

УДК 541.64:547.96

ИЗУЧЕНИЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ МОРИКРАЗЫ

В. Б. Скобелева^{1*}, Г. Н. Руденская¹, Ю. А. Руденская²

¹кафедра высокомолекулярных соединений, кафедра химии природных соединений химического факультета, ²кафедра молекулярной биологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; тел: (095)-939-31-24; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru

Суммарный препарат протеиназ камчатского краба Морикраза иммобилизован на неподвижных полимерных носителях с целью использования для удаления белковых загрязнений при реставрации культурных ценностей. Морикразу сорбировали в сшитом хлориде поли-N,N,N-триметиламиноэтилакрилате, который получали радикальной полимеризацией. 85–96% исходного количества протеиназ оказываются включенными в гель, однако, ферментативная активность составляет от 0,2 до 7% от их активности в водном растворе. Общая ферментативная активность иммобилизованных ферментов возрастает при увеличении площади, доступной для субстрата. Иммобилизованная Морикраза сохраняет 20–33% активности в течение 6 месяцев хранения, в то время как растворы Морикразы за это время полностью инактивируются. Таким образом, в результате иммобилизации ферментов Морикразы в противоположно заряженном сетчатом полиамине ферменты остаются активными и значительно возрастает стабильность ферментов.

Гепатопанкреас камчатского краба *Paralithodes camtschatica* богат протеолитическими ферментами. Ранее нами был выделен [1] и охарактеризован суммарный препарат протеиназ камчатского краба – Морикраза, содержащий коллагенолитическую сериновую протеиназу, трипсин, эластазу, металлопротеиназу, карбоксипептидазу и аминопептидазу. Благодаря совместному действию этих ферментов препарат легко гидролизует коллаген, фибрин, азоказеин и другие белки. Поэтому Морикраза нашла применение в медицине (лечение ожогов, удаление рубцов). Применение препарата возможно также в области реставрации культурных ценностей (удаление белковых загрязнений с картин, рукописей, икон и др.).

Предварительные испытания растворов Морикразы показали, что раствор препарата в водопроводной воде (0,5 мг/мл, рН 7,0) при 20° в течение 1 ч полностью гидролизует осетровый клей, нанесенный слоем в 1 мм на поверхность фильтровальной бумаги. В течение 2 ч в тех же условиях был полностью удален столярный клей, нанесенный между двумя листами фильтровальной бумаги. Бумага после такой обработки и промывания водой стала чистой и белой.

Однако существует проблема, связанная с удалением следов ферментов с поверхности объекта. Поскольку Морикраза является комплексным препаратом, включающим ферменты разных классов, то невозможно подобрать дешевый ингибитор, способный прекратить действие всех протеиназ. Единственный способ – промывание слабо концентрированным раствором соляной или уксусной кислоты, что в ряде случаев недопустимо, так как можно испортить или обесцветить объект реставрации.

Поэтому целью нашей работы стала иммобилизация ферментов морикразы на неподвижных полимерных носителях. Такие носители должны обладать протеолитическим действием при размещении на объекте, а после окончания действия иммобилизованные ферменты могут быть удалены с поверхности объекта вместе с носителем.

Известно [2–6], что равновесно набухшие в воде сетчатые полиэлектролиты способны сорбировать противоположно заряженные белки из водных растворов. Сорбция происходит с поверхности образца геля, при этом образуется слой интерполиэлектролитного комплекса (ИПК) сетчатый полиэлектролит – белок, стабилизированный солевыми связями. Затем этот слой утолщается, и при достаточном количестве белка в растворе весь образец сетчатого полиэлектролита превращается в поликомплекс. Максимальное количество белка, включенного в гель, определяется химической природой реагентов и условиями проведения сорбции (рН и ионная сила среды) и не зависит от соотношения реагентов.

В данной работе мы иммобилизовали морикразу в геле слабосшитого хлорида поли-N,N,N-триметиламиноэтилакрилата.

