «физической» денатурации, трудно, так как для его реализации необходимо пространственное сближение двух S—S-связей (или по крайней мере одной S—S-связи и одной SH-группы), что требует существенных конформационных изменений в белке и нарушения ряда нативных нековалентных взаимодействий.

Что касается ферментов, исследуемых в настоящей работе, то здесь протекание тиол-дисульфидного обмена при термоинактивации представляется вообще маловероятным. Во-первых, известно, что мономолекулярный процесс термоинактивации этих ферментов протекает даже при нейтральных значениях pH и весьма умеренных значениях температуры (40°), когда скорость внутримолекулярного дисульфидного обмена ничтожно мала [22]. Во-вторых, следует обратить внимание на данные работы [23], где удалось под действием концентрированных растворов мочевины полностью защитить трипсин и  $\alpha$ -химотрипсин от необратимой термоинактивации даже при температуре 100°. Известно, что в концентрированных растворах мочевины эти ферменты находятся в сильно развернутом состоянии [5] и, следовательно, с подвижными полипептидными цепями, что могло бы облегчить S—S-обмен. Отсутствие термоинактивации в этих условиях можно рассматривать как указание на то, что необратимость денатурации не связана с внутримолекулярным дисульфидным обменом. В-третьих, наши попытки регенерировать термоинактивированный фермент, ограничившись на стадии разворачивания действием одного лишь дитиотрепта (без мочевины), к успеху не привели. Нам не удалось регенерировать ферменты и при действии одной мочевины (без расщепления S—S-связей). Однако последнее можно объяснить тем, что разворачивание белка в концентрированных растворах мочевины не затрагивает целиком всю глобулу; известно, что вблизи S—S-связей сохраняются области с упорядоченной структурой, которые исчезают лишь при дополнительном расщеплении S—S-связей, как это показано, например, для пепсиногена [24] (см. также литературу к [13]). Как мы полагаем, расщепление дисульфидных мостиков в необратимо денатурированном ферменте необходимо для разрушения именно этих остаточных структур. Лишь в этом случае (при совместном действии мочевины и дитиотрепта) удается белок полностью перевести в статистический клубок и тем самым создать условия для последующей реактивации.

Итак, предложенный ранее [13] подход к регенерации каталитической активности термоинактивированных ферментов удалось в настоящей работе приложить к ферменту ( $\alpha$ -химотрипсин), молекула которого состоит из 3 полипептидных цепей. Возможно, этот подход окажется пригодным и для ферментов с четвертичной структурой. Для успешной его реализации нужно научиться сворачивать белки из состояния статистического клубка в нативную конформацию, что уже было осуществлено для ряда белков [14], в частности для субъединичной щелочной фосфатазы [25]. В этом может сыграть положительную роль иммобилизация ферментов и использование в процессе их сворачивания эффекторов ферментативной активности [26, 27].

Не исключено, что предложенный подход удастся модифицировать, чтобы его можно было использовать также и для реактивации «несвратимо» денатурированных ферментов, не имеющих S—S-связей. К этому классу ферментов относится, например, большинство внутриклеточных протеаз, которые очень стабильны, но если денатурируют, то, как правило, необратимо [28, 29]. Обычно эти ферменты содержат в своей структуре несколько ионов металла (например,  $\text{Ca}^{2+}$ ), которые можно рассматривать как аналоги дисульфидных мостиков. Катионы металлов; многоточечно связываясь с изгибами полипептидных цепей, придают макромолекуле дополнительную жесткость и тем самым увеличивают ее



стабильность [28]. При регенерации таких ферментов процедуру расщепления S—S-связей при разворачивании, возможно, нужно будет заменить на удаление ионов металлов, например диализом или действием EDTA. При последующем сворачивании белка из статистического клубка ионы металлов необходимо добавить.

### Экспериментальная часть

В работе использовались ферменты: бычий трипсин (КФ 3.4.21.4) и бычий  $\alpha$ -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) (Koch-Light Laboratories, Англия). Для определения активности использовали специфические субстраты: трипсина — этиловый эфир *N*- $\alpha$ -бензоил-*L*-аргинина и  $\alpha$ -химотрипсина — этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина (Reanal, Венгрия). Ковалентную иммобилизацию  $\alpha$ -химотрипсина в полиакриламидном геле проводили, используя акрилолхлорид и акриламид (Koch-Light Laboratories, Англия); *N,N'*-метиленбисакриламид, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин и персульфат аммония (Reanal, Венгрия). Для регенерации термически инактивированных ферментов использовали мочевины («Союзреактив»), EDTA (Chemapol, СССР), дитиотреит (Sigma, США), глутатион восстановленный (Serva, ФРГ), глутатион окисленный (Reanal, Венгрия) и азот газобразный из баллонов (ос.ч.). В качестве носителя для иммобилизации использовали активированную бромцианом сефарозу 4 В (Pharmacia, Швеция).

