



УДК 577.156.3.02

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ МАТРИЦ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ТРИПСИНА И ХИМОТРИПСИНА

Туркова Я.

Институт органической химии и биохимии Чехословацкой Академии наук, Прага

*Козлов Л. В., Бессмертная Л. Я., Бударянцева Л. В.,
Красильникова В. М., Антонов В. К.*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина Академии наук СССР, Москва

Исследована термоденатурация препаратов трипсина и химотрипсина, иммобилизованных на оксипалкилметакрилатных гелях, модифицированных глюкозой или эпихлоргидрином, и микросферической целлюлозе. Наблюдаемое повышение устойчивости по сравнению с немодифицированными ферментами объясняется снижением энтропии активации реакции термоденатурации. Изучение обратной денатурации одного из препаратов трипсина, иммобилизованного на покрытом глюкозой оксипалкилметакрилатном геле, показало, что в отличие от кинетической термодинамическая термостабильность препарата снижается. Сопоставлено влияние различных матриц и способа иммобилизации на активационные параметры реакции термоденатурации.

Изменение устойчивости ферментов к денатурирующим воздействиям среды при их иммобилизации — один из важных вопросов общей проблемы иммобилизации ферментов. Изменение стабильности иммобилизованных ферментов к тепловой денатурации связано как с изменением кинетической стабильности, т. е. активационных параметров реакции термоденатурации, так и с изменением термодинамической стабильности, т. е. равновесных параметров. В работах, посвященных изучению влияния матрицы на стабильность иммобилизованных ферментов, было показано, что взаимодействие фермента с заряженным носителем приводит к снижению энтальпии и энтропии активации термоденатурации [1—5]. При этом кинетическая стабильность иммобилизованного фермента повышается по сравнению с нативным, если больший вклад в изменение свободной энергии активации вносит снижение энтропии активации [1, 3, 5], или понижается, если больший вклад вносит снижение энтальпии активации [2, 4]. Нейтральная матрица, такая, как растворимый декстран, обнаруживала другое влияние [6], и активационные параметры реакции денатурации декстран-химотрипсина [5] были выше, чем для самого химотрипсина [7].

В связи с этим интересно было изучить влияние на стабильность иммобилизованных ферментов нейтральных матриц различной степени структурной жесткости и различной гидрофильности. Удобными в этом

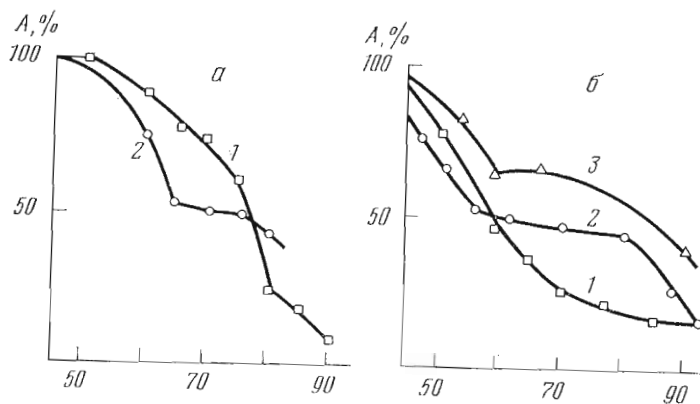


Рис. 1. Зависимость активности препаратов иммобилизованных трипсина (а) и α -химотрипсина (б) от температуры 10-минутной инкубации при рН 7,3. Носители: 1 – сепарон-Glc, 2 – целлюлоза С-525, 3 – сферон 300Е

отношении носителями оказались разработанные в Институте макромолекулярной химии Чехословацкой Академии наук микросферическая целлюлоза С-525 [8], а также оксиалкилметакрилатные гели – сферон, сепарон [9]. На этих носителях были иммобилизованы α -химотрипсин и трипсин – ферменты, иммобилизация которых на других носителях и стабильность нами ранее исследовались [1,3–6,10].