Материалы и методы

Сшитый хлорид поли-N,N,N-триметиламиноэтилакрилата (СПТМАЭА) получали радикальной полимеризацией. Использовали 80 мас.%-й водный раствор хлорида N,N,N-триметиламиноэтилакрилата (ТМАЭА), полученный в НИИ полимеров им. В.А. Каргина (г. Саратов). Гель СПТМАЭА синтезировали по следующей методике. Водный раствор, содержащий 50 вес.% ТМАЭА, 1,0 мол.%

*Адресат для переписки.

от ТМАЭА бифункционального шивателя, N,N'-метилен-бис-акриламида, продували аргоном в течение 15 мин, затем добавляли по 0,2 вес.% от ТМАЭА персульфата калия и метабисульфита натрия, продували аргоном в течение 10 мин и запаивали в ампулы. Полимеризацию проводили в течение 3 сут при 40°. По окончании полимеризации гель СПТМАЭА отмывали водой до установления постоянной величины набухаемости.

Набухаемость гелей и продуктов завершённых ИПР определяли весовым методом и характеризовали величиной набухаемости

$$H = (m_1 - m_2) / m_2,$$

где m_1 – вес набухшего образца, m_2 – вес сухого образца.

Набухаемость (H) геля СПТМАЭА (рН 7,2) составляет 100.

Протеолитические ферменты Морикразы представляют собой кислые белки с изоэлектрическими точками $pI = 2-4,3$. Содержание в Морикразе трипсина и коллагенолитической сериновой протеиназы составляет 1,8 и 7,9 вес.% соответственно.

Измерение рН растворов производили на рН-метре «РНМ 83 AUTOCAL» («Radiometer», Дания).

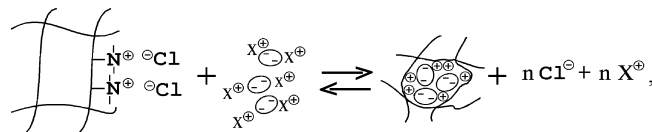
При определении активности ферментов Морикразы использовали реакцию ферментативного гидролиза n -нитроанилидов (для трипсина – $BzArgpNa$ [7], для коллагеназы – $GlpAALpNa$ [8]). Концентрацию n -нитроанилина определяли спектрофотометрически по поглощению растворов при длине волны $\lambda = 410$ нм, молярный коэффициент экстинкции n -нитроанилина $\epsilon = 8900$ л/(моль·см).

Результаты и их обсуждение

При погружении в нейтральные бессолевые растворы Морикразы равновесно набухшего геля СПТМАЭА на поверхности прозрачного геля образуется тонкая матовая пленка поликомплекса, которая с течением времени утолщается. Образец геля при этом уменьшается в объеме и при достаточном количестве белка в окружающем растворе в конечном счете превращается в компактный непрозрачный продукт.

Как и для изученных ранее систем сетчатый полиэлектролит (СПЭ) – белок [2, 4], взаимодействие Морикразы с СПТМАЭА наблюдается лишь при таких значениях рН, когда молекулы ферментов и сетка противоположно заряжены ($pH > pI$). Это означает, что сорбция Морикразы

происходит в результате интерполиэлектролитной реакции (ИПР), сопровождающейся образованием солевых связей между отрицательно заряженными карбоксилатными группами, экспонированными на поверхности глобул ферментов, и положительно заряженными аминогруппами сетки. Эта ИПР представлена на схеме



где для простоты обозначены только избыточные отрицательные заряды фермента, нейтрализованные низкомолекулярными противоионами. В действительности часть отрицательно заряженных групп молекул ферментов может быть включена в цвиттер-ионные пары.

Для изучения активности ферментов, иммобилизованных в результате ИПР в противоположно заряженном сетчатом полиамине, в нейтральный бессолевой водный раствор Морикразы ($V = 5$ мл) погружали равновесно набухший гель СПТМАЭА ($m_r = 0,1-0,7$ г). Ферментативную активность исходного раствора морикразы (U_1), этого раствора после ИПР (U_2), а также активность иммобилизованных в геле ферментов (U_3) рассчитывали по следующим формулам:

$$U_1 (U_2) = \frac{V_{pNA} \cdot A_{410}}{\epsilon \cdot \ell \cdot V_{en} \cdot t} \cdot V,$$