*Иммобилизацию трипсина на бромциан-сефарозе 4 В* проводили, инкубируя 30 мг трипсина в 15 мл суспензии 5 г носителя в боратном буфере (0,1 М  $H_2BO_3$ , 0,05 М  $CaCl_2$ , pH 8,5) в присутствии 25 мг бензамидина при 4° при слабом перемешивании в течение суток. Далее носитель с иммобилизованным ферментом тщательно отмывали от сорбированного трипсина, многократно добавляя растворы 1,0 М KCl, 0,2 М  $NaHCO_3$  (pH 10,5),  $10^{-3}$  М HCl; 0,1 М трис (pH 8,0), 8 М мочевины, и чистой водой. Удельная активность иммобилизованного фермента составляла 0,87 мг активного трипсина на 1 г препарата или 70–80% активности от уровня нативного фермента [19].

*Получение  $\alpha$ -химотрипсина, ковалентно включенного в полиакриламидный гель*, проводили, следуя методике работы [21]. При этом активность иммобилизованного фермента составила ~25% от уровня нативного  $\alpha$ -химотрипсина.

*Ферментативную активность иммобилизованных трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина* определяли, измеряя скорости специфического ферментативного гидролиза этиловых эфиров *N*- $\alpha$ -бензоил-*L*-аргинина и *N*-ацетил-*L*-тирозина потенциметрически на pH-стате Radiometer TTT-1c (Дания). Навеску иммобилизованного фермента добавляли в кювету pH-стата с раствором 5 мМ субстрата в 0,1 М KCl (pH 8,0) и измеряли активность при 25°.

*Кинетику термоинактивации иммобилизованных ферментов* исследовали, инкубируя 0,2–1,0 г препарата фермента в 5–10 мл 5 мМ трис-буфера (pH 8,5) при перемешивании в закрытой термостатируемой ячейке при 80° для трипсина и 95° для химотрипсина. Через определенные интервалы времени отбирали пробы, охлаждали их и измеряли остаточную каталитическую активность иммобилизованного фермента методом pH-статирования. Активность выражали в процентах от первоначальной (до термоинактивации) каталитической активности.

Для последующих экспериментов использовали образцы трипсина, подвергавшиеся термоинактивации в стандартных условиях (~1 ч) и высушенные на стеклянном фильтре.

*Исследование стабильности иммобилизованного трипсина к действию мочевины.* В кювету pH-стата вносили 5 мл раствора субстрата ( $10^{-2}$  М этилового эфира *N*- $\alpha$ -бензоил-*L*-аргинина в 0,1 М KCl, pH 8,0) и 0,01–0,03 г

иммобилизованного фермента в отсутствие мочевины. Затем вносили навеску мочевины, необходимую для получения заданной концентрации денатуранта (при этом учитывали увеличение объема раствора при разбавлении мочевины), и через 3—5 мин (за которые проходили конформационные изменения, вызываемые денатурантом) измеряли каталитическую активность. Постепенно повышая концентрацию денатуранта в кювете рН-стата, доходили до насыщения раствора мочевиной (около 11 М мочевины при комнатной температуре). Далее суспензию последовательно разбавляли раствором субстрата. При этом по восстановлению ферментативной активности при разбавлении убеждались, что денатурация мочевиной при соединении к сефарозе трипсина носит обратимый характер.

*Регенерация необратимо денатурированных ферментных препаратов:*  
 а) *разворачивание иммобилизованного фермента с одновременным расщеплением его S—S-связей.* Навеску термоинактивированного иммобилизованного фермента (0,1—0,5 г) инкубировали 30 мин в 5 мл раствора 10 М мочевины (рН 3,0). Затем быстро (несколько минут) доводили рН до 8,5 и добавляли в суспензию раствор 10 мг EDTA и 20 мг дитиотреита в 0,5 мл 0,1 М трис-буфера, рН 8,5. Суспензию перемешивали не менее 3 ч при пробудькивании азота.

б) *реокисление S—S-связей в присутствии катализаторов тиол-дисульфидного обмена.* Развернутый восстановленный иммобилизованный фермент отделяли на стеклянном фильтре от раствора денатурантов, тщательно промывали 1 мМ раствором HCl и водой для удаления дитиотреита, помещали в раствор 2,4 мг окисленного глутатиона и 12 мг восстановленного глутатиона в 5 мл 0,1 М трис-буфера (рН 8,0), содержащего 0,05 М CaCl<sub>2</sub>, и оставляли при перемешивании на воздухе в течение 3—5 ч.