На целлюлозе и сепароне Н1000, покрытом глюкозой (сепарон-Glc), иммобилизацию проводили путем образования шиффовых оснований аминогрупп ферментов с альдегидными группами носителя, образующимися в результате периодатного окисления углеводных звеньев, с последующим восстановлением альдиминов боргидридом натрия. На сфероне 300Е иммобилизация ферментов осуществлялась за счет эпоксидных групп носителя, вводимых в сферон 300Е действием эпихлоргидрина. Характеристика препаратов иммобилизованных ферментов дана в табл. 1.

Для характеристики термостабильности полученных препаратов была определена зависимость сохранения активности ферментов от температуры инкубации после 10-минутной инкубации при повышенной температуре и рН 7,3, как это было предложено в работе [11] для характеристики термостабильности препаратов иммобилизованных ферментов. Из графиков, приведенных на рис. 1, следует, что препараты иммобилизованных трипсина и α -химотрипсина негомогенны в отношении их тепловой устойчивости. Целлюлоза-трипсин (рис. 1а, 2) и целлюлоза-химотрипсин (рис. 1б, 2) четко делятся на две фракции: 50% лабильной формы, денатурирующей полностью за 10 мин до 60°C, и 50% стабильной, денатурация которой начинается выше 80°C. Такой характеристикой обладают препараты α -химотрипсина, иммобилизованные на нерастворимой [1] и растворимой [3] СМ-целлюлозе. Однако, если в случае СМ-целлюлозы матрица

Таблица 1

Характеристика препаратов иммобилизованных ферментов

| Носитель | Количество белка, мг на 1 г препарата | | | |
|-----------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | α -Химотрипсин | | Трипсин | |
| | связалось | активного | связалось | активного |
| Сферон | 2,4 | 0,02 | 2 | 0,04 |
| Сепарон-Glc | 20 | 0,1 | 13 | 0,3 |
| Целлюлоза С-525 | 40 | 4,3 | 44 | 4,7 |

