

УДК 541.64:547.96

КОНФОРМАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ ПОЛИМЕРА-НОСИТЕЛЯ И АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФЕРМЕНТА

© 2020 г. И. Л. Валуев¹, *, Л. В. Ванчугова¹, Л. И. Валуев¹

¹Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчева Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 27.02.2019 г.

После доработки 22.06.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Изучена зависимость активности иммобилизованного трипсина от конформации макромолекулы полимера-носителя. Методом флуоресцентной спектроскопии показано, что иммобилизация фермента на жесткой полимерной глобуле предотвращала ассоциацию его молекул и обеспечивала доступность активных центров даже для высокомолекулярного субстрата.

Ключевые слова: трипсин, иммобилизация, декстран, полиакриламид

DOI: 10.31857/S0555109920010158

В современной прикладной биохимии и биотехнологии нашли широкое применение биологически активные соединения, главным образом ферменты, иммобилизованные на природном или синтетическом полимерном носителе [1]. Одним из условий успешного использования таких систем является правильный выбор носителя, при котором удается существенно повысить время активного функционирования ферментов, изменить их катализическую активность и специфичность действия, а также интенсифицировать технологические процессы с участием этих биологических катализаторов.

В предыдущих работах [2, 3] при изучении модификации белкового ингибитора протеолитических ферментов (ММ 31000 Да) природными и синтетическими полимерами было высказано предположение, что, наряду с химическими свойствами используемого носителя, обеспечивающими его реакцию с белком в мягких условиях, определенный вклад в изменение активности модифицированного белка может вносить и конформация полимерной цепи носителя. Было также предложено, что повышение гибкости цепи увеличивает вероятность внутримолекулярной ассоциации связанных с ней белковых молекул, создавая тем самым стерические препятствия для их реакции с высокомолекулярным субстратом. В качестве белка был использован трипсин (КФ 3.4.21.4), который был одним из первых ферментов, изученных в иммобилизованном состоянии [4]. Выбор полиакриламида и декстрана в качестве носителей обусловлен их достаточно широким применением в медицине, биотехнологии и пищевой

промышленности [5–7]. Флуоресцентная спектроскопия была основным методом для изучения ассоциации белковых молекул.

Цель работы – синтезировать производные фермента с двумя полимерами, различающимися конформациями цепи, и найти корреляцию между строением этих производных и катализической активностью иммобилизованного фермента по отношению к низко- и высокомолекулярным субстратам.

МЕТОДИКА

В работе использовали акриламид, *n*-нитроанилид N- α -бензоил-D,L-аргинина (**БАПА**) и декстран с ММ 125000 Да (“Serva”, Германия), трипсин, панкреатический ингибитор трипсина (**ПИТ**), ингибитор трипсина из сои (**СИТ**), родамин-В-изотиоцианат и флуоресцеин-изотиоцианат на цеолите (“Sigma”, США), утиный овомукоид (**ОМ**, ММ 31000 Да) (“Белмедпрепараты”, Беларусь), сефадексы G-25 и G-100 (“Pharmacia”, Швеция). N-акрилоилгидроксифталимид (**АГФИ**) синтезировали по методике [8].

Родамин- (**РТ**) и флуоресцеинмеченный трипсин (**ФТ**) получали реакцией трипсина с родамин-В- или флуоресцеин-изотиоцианатом на цеолите. Раствор отфильтровывали от цеолита и отделяли от непрореагированного красителя на сефадексе G-25.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре F-4000 (“Hitachi”, Япония).

Таблица 1. Каталитическая и комплексообразующая активность иммобилизованного трипсина

Полимер	Иммобили- зованный трипсин*	Активность по отношению к различным субстратам, % от активности нативного трипсина **			
		БАПА	ПИТ	СИТ	ОМ
Декстран	1–2	72–75	66–70	58–62	47–51
	3–4	74–80	59–64	61–67	45–49
	6–7	69–75	61–67	56–60	50–54
Полиакрил-амид	1–2	67–72	62–65	52–56	45–49
	4–5	70–74	44–49	40–46	34–39
	6–7	66–70	38–42	35–39	28–34

* Количество молекул трипсина, связанных с одной молекулой полимера.

** Приведены минимальные и максимальные значения 3 измерений.

Иммобилизацию трипсина на декстране проводили по методике [9]. При этом для иммобилизации была использована смесь РТ и ФТ (мольное соотношение 2 : 1). Продукты иммобилизации отделяли от непрореагировавших компонентов гель-фильтрацией на сефадексе G-100.

Иммобилизацию аналогичной смеси РТ и ФТ на полиакриламиде осуществляли взаимодействием свободных аминогрупп молекул фермента с предварительно синтезированным активированным сополимером акриламида и АГФИ. Молекулярную массу полимеров оценивали методом визкозиметрии [10].