*Исследование смывания иммобилизованного трипсина с сефарозы.* Суспензию 1 г иммобилизованного трипсина в 10 мл раствора 5 мМ трис (рН 8,5) инкубировали при непрерывном перемешивании при 80°. Через 30 мин, 2 и 8 ч после начала инкубации отбирали пробы, измеряли в них остаточную активность и фильтровали. По изменению поглощения раствора фильтрата при 280 нм (Hitachi-Perkin-Elmer-124, Япония) определяли количество смываемого с носителя в раствор белка (мг/мл), считая коэффициент молярной экстинкции равным 50 000 [18].

#### ЛИТЕРАТУРА

- Martinek K., Berezin I. V. (1978) *J. Solid-Phase Biochem.*, **2**, 343—385.
- Мартинек К., Торчилин В. П. (1978) в сб.: *Итоги науки и техники. Сер. «Биол. химия»*. т. 12 (Крегович В. Л., Березин И. В., ред.), с. 17—48, изд. ВИНТИ, М.
- Иммобилизованные ферменты (1976) (Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К., ред.), т. I, II, изд. МГУ.
- Anson M. L. (1945) *Advances Protein Chem.*, **2**, 361—392.
- Tanford C. (1968) *Advances Protein Chem.*, **23**, 122—282.
- Baldwin R. L. (1975) *Annual Rev. Biochem.*, **44**, 453—475.
- Кущнер В. П. (1977) Конформационная устойчивость и денатурация биополимеров, «Наука», Л.
- Блюменфельд Л. А. (1977) в кн.: *Проблемы биологической физики*, «Наука», М.
- Davies R. B., Abraham E. P., Dalgleish D. G. (1974) *Biochem. J.*, **143**, 137—141.
- Madsen N. B., Cori C. F. (1956) *J. Biol. Chem.*, **223**, 1055—1066.
- Kitchell B. B., Henkens R. W. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **534**, 89—98.
- Ayala J. A., Nieto M. (1978) *Biochem. J.*, **169**, 371—380.
- Мартинек К., Можжаев В. В., Березин И. В. (1978) *Докл. АН СССР*, **239**, 483—485.
- Anfinsen C. B., Scheraga H. A. (1975) *Advances Protein Chem.*, **29**, 205—300.
- Gabel D., Kasche V. (1976) *Methods in Enzymology*, **44**, 526—538.
- Batteno R., Clever H. (1966) *Chem. Rev.*, **66**, 395—417.
- Lasch J., Koelsch R. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **82**, 181—186.
- Kirschenbaum D. M. (1972) *Int. J. Protein Res.*, **4**, 57—62.
- Porath J., Axen R. (1976) *Methods in Enzymology*, **44**, 19—45.
- Givol D., De Lorenzo F., Goldberger R. F., Anfinsen C. B. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 676—684.
- Martinek K., Klivanov A. M., Goldmacher V. S., Berezin I. V. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **485**, 1—12.

22. Martinek K., Klibanov A. M., Goldmacher V. S., Tchernyshova A. V., Mozhaev V. V., Berezin I. V., Glotov B. O. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **485**, 13-28.
23. Martinek K., Goldmacher V. S., Klibanov A. M., Berezin I. V. (1975) *FEBS Lett.*, **51**, 152-156.
24. Ahmad F., McPhie P. (1978) *Biochemistry*, **17**, 241-246.
25. Levinthal C., Singer E. R., Fetherolf K. (1962) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **48**, 1230-1236.
26. Можкаев В. В., Мартинек К., Березин И. В. (1979) *Молекулярн. биология*, **13**, 73-80.
27. Можкаев В. В., Мартинек К., Березин И. В. (1979) *Молекулярн. биология*, **13**, 673-680.
28. Matthews B. W., Weaver L. H., Kester W. R. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 8030-8034.
29. Iwai A. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **445**, 182-193.

Поступила в редакцию  
19.XII.1978

## A STUDY ON THE MECHANISMS OF THERMOINACTIVATION OF IMMOBILIZED TRYPSIN AND $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN

MOZHAEV V. V., SMIRNOV M. D., MARTINEK K., BEREZIN I. V.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Irreversibly thermodenatured trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized on Sepharose and polyacrylamide gel, respectively, were reactivated in about 100% yield after their unfolding in urea and disulfide bonds cleavage followed by refolding into the native conformation in optimal conditions. It was shown that the reactivation of enzymes after their thermoinactivation can be repeated several times. The effects of the inactivating conditions (temperature and oxygen concentration in suspension) on the yields of the regenerated enzymes were investigated. A conclusion was made that thermoinactivation had not affected the enzyme covalent structure but resulted in a disturbance of the secondary and tertiary protein structures.

---