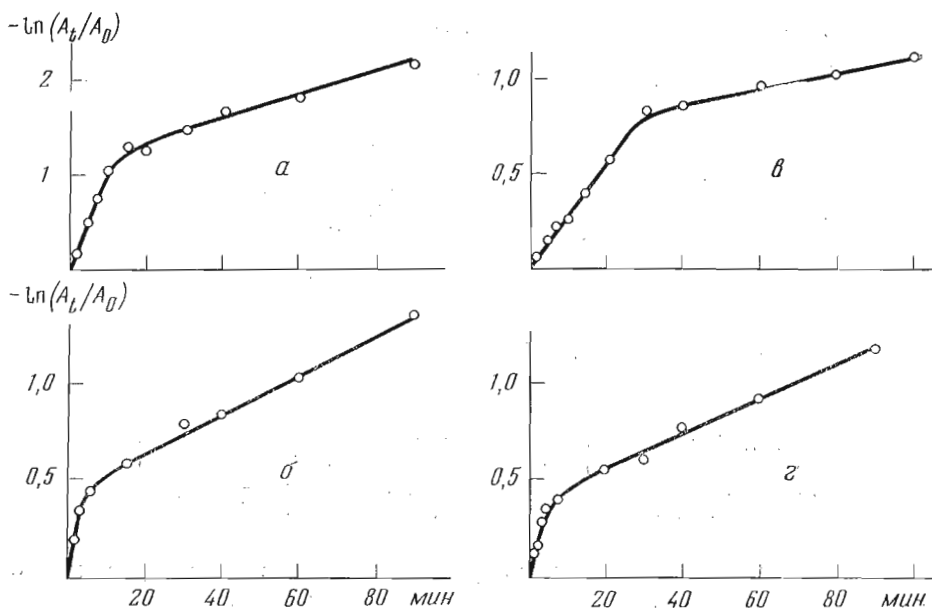


Рис. 2

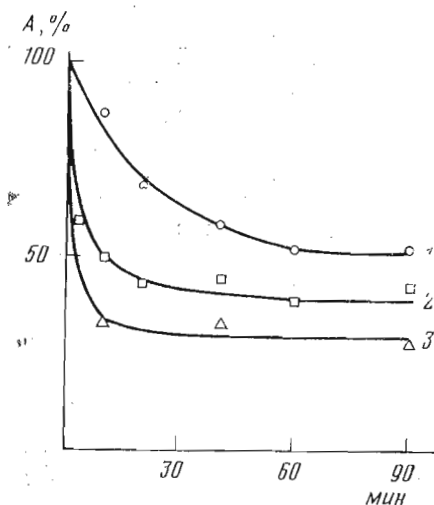


Рис. 3

Рис. 2. Кинетика денатурации при 70°C и pH 7,3 препаратов α -химотрипсина (а, б) и трипсина (в, г), иммобилизованных на сепароне-Glc (а, в) и целлюлозе (б, г). A_t/A_0 — доля остаточной активности фермента после инкубации (в — препарат II)

Рис. 3. Кинетика тепловой денатурации при pH 7,85 трипсина, иммобилизованного на сепароне-Glc (препарат I): 1 — 55°C , 2 — 65°C , 3 — 75°C

заряжена, в данной работе препараты получены иммобилизацией на нейтральной целлюлозе. Кроме того, в различных опытах различаются и способы иммобилизации, и ферменты (трипсин и химотрипсин), а также и физические свойства матрицы (растворимая и нерастворимая). Тем не менее гетерогенность в отношении термостабильности, т. е. наличие примерно равных количеств двух фракций, наблюдается во всех примерах с целлюлозными носителями. Следует отметить, что связывание α -химотрипсина с другими углеводными матрицами — растворимым декстраном и альгинатом [5] — также приводит к получению двух форм, лабильной и стабильной, однако в других соотношениях. Как было показано в работе [12], лабильная форма представляет собой препарат с одноточечным связыванием белка с матрицей, а стабильная — с многоточечным.

Соотношение лабильной и стабильной фракций в препаратах ферментов, иммобилизованных на сепароне-Glc, таково, что стабильная фракция

Таблица 2

Активационные и термодинамические параметры термоденатурации препаратов трипсина

| Препарат | pH | ΔH^\ddagger , ккал/моль | ΔS^\ddagger , э. е. | ΔF^\ddagger , ккал/моль (T, °C) | ΔH° , ккал/моль | ΔS° , э. е. |
|--|------|------------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------------|
| Трипсин [13] | 2,2 | 66,5 | +142 | 21 (50) | 30 | +93 |
| ренатурация [13] | 2,2 | 36,5 | +49 | 20,7 (50) | 30 | +93 |
| Трипсин сухой [14] | — | 22,5 | -25 | 31 (70) | Необратимая денатурация | |
| Сепарон-Glc-трипсин I ренатурация | 7,85 | 45,4±6,5 | +65,8±19,4 | 25,0 (60) | 9,8±0,2 | +29,6±0,5 |
| Сепарон-Glc-трипсин II лабильная фракция | 7,85 | 35,6 | +32,2 | 24,9 (60) | » | » |
| стабильная фракция | 7,3 | 43±4 | +51±11 | 25,5 (70) | Необратимая денатурация | |
| Целлюлоза-трипсин лабильная фракция | 7,3 | 21,4±3,3 | -13,6±9,6 | 26,1 (70) | » | » |
| стабильная фракция | 7,3 | 22,5±4 | -6,1±12 | 24,6 (70) | » | » |
| » * | 7,3 | 18,1±4,8 | -23,7±14 | 26,2 (70) | » | » |
| » * | 7,85 | 18,9±1,0 | -23,2±2,8 | 26,6 (60) | » | » |

* Другой образец препарата.