Амидазную активность нативного и иммобилизованного трипсина определяли, измеряя степень гидролиза БАПА по методу Какадэ [11]. Активность фермента выражали в %, принимая за 100% активность нативного фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выяснения роли конформационного состояния макромолекулы полимера-носителя в проявлении активности иммобилизованного фермента были использованы два полимера: природный полисахарид – декстран, и карбоцепной синтетический полимер – полиакриламид. В растворе макромолекула полиакриламида находится в конформации статистического клубка, в котором внутримолекулярная концентрация собственных звеньев не превышает 1 мас. %. [12]. Макромолекула декстрана имеет более плотную упаковку и форму жесткого клубка [13].

Для иммобилизации на декстране фермент предварительно окисляли перидатом калия. Продукт окисления содержал 51 ± 6 альдегидных групп, которые определяли спектрофотометрически с помощью 4-амино-3-гидразино-5-меркапто-1,2,4-триазола [14]. Взаимодействием альдегидных групп декстрана с аминогруппами трипсина и восстановлением азометиновой связи боргидридом натрия были получены и выделены производ-

ные декстрана, каждая макромолекула которого содержала в среднем от одной до семи молекул трипсина.

Иммобилизацию меченного трипсина на полиакриламиде проводили, используя сополимеры акриламида и АГФИ, имеющие молекулярную массу 104000–107000 Да. Изменением концентрации взаимодействующих соединений были получены и выделены производные, каждая молекула которых содержала в среднем от одной до шести молекул фермента.

Результаты изучения активности иммобилизованного трипсина по отношению к низко- и высокомолекулярным субстратам приведены в табл. 1. Из табл. 1 видно, что изменение природы полимерной цепи лишь в незначительной степени влияло на активность иммобилизованного трипсина по отношению к низкомолекулярному субстрату – БАПА. Так, активность трипсина, иммобилизованного на декстране, составляла 69–80% от активности нативного фермента, а трипсина, связанного с полиакриламидом – 66–74%. При этом активность фермента практически не зависела от количества его молекул, связанных с носителем. Следовательно, при иммобилизации трипсина на обоих носителях не создавалось значительных стерических препятствий для взаимодействия активных центров соседних молекул фермента с субстратом.

Иная картина наблюдалась при изучении активности иммобилизованного трипсина по отношению к высокомолекулярным соединениям. Эту активность оценивали, изучая состав комплексов трипсина с панкреатическим ингибитором (ММ 6500 Да), ингибитором из сои (ММ 21000 Да) и овомукоидом (ММ 31000 Да). Все эти ингибиторы подавляли активность трипсина путем образования комплекса с константой связывания порядка 10^{10} M^{-1} [15].

Из данных табл. 1 видно, что в этом случае активность иммобилизованного трипсина опреде-

лялась природой используемого носителя и количеством связанных с ним молекул фермента. Если это количество невелико (1–2 молекулы трипсина на одну макромолекулу носителя), то активность иммобилизованного трипсина практически не зависела от природы носителя и слегка уменьшалась (с 66–70 до 45–51% от активности нативного фермента) с увеличением молекулярной массы ингибитора с 6500 до 31000 Да.

Конформационное состояние полимера носителя начинало проявляться при увеличении числа связанных с полимером молекул трипсина. Активность иммобилизованного на поликариламиде трипсина (Т-ПАА) оказалась значительно ниже, чем активность фермента, иммобилизованного на декстране (Т-Д). При этом, чем выше молекулярная масса ингибитора, тем больше была эта разница.

В предыдущих работах [1–3] было высказано предположение, что такое снижение активности может быть обусловлено белок-белковыми взаимодействиями, характерными для поведения белков в растворе, то есть внутримолекулярной ассоциацией связанных с молекулой полимера белковых глобул. Для проверки этого предположения в данной работе был использован метод флуоресцентной спектроскопии (рис. 1).

На рис. 1 приведена зависимость интенсивности флуоресценции водных растворов, полученных при смешивании ФТ и РТ (1) и при иммобилизации этой смеси на декстране (2) и на поликариламиде (3), от концентрации фермента. Видно, что интенсивность флуоресценции ФТ, иммобилизованного совместно с РТ на декстране, была несколько ниже, чем раствора смеси ФТ и РТ, то есть происходила передача части энергии с донора (Φ) на акцептор (Р). В существенно большей степени эффект понижения интенсивности флуоресценции был характерен для ФТ, иммобилизованного совместно с РТ на поликариламиде. Эти результаты свидетельствовали о том, что при иммобилизации образовывались ассоциаты ФТ и РТ, в которых расстояние между метками оказывалось значительно меньше среднего расстояния, рассчитанного для равномерного распределения белковых глобул [16]. В наибольшей степени этот эффект наблюдался для трипсина, иммобилизованного на гибком носителе, поликариламиде. Жесткая структура глобулы декстрана препятствовала сближению иммобилизованных на ней молекул фермента, что и обеспечивало их доступность даже для относительно высокомолекулярного ингибитора.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что конформация макромолекул полимера-носителя является одним из основных факторов, определяющих активность иммобилизованного белка по

