

**РОЛЬ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ В СИСТЕМЕ
ПОЛИМЕТАКРИЛОВАЯ КИСЛОТА – ФЕРМЕНТ α -АМИЛАЗА
В ПРОЦЕССЕ КИСЛОТНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ И ЩЕЛОЧНОЙ
РЕНАТУРАЦИИ ФЕРМЕНТА**

*Костарева И. А., Орлиевская Ю. В., Юрченко В. С.,
Пономарева Р. Б., Самсонов Г. В.*

Образование молекулярных комплексов в растворах, содержащих синтетический полиэлектролит и белок, рассматривается в настоящее время как один из эффективных методов модификации белков (ферментов), в том числе их стабилизации в условиях кислотной денатурации [1]. Характер сил, обусловливающих комплексообразование в таких системах, а также структура комплексообразующих компонентов, как известно [2, 3], существенно зависят от кислотности среды. При исследовании влияния полиэлектролита на стабильность белков, очевидно, следует принимать во внимание возможность образования полимерных комплексов с участием не только нативного белка, но и продуктов его денатурации.

В работе исследована роль комплексообразования в водном растворе ПМАК и фермента α -амилазы в процессе кислотной денатурации и щелочной реактивации фермента.

Использовали α -амилазу, выделенную гель-хроматографией из препарата Амилосубтилин Г-10Х ($M=48\,000$, изоэлектрическая точка рН 5,2 [4]). ПМАК получали из очищенного и перегнанного мономера полимеризацией при 60° в среде метилэтилкетона с добавлением ДАК в качестве инициатора. Продукт полимеризации фракционировали методом дробного осаждения из 3–4%-ного раствора полиметакриловой кислоты (ПМАК) в метаноле, осадителем служила смесь этилацетата и уксусной кислоты в объемном соотношении 95 : 5. Полученные фракции переосаждали из метанола и сушили в вакууме при 60° . ММ фракций ПМАК рассчитывали на основании вискозиметрических измерений в 0,002 M HCl при 30° по формуле $[\eta]=6,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л^{0,5} [5]. Использовали образцы ПМАК с $M=1500$, 8200, 24 000, 42 000, 170 000, 300 000.

Комплексные растворы α -амилазы — ПМАК готовили, смешивая равные объемы водных растворов компонентов. Инактивацию проводили при 21° , подкислив раствор до заданного значения рН; процесс обрывалинейтрализацией раствора фосфатным буфером (до рН 6,0). При этом же значении рН определяли амилолитическую активность, используя в качестве субстрата растворимый крахмал [6]; в контрольном измерении установлено, что присутствие ПМАК в реакционной среде не влияет на определение активности. Степень инактивации оценивали как отношение остаточной и начальной активности фермента.

Инактивированный в течение 0,5 ч при рН 2 фермент реактивировали, инкубируя его раствор, подщелоченный до рН в интервале 6–10 при 21° в течение 2 ч. Степень реактивации оценивали как отношение активности в растворе, подвергнутом инактивации (реактивации), к начальной активности.

Как было показано ранее [4], кислотная инактивация α -амилазы при $pH < 5$ протекает с заметной скоростью, описывается кинетическим уравнением первого порядка по ферменту и сопровождается агрегацией белка и выпадением его в осадок, причем именно агрегация обуславливает практическую необратимость процесса принейтрализации раствора фермента до исходного значения рН 6,0. При щелочной реактивации ($pH > 6$) наблюдается частичное или полное растворение осадка, удельная скорость восстановления активности составляет доли процента в минуту и процесс

достигает предела через 1,5–2 ч. В растворе α -амилазы — ПМАК кислотная инактивация фермента также сопровождается его осаждением, а при щелочной реактивации происходит растворение осадка.

На рис. 1 приведены кинетические кривые кислотной инактивации α -амилазы в свободном состоянии и в растворе, содержащем ПМАК. При pH 4 присутствие ПМАК снижает начальную удельную скорость инактивации α -амилазы почти на два порядка; при pH 2 влияние ПМАК выражено слабее: скорость процесса снижается менее чем в 10 раз. Поскольку известно, что в слабокислых растворах поликислоты образуют молекуляр-

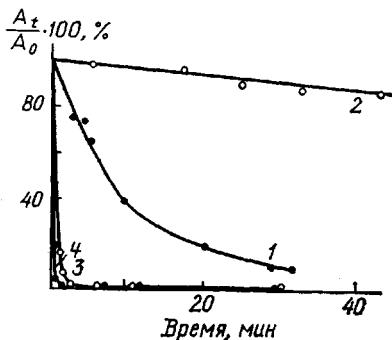


Рис. 1

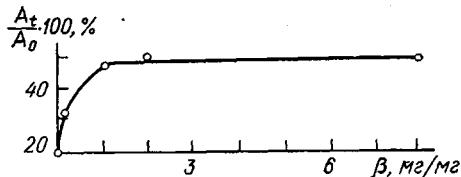


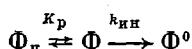
Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые инактивации α -амилазы в свободном (1, 3) и комплексном растворах при соотношении α -амилаза : ПМАК = 0,25 мг/мл : 0,5 мг/мл (2, 4). A_t/A_0 — относительная активность фермента

pH 4,0 (1, 2), pH 2,0 (3, 4).