Таблица 3

Активационные параметры термоденатурации препаратов химотрипсина

| Препарат | pH | ΔH^\ddagger , ккал/моль | ΔS^\ddagger , э. е. | ΔF^\ddagger , ккал/моль (t, °C) |
|---|-----|---------------------------------|--------------------------------|--|
| Химотрипсин [7] | 7,6 | 57 | +125 | 16,5 (45) |
| Сепарон-Glc-химотрипсин лабильная фракция | 7,3 | 46,5±6,5 | +63,6±17 | 25 (65) |
| стабильная фракция | 7,3 | 37,9±5,6 | +35,3±3,6 | 25,8 (72) |
| Сферон E-химотрипсин лабильная фракция | 7,5 | 17,5±0,8 | -23,4±2,2 | 25,3 (60) |
| Целлюлоза-химотрипсин лабильная фракция | 7,3 | 13,3±3,4 | -32,8±10 | 24,3 (60) |
| стабильная » | 7,3 | 8,4±3,1 | -51,7±9,5 | 25,5 (60) |

составляет около 20–25%, а лабильная, соответственно, в 3–4 раза больший процент; для химотрипсина, иммобилизованного на сфере E, стабильной фракции несколько больше половины.

Как следует из рис. 1, лабильные фракции препаратов ферментов, иммобилизованных на оксиалкилметакрилатных гелях, в целом устойчивее лабильных фракций ферментов, иммобилизованных на целлюлозе, а устойчивость стабильных фракций всех препаратов примерно одинакова. Различия же в устойчивости, проявляемые при высоких температурах, объясняются соотношением лабильной и стабильной фракций. Большая доля стабильной фракции в случае целлюлозной матрицы делает эти препараты в целом более стабильными.

Наличие двух фракций, различающихся по термостабильности, наиболее заметно на кинетических кривых денатурации (рис. 2). Графики легко разделяются на сумму двух экспоненциальных кривых, что хорошо видно в полулогарифмических координатах. Заметны также различия в соотношениях двух фракций, различающихся скоростями термоденатурации.

Мы получили два несколько различающихся препарата трипсина, иммобилизованного на сепароне-Glc. Препарат I был гомогенен в отношении термостабильности, т. е. представлял собой практически одну фракцию, препарат II состоял из двух фракций. Характерной особенностью

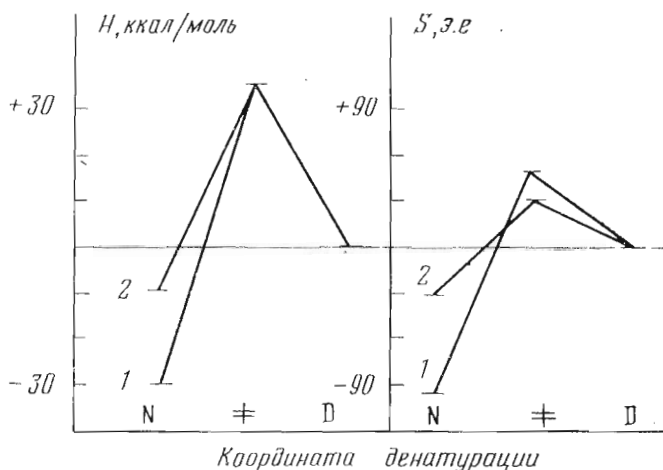


Рис. 4. Изменение энтальпии и энтропии вдоль координаты тепловой денатурации трипсина (1) и сепарон-Glc-трипсина I (2) по данным табл. 2. N, ≠, D — соответственно нативное, активированное и денатурированное состояние

препарата I было также то, что денатурация его при каждой данной температуре проходила не до конца, а до какого-то определенного своего предела (рис. 3). Мы предположили, что имеем дело с равновесием при каждой температуре, т. е. с обратимой денатурацией. Действительно, инкубация препарата I, подвергнувшегося предварительной обработке при высокой температуре (75°C), при более низкой температуре (50°C) приводит к возрастанию во времени активности препарата.

На основании кинетических данных для денатурации препаратов иммобилизованных ферментов при различных температурах были построены графики Аррениуса и вычислены активационные параметры термоденатурации. Для сепарон-Glc-трипсина I получены также активационные параметры ренатурации и равновесные термодинамические параметры денатурации при рассмотрении кинетики процесса денатурации как процесса релаксации до равновесного состояния и с учетом констант равновесия для данных температур (на основании уравнения Вант-Гоффа), как это было сделано в работе [4]. Полученные данные приведены в табл. 2.