$$U_3 = \frac{V_{pNA} \cdot A_{410}}{\epsilon \cdot \ell \cdot t},$$

где V_{pNA} – объем n -нитроанилина (л); A_{410} – оптическая плотность раствора n -нитроанилина; ϵ – молярный коэффициент поглощения n -нитроанилина при $\lambda = 410$ нм, $\epsilon = 8900$ л/(моль·см); ℓ – длина поглощающего слоя (толщина кюветы спектрофотометра), $\ell = 1$ см; V_{en} – объем аликвоты раствора фермента (мл); t – время реакции ферментативного гидролиза (мин); V – объем раствора Морикразы (мл).

В табл. 1 приведены данные по активности трипсина и коллагеназы в растворах морикразы после проведения ИПР, U_2 , а также относительного понижения активности

Т а б л и ц а 1

Номер образца	$m_r, ^a$	$m_m, ^a$	Трипсин ($BzArgpNa$)		Коллагеназа ($GlpAALpNa$)	
			$U_2 \cdot 10^8$, моль/мин	$(U_1 - U_2) / U_1$, %	$U_2 \cdot 10^8$, моль/мин	$(U_1 - U_2) / U_1$, %
1	0,5137	0,0075	2,91	85	3,60	97
2	0,3752	0,0111	4,02	86	0,82	97
3	0,5134	0,0060	1,81	88	0,21	85
4	0,6698	0,0219	5,82	90	1,25	88
5	0,5744	0,0337	5,03	94	2,36	97
6	0,4203	0,0432	6,21	94	3,46	95
7	0,3204	0,0704	6,92	96	3,62	96

Т а б л и ц а 2

Номер образца	Трипсин (BzArgpNa)			
	S	m_r / m_m	$U_3 \cdot 10^{10}$, моль/мин	$U_3(b) / U_3(a) - 1$, %
1a	исходная	32	2,04	–
1b	увеличенная	32	2,65	30
2a	исходная	16	1,88	–
2b	увеличенная	16	3,01	60
Номер образца	Коллагеназа (GlpAALpNa)			
	S	m_r / m_m	$U_3 \cdot 10^{10}$, моль/мин	$U_3(b) / U_3(a) - 1$, %
3a	исходная	16	1,51	–
3b	увеличенная	16	1,60	6
4a	исходная	16	1,68	–
4b	увеличенная	16	1,81	7,5

растворов $(U_1 - U_2) / U_1$. Высокие значения понижения ферментативной активности растворов после иммобилизации части ферментов в геле свидетельствуют об эффективности иммобилизации ферментов Морикразы в результате ИПР. Как видно из табл. 1, 85–96% исходного количества трипсина и 85–97% исходного количества коллагеназы оказываются включенными в гель. Это соответствует крайне малым равновесным концентрациям Морикразы в окружающем гелевые образцы растворе, что находится в хорошем согласии с данными работы [2] по равновесным концентрациям цитохрома c в его реакции с полиакрилатной сеткой.

Исследование иммобилизованных ферментов показало, что они обладают ферментативной активностью, причем активность иммобилизованного трипсина и коллагеназы составляет соответственно 1,2–7,0 и 0,2–2,7% от их активности в водном растворе.

На рисунке приведена зависимость относительной активности иммобилизованного в геле трипсина, $U_3 / (U_1 - U_2)$,

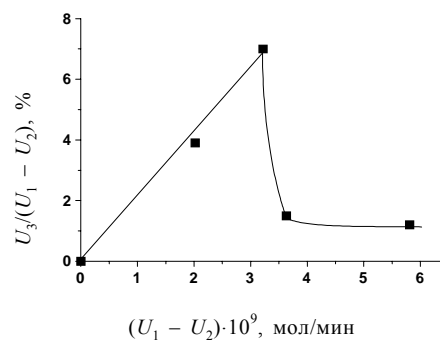
от разности активности раствора трипсина до и после ИПР $(U_1 - U_2)$. Эта зависимость характеризует изменение общей активности иммобилизованного фермента при увеличении его содержания в геле. Как видно из рис. 1, при небольшом содержании фермента в геле наблюдается линейный рост активности при увеличении количества фермента, что очевидно. Однако затем наблюдается снижение общей активности иммобилизованного трипсина при увеличении степени заполнения им геля. Это может быть связано с недоступностью для субстрата фермента, включенного во внутренние слои геля.