Рис. 2. Влияние соотношения ПМАК : α -амилаза β на степень реактивации фермента (pH 8,6)

ные комплексы с белками [7], стабилизация α -амилазы в присутствии ПМАК может рассматриваться как результат связывания нативного фермента в полимерный комплекс. В предположении, что комплексообразование — равновесная стадия и что связанный в комплекс фермент практически не инактивируется, процесс может быть представлен схемой



и его удельная скорость выражением

$$v_{\text{уд}} = \frac{k_{\text{ин}}}{K_p + 1},$$

где K_p — константа распределения нативного фермента между связанным в комплекс $\Phi_{\text{п}}$ и свободным Φ состоянием, $k_{\text{ин}}$ — удельная скорость инактивации свободного фермента, Φ^0 — инактивированный фермент.

При таком рассмотрении отношение удельных скоростей процессов инактивации, протекающих в присутствии ПЭ и без него, будет оценивать значение K_p . В исследуемой системе при снижении pH от 4 до 2 K_p уменьшается, по крайней мере, в 10 раз. Ранее подобная зависимость связывания от pH была показана для системы спиртная ПМАК — белок [8]. Максимальное связывание белков, характеризуемых значением $\text{pI} \approx 5$, наблюдается при значении pH близком к pI и уменьшается практически до 0 при сдвиге pH в кислую область на 1,5–2 единицы. Наличие зависимости связывания от кислотности раствора свидетельствует об определяющей роли электростатических взаимодействий в образовании комплексов между нативной α -амилазой и ПМАК.

Исследование реактивации α -амилазы показало, что в инактивированном кислотной комплексом растворе α -амилаза — ПМАК степень восста-

новления активности фермента выше по сравнению с раствором, не содержащим ПМАК. Этот эффект увеличивается с ростом концентрации ПМАК и достигает предела (50%) при весовом отношении компонентов 1:1 (рис. 2). Эффект возрастания степени реактивации α -амилазы в комплексном растворе не зависит от молекулярной массы ПМАК и вместе с тем не наблюдается в присутствии мономера — метакриловой кислоты, что свидетельствует об определяющей роли полимерной структуры ПЭ. На рис. 3 приведены зависимости степени реактивации α -амилазы от pH реактивации. Ход кривых свидетельствует о том, что процесс реактивации связан с ионизацией слабокислых групп фермента, а зависимость разности степеней реактивации α -амилазы в свободном и комплексном растворах от pH раствора показывает, что в последнем случае эффект определяется также и ионизацией ПМАК.

Нужно отметить, что добавление ПМАК после инактивации α -амилазы в реактивационную среду не приводит к увеличению степени восстановления активности фермента. Следовательно, неактивные продукты процесса кислотной денатурации свободной α -амилазы и в присутствии ПМАК различны. Деионизация ПМАК, как известно [9], приводит к усилению гидрофобных взаимодействий, с другой стороны, кислотная денатурация белка сопровождается экспонированием в раствор гидрофобных аминокислотных остатков, что является причиной агрегации [10].

Можно предположить, что при действии кислоты на смешанный раствор α -амилаза — ПМАК межмолекулярное гидрофобное взаимодействие приводит к соагрегации деионизованной ПМАК и денатурированного фермента. Это, в свою очередь, уменьшает вероятность агрегации α -амилазы, вследствие чего возрастает степень обратимости процесса ее реактивации в щелочном растворе. Такое предположение согласуется с результатом сравнительного гель-хроматографического анализа фермента, подвергнутого двухстадийному процессу инактивации (pH 2) — реактивации (pH 8,6) в присутствии и в отсутствие ПМАК. Гель-хроматографию проводили на колонке с сефарозой 6 В; в выходном растворе определяли концентрацию белка по методу Лоури и амилолитическую активность [11]. Хроматограммы для раствора фермента в отсутствие и присутствии ПМАК существенно различны (рис. 4). В первом случае наблюдали два пика: один (ферментативно активный) выходит с объемом выхода нативного фермента; второй (неактивный) выходит с исключенным объемом колонки, соответствующим $M \sim 2 \cdot 10^6$. Очевидно, неактивный компонент представляет собой высокомолекулярные агрегаты денатурированной α -амилазы, неразрушающиеся при ее реактивации в щелочном растворе. Во втором случае наблюдается один несимметричный пик с неактивным левым плечом. Площадь, ограниченная кривой активности, существенно больше, чем на хроматограмме для свободного раствора. Из сравнения хроматограмм очевидно, что присутствие ПМАК в растворе α -амилазы при ее кислотной денатурации снижает образование высокомолекулярных агрегатов фермента, которые не могли бы быть разрушены в процессе щелочной ренатурации.