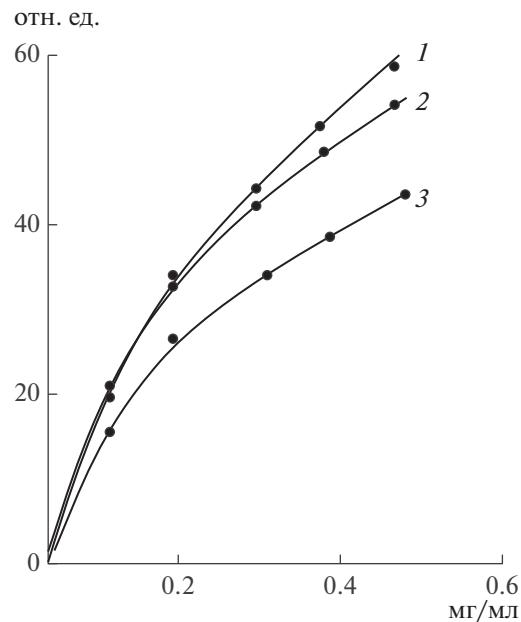


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции (отн. ед.) при 518 нм смеси ФТ и РТ (1) и ФТ и РТ, иммобилизованных на декстране (2) и на поликариламиде (3), от концентрации фермента (соотношение ФТ и РТ – 1 : 2).

отношению к высокомолекулярным субстратам. Так, молекулы белка, иммобилизованные на гибком носителе, образовывали ассоциаты, создавая тем самым стерические препятствия для взаимодействия с высокомолекулярным субстратом. Жесткие цепи носителя предотвращали такую ассоциацию, обеспечивая доступность его активных центров для высокомолекулярных субстратов. Для низкомолекулярных субстратов такая ассоциация не являлась определяющей и молекулы белка сохраняли высокую активность после иммобилизации на носителе, как с гибкой, так и жесткой цепью. Полученные результаты открывают еще одну возможность регулирования специфичности действия ферментов путем подбора носителя с разной гибкостью полимерной цепи.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИНХС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maiti S., Shklyaev O.E., Balazs A.C., Sen A. // Langmuir. 2019. V. 35. № 10. P. 3724–3732.
2. Шаназарова И.М., Ванчугова Л.В., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. № 2. С. 292–295.
3. Валуева Т.А., Валуев И.Л., Обыденнова И.В., Валуев Л.И. // Биоорганическая химия. 2010. Т. 36. № 6. С. 769–773.

4. Martinek K., Goldmacher V.S., Klibanov A.M., Berezin I.V. // FEBS Lett. 1975. V. 51. № 1. P. 152–155.
5. Абрамов Л.И., Байдуров Т.А., Григорян Э.П., Зильберман Е.Н., Куренков В.Ф., Мягченков В.А. Полиакриламид, М.: Химия. 1992. 192 с.
6. Schirmer B., Reznicek T., Seifert R., Neumann D. // Biochem. Pharmacol. 2015. V. 98. № 1. P. 102–109.
7. Li J., Yu S., Yao P., Jiang M. // Langmuir. 2008. V. 24. № 7. P. 3486–3492.
8. Назарова О.В., Соловский М.В., Панарин Е.Ф., Алексеева С.В. // Высокомолекулярные соединения. 1989. Т. 31A. № 2. С. 387–396.
9. Reiner R.H., Batz H.G. // Macromol. Chem. 1981. V. 182. № 6. P. 1641–1648.
10. Шур А.М. Высокомолекулярные соединения. М.: Высшая школа. 1981. 657 с.
11. Kakade M.L., Simons N., Liener J.E. // Cereal Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518–526.
12. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964. 719 с.
13. Arond L.H., Fran H.P. // J. Phys. Chem. 1954. V. 58. № 11. P. 953–957.
14. Dickinson R.G., Jacobsen N.W. // J. Soc. Chem. Commun. 1970. V. 64. № 5. P. 1719–1724.
15. Мосолов В.В. // Протеолитические ферменты. М.: Наука. 1971. 404 с.
16. Fairclough R.H., Cantor C.R. // Methods Enzymol. 1978. V. 48. P. 347–379.

Conformation of Polymer-Carrier Macromolecules and Activity of Immobilized Enzyme

I. L. Valuev^{a,*}, L. V. Vanchugova^a, and L. I. Valuev^a

^aTopchiev's Institute of petrochemical synthesis RAS, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Received February 27, 2019; revised June 22, 2019; accepted August 30, 2019

The dependence of the activity of immobilized trypsin on the conformation of the polymer carrier macromolecule was studied. Using fluorescence spectroscopy, it has been shown that immobilization of the enzyme on a rigid polymer chain prevents the association of enzyme molecules and ensures the availability of its active centers even for high-molecular-weight molecules.

Keywords: trypsin, immobilization, dextran, polyacrylamide