С целью проверки этого предположения мы сравнили общую ферментативную активность иммобилизованных трипсина и коллагеназы в образцах гелей, часть из которых после ИПР разрезали на несколько мелких частей с целью увеличения площади поверхности (S), доступной для субстрата. Полученные данные приведены в табл. 2, где показано, что общая ферментативная активность иммобилизованных ферментов возрастает при увеличении площади доступной для субстрата поверхности.

Следовательно, полученные нами невысокие значения ферментативной активности иммобилизованных в гель ферментов Морикразы не являются следствием значительной потери активности ферментов при иммобилизации (хотя некоторое снижение активности происходит), а может объясняться недоступностью значительной части

Т а б л и ц а 3

Трипсин (BzArgpNa)			
Номер образца	$U_3 \cdot 10^{10}$, моль/мин	$U_3 \cdot 10^{10}$, моль/мин	$U_3(6) / U_3(0)$, %
	0 мес	6 мес	
1	7,9	1,5	19
2	6,0	1,2	20
3	7,0	1,5	21
4	6,1	1,3	21
Среднее $U_3(6) / U_3(0)$, %			20
Коллагеназа (GlpAALpNa)			
Номер образца	$U_3 \cdot 10^{10}$, моль/мин	$U_3 \cdot 10^{10}$, моль/мин	$U_3(6) / U_3(0)$, %
	0 мес	6 мес	
5	13,7	3,1	23
6	9,4	3,0	32
7	8,5	3,4	40
8	8,6	3,2	37
Среднее $U_3(6) / U_3(0)$, %			33



Зависимость относительной активности иммобилизованного в геле трипсина, $U_3 / (U_1 - U_2)$, от разности активности раствора трипсина до и после ИПР $(U_1 - U_2)$

фермента, включенного во внутренние слои сетчатого полиэлектролита, для субстрата. Возможно, использование более набухающего в воде геля, а также подбор оптимального соотношения Морикразы и сетчатого полиамиона в ИПР позволит избежать этой проблемы. В табл. 3 приведены данные по активности иммобилизованных в сетку ферментов Морикразы при различном времени инкубирования системы. Как видно из табл. 3, через 6 мес иммобилизованные трипсин и коллагеназа сохраняют соответственно около 20 и 33% своей первоначальной активности. Следует отметить, что нейтральные бессолевыe водные

растворы Морикразы за это время полностью теряют свою активность.

Таким образом, в результате иммобилизации ферментов Морикразы в противоположно заряженном сетчатом полиамине ферменты остаются активными, хотя их активность и снижается, и при этом значительно возрастает стабильность ферментов. Это позволяет считать использованный в работе способ иммобилизации ферментов Морикразы многообещающим для создания композиций, которые могут найти свое применение в области реставрации культурных ценностей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rudenskaya G.N., Isaev V.A., Shmoilov A.M., Karabasova M.A., Shvets S.V., Miroshnikov A.I., Brusov A.B. // *Appl. Biochem. Biotech.* 2000. **84** (in press).
2. Карабанова В.Б., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // *Высокомолекулярное соединение*. 1995. **А37**. С. 1861.
3. Скобелева В.Б., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // *ДАН*. 1996. **347**. С. 207.
4. Скобелева В.Б., Ковригин Д.И., Рогачева В.Б., Зезин А.Б. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 1998. **39**. С. 201.
5. Скобелева В.Б., Зинченко А.В., Рогачева В.Б., Зезин А.Б. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 1998. **39**. С. 268.
6. Скобелева В.Б. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1997.
7. Erlanger V.F., Kokovsky N., Cohen W. // *Arch. Biochem. Biophys.* **95**. P. 271.
8. Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н., Филиппова И.Ю., Маркарян А.Н., Лысогогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия*. 1987. **13**. С. 748.

Поступила в редакцию 20.06.00