Интересно было сравнить денатурацию иммобилизованного трипсина и нативного. Однако исследование тепловой денатурации трипсина в растворе при pH 7–8 невозможно осуществить вследствие сильного автолиза. Поэтому для сравнения мы рассмотрели активационные и равновесные параметры денатурации трипсина в растворе при pH 2,2, рассчитанные на основании цифрового и графического материала, приведенного в работе Поля [13]. Интересно также было сравнить эти данные с активационными параметрами тепловой денатурации трипсина в сухом виде [14], поскольку, как и в случае иммобилизованного фермента, здесь мы также следим за поведением белка в твердой фазе.

Прежде всего обращает на себя внимание то, что для ферментов в твердой фазе (иммобилизованных и сухого) наблюдается снижение как энтальпии, так и энтропии активации денатурации. Подобное явление наблюдалось и ранее для заряженных матриц, в том числе растворимых [1–5]. По-видимому, это является следствием влияния микроокружения белка, приводящего к изменению его структуры. На рис. 4 приведены изменения энтальпии и энтропии вдоль координаты реакции обратимой тепловой денатурации по данным Поля [13] для трипсина и полученным в этой работе данным для сепарон-Glc-трипсина I. Как и в работе [4] по

обратимой денатурации препаратов химотрипсина, нативный и модифицированный трипсин различаются только активационными параметрами денатурации, а активационные параметры ренатурации у них близки (см. табл. 2). Это может означать общность уровней денатурированного и активированного состояний и различие исходных уровней (рис. 4). Таким образом, модифицирование белка выводит его из нативного состояния и переводит в другое, более близкое к денатурированному. При этом снижаются как энтальпийный, так и энтропийный активационные параметры, что приводит в случае большего вклада энтальпии к уменьшению, а в случае большего вклада энтропии к повышению кинетической стабильности белка. Однако даже в случае повышения кинетической устойчивости термодинамическая стабильность может снижаться. По-видимому, это наблюдается довольно часто, так как любая модификация скорее всего выводит фермент из его устойчивой нативной структуры (а не закрепляет нативную структуру) в результате образования дополнительных связей между цепями макромолекулы белка (поперечное сшивание) или связей с носителем, как это иногда предполагается (см., например, [15]).

Сравнение таких носителей, как сепарон-Glc и целлюлоза С-525, показывает, что лабильная фракция более устойчива для препаратов сепарон-Glc-трипсина, в то время как стабильная устойчивее у препарата целлюлоза-трипсина, что достигается более сильным снижением энтропии активации. Поскольку доля стабильной фракции у целлюлоза-трипсина выше, то при высоких температурах (выше 80°C) этот препарат кинетически устойчивее сепарон-Glc-трипсина, а при температурах ниже 80°C наблюдается обратное явление — сепарон-Glc-трипсин устойчивее целлюлоза-трипсина.

Различие в поведении этих препаратов трипсина обусловлено, по-видимому, не методом иммобилизации (поскольку метод одинаков) и не характером поверхности матрицы (поскольку поверхность сепарона покрыта остатками глюкозы и образуется такое же углеводное микроокружение, как у целлюлозы), а различием в подвижности полимерных цепей носителя. Высокая подвижность (и набухаемость) целлюлозы обеспечивает осуществление в большей степени многоточечного ковалентного связывания, что приводит к большей доле стабильной фракции. В работе [3] было показано, что увеличение подвижности цепей СМ-целлюлозы при переходе к растворимой ее форме приводит к получению кинетически еще более стабильных препаратов ферментов с весьма сильным снижением энтропии активации реакции денатурации.