Полагая, что агрегация денатурированного белка происходит как последовательное присоединение белковых макромолекул друг к другу вплоть до образования коагулята, общую схему процессов, происходящих при кислотной инактивации α -амилазы в присутствии ПМАК, можно представить

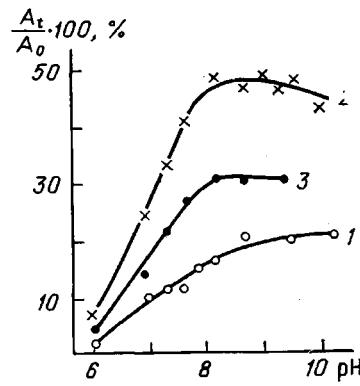
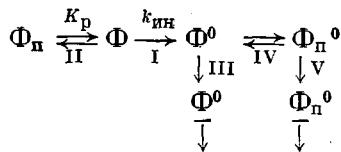


Рис. 3. Зависимость степени реактивации α -амилазы от pH без ПМАК (1) и с ПМАК (2), 3 — разностная кривая

в следующем виде:



В отсутствие ПМАК протекают только процессы инактивации и, возможно, частичной агрегации фермента (I) и последующие стадии агрегации неактивного фермента вплоть до образования коагулятов (III). В присутствии ПМАК в слабокислых растворах (рН 4,0) в результате элек-

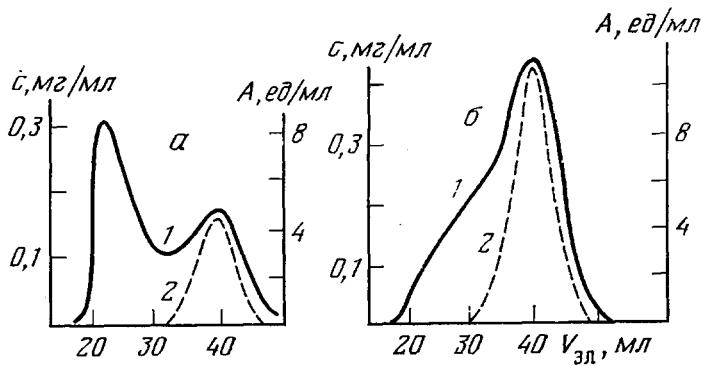


Рис. 4. Гель-хроматограмма для α -амилазы, подвергнутой инактивации – реактивации в отсутствие (а) и присутствии ПМАК (б). 1 – концентрация белка, определенная по оптической плотности раствора при 280 нм, 2 – амилолитическая активность

тростатического взаимодействия происходит образование полимерного комплекса фермента (II), что тормозит денатурационный процесс. В сильнокислых растворах (рН 2), где ионизация ПМАК полностью подавлена, электростатическое взаимодействие маловероятно и в основном проходит гидрофобное связывание ПМАК с инактивированным ферментом (IV) и последующая их соагрегация и коагуляция (V).

Таким образом, комплексообразование в растворах полиэлектролита и фермента в условиях необратимой денатурации последнего может происходить как с участием нативного фермента, что приводит к торможению процесса, так и с участием продукта одной из стадий денатурации, что изменяет дальнейший ход процесса и может способствовать его обратимости. При этом влияние кислотности на процесс денатурации и ренатурации в значительной мере обусловлено конформационным переходом ПМАК с изменением степени ее ионизации.

ЛИТЕРАТУРА

- Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1979, т. 21, № 4, с. 723.
- Кабанов В. А., Мустафаев М. Н., Белова В. В., Евданов В. П. Биофизика, 1978, т. 23, № 5, с. 789.
- Кольцова С. В., Илларионова Н. Г., Панарин Е. Ф., Рудковская Г. Д., Самсонов Г. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 3, с. 643.
- Костареева И. А., Орлиевская О. В., Юрченко В. С., Пономарева Р. Б., Самсонов Г. В. Прикл. биохим. и микробиол., 1981, т. 17, № 3, с. 430.
- Kathalsky A., Eisenberg H. J. Polymer Sci., 1951, v. 6, № 2, p. 145.
- Ружглядева Л. Г., Горячева Н. Г. Ферментативная и спиртовая пром-сть, 1966, № 1, с. 9.
- Morawetz H., Hughes L. W. J. Phys. Chem., 1952, v. 56, № 1, p. 64.
- Шатаева Л. К., Орлиевская О. В., Джмухадзе Ц. Н., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. Б, 1975, т. 17, № 10, с. 735.

9. Бирштейн Т. М., Ануфриева Е. В., Некрасова Т. Н., Птицын О. Б. Шевелева Т. В. Высокомолек. соед., 1965, т. 7, № 1, с. 372.
10. Максимов В