Что касается препаратов химотрипсина, иммобилизованных на сепароне-Glc, сферопе 300Е и целлюлозе С-525 (см. табл. 3), то здесь проявляются в основном те же свойства, что и у препаратов трипсина. Стабильность лабильной фракции препаратов со сфероном и сепароном выше, чем с целлюлозой. Самой стабильной оказалась стабильная фракция сепарон-Glc-химотрипсина (табл. 3), однако ее очень мало в препарате (см. рис. 1б). Большая доля стабильной фракции в сферон-Е-химотрипсине обеспечила более высокую кинетическую стабильность препарата по сравнению с двумя препаратами во всем диапазоне исследованных температур (рис. 1б). Следует отметить, что если кинетическая стабильность сферон-Е-химотрипсина и особенно целлюлоза-химотрипсина достигается главным образом за счет снижения энтропии активации реакции денатурации, то стабильность препаратов химотрипсина (так же как и трипсина), иммобилизованных на сепароне-Glc, достигается не только за счет снижения энтропии, но и за счет сохранения довольно высоких значений энтальпии активации. Кинетическая стабилизация фермента, иммобилизованного на сферопе 300Е, достигается, по-видимому, вследствие образования множества ковалентных связей (многоточечное связывание), о чем свидетельствует высокая доля стабильной фракции (рис. 1б) и существенное снижение энтропии активации реакции термоденатурации (табл. 3).

Сопоставление свойств препаратов ферментов, иммобилизованных на оксиалкилметакрилатных гелях и целлюлозе, показывает, что покрытие оксиалкилметакрилатного геля глюкозой приводит к более активным препаратам, однако мало отличающимся по термостабильности от препаратов фермента, иммобилизованного на целлюлозе. Ферменты, иммобилизованные на сфероне 300E, обладают более высокой термостабильностью, однако активность таких препаратов низка по сравнению с ферментами, иммобилизованными на гелях, покрытых глюкозой.

Экспериментальная часть

Сферон 300E получен действием эпихлоргидрина на оксиалкилметакрилатный гель сферон 300 (размер частиц 125–200 мкм).

Сепарон-Glc — оксиалкилметакрилатный гель сепарон H1000, содержащий глюкозу (18,4%, размер частиц 100–200 мкм). Оба препарата гелей любезно предоставлены И. Чоупеком и А. Фридриховой (народное предприятие «Laboratorní přístroje», г. Прага).

Микросферическая целлюлоза C-525 (размер частиц 160–315 мкм) любезно предоставлена И. Штамбергом (Институт макромолекулярной химии ЧСАН, г. Прага).

Трипсин и химотрипсин лиофилизированные — производства народного предприятия «Lečiva» (ЧССР). Содержание белка в препарате химотрипсина, определенное спектрофотометрически, 85% от веса препарата; содержание активного фермента, определенное титрованием *N-транс*-циннамилмидазолом [16], — 70% от веса препарата. Содержание белка в препарате трипсина — 80%, его активность (см. ниже) составляет 60% от веса препарата.

Иммобилизация трипсина и химотрипсина на сфероне 300E [17, 18]. 5 г сухого геля сферона 300E суспендировали в 50 мл раствора фермента (10 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере, pH 3,5, содержащем 0,02 М CaCl₂, и выдерживали при 20° С в течение 3 сут при интенсивном перемешивании. По окончании связывания гели отфильтровывали и обрабатывали 50 мл 1 М этаноламина, pH 9, с перемешиванием при 20° С в течение 2 сут с целью блокирования оставшихся свободных эпоксидных групп. Затем гели промывали 0,1 М трис-HCl-буфером, pH 8,0, содержащим 2 М NaCl и 0,02 М CaCl₂, и затем 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,0, содержащим 0,02 М CaCl₂. Гели хранили в этом же буфере.

Окисление микросферической целлюлозы и сепарона-Glc. 50 мл влажной целлюлозы или геля сепарона-Glc суспендировали в 500 мл 0,1 М NaIO₄ и перемешивали при 20° С в течение 1 ч, затем переносили в колонку и промывали водой до достижения в элюате электропроводности, равной электропроводности воды.

Иммобилизация трипсина и химотрипсина на окисленной целлюлозе или окисленном сепароне-Glc [19]. 25 мл окисленной целлюлозы или окисленного сепарона-Glc, уравновешенных в 0,1 М боратном буфере, pH 9,0, содержащем 0,005 М CaCl₂, инкубировали с 50 мл раствора фермента (10 мг/мл) в том же буфере в течение 4 ч; в суспензию добавляли дважды по 20 мл NaBH₄ с интервалом в 20 мин, затем суспензию переносили в колонку и промывали аналогично промывкам при иммобилизации на сфероне 300E.

Содержание белка в препаратах ферментов определяли аминокислотным анализом [20] полного кислотного гидролизата (6 М HCl, 110° С, 20 ч).

Активность ферментных препаратов определяли на pH-стате ТТТ-60 (Radiometer, Дания) при 25° С, pH 8,0, ионная сила 0,1, по скорости гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина (1 мМ) для химотрипсина и этилового эфира *N*-бензоил-*L*-аргинина (0,835 мМ) для трипсина.

Исследование тепловой денатурации препаратов трипсина и химотрипсина проводили в 0,02 М фосфатном буфере, pH 7,3; 7,5 или 7,85, при тем-

пературах 30–100° С. После определенного времени инкубации при соответствующей температуре раствор охлаждали ледяной водой, затем доводили до комнатной температуры и определяли остаточную активность фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Суровцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1971) Биохимия, 36, 199–204.
2. Баева В. С., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1977) Биохимия, 42, 706–711.
3. Кинстлер О. Б., Козлов Л. В. (1977) Биохимия, 42, 1674–1681.
4. Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1977) Биохимия, 42, 1825–1834.
5. Молчанова Н. Н., Козлов Л. В. (1978) Биохимия, 43, 1006–1011.
6. Lasch J., Bessmertnaya L., Kozlov L. V., Antonov V. K. (1976) Eur. J. Biochem., 63, 591–598.
7. Антонов В. К., Воротынцева Т. Н., Коган Г. А. (1970) Молекулярн. биология, 4, 240–245.
8. Peška J., Stamberg J., Hradil J., Ilavský M. (1976) J. Chromatogr., 125, 455–469.
9. Soupek J., Křiváková M., Pokorný S. (1973) J. Polym. Sci., Polym. Symposia, 42, 182–190.
10. Яровая Г. А., Гулянская Т. Н., Доценко В. Л., Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1975) Биоорганич. химия, 1, 646–651.
11. Суровцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1970) Докл. АН СССР, 195, 1463–1465.
12. Козлов Л. В., Суровцев В. И., Антонов В. К. (1975) Биоорганич. химия, 1, 127–130.
13. Pohl F. M. (1968) Eur. J. Biochem., 7, 146–152.
14. Mullaney P. F. (1966) Nature, 200, 953.
15. Угарова Н. Н. (1979) в кн.: Итоги науки и техники, т. 12. Инженерная энзимология и биоорганический катализ, с. 92–114, ВИНИТИ, М.
16. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930–2935.
17. Turková J., Bláha K., Malaniková M., Vančurová D., Svec F., Káral J. (1978) Biochim. et biophys. acta, 524, 162–169.
18. Turková J., Bláha K. (1978) 12th FEBS Meeting Abstracts, Abstract No 3838.
19. Royer G. P., Liberatore F. A., Green G. M. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 64, 478–484.
20. Spackman D., Stein W. H., Moore S. (1958) Anal. Chem., 30, 1190–1206.

Поступила в редакцию
27.VI.1978.

STUDY OF NEUTRAL MATRICES EFFECTS ON STABILITY OF IMMOBILIZED TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN

TURKOVÁ J., KOZLOV L. V., BESSMERTNAYA L. Ya.,
KUDRYAVTSEVA L. V., KRASILNIKOVA V. M., ANTONOV V. K.

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague; M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Thermal denaturation of trypsin and chymotrypsin immobilized either on hydroxyalkyl methacrylate gels modified by glucose and epichlorohydrine or on cellulose in bead form was studied. The observed increase in the stability as compared to unmodified enzymes is explained by decrease in the entropy of activation for the denaturation reaction. A study of reversible denaturation with one of the trypsin preparations immobilized on the glucose covered gel demonstrated the decrease in thermodynamic stability in contrast to the increase in kinetic stability. The effects of various matrices and immobilization procedures on the denaturation activation parameters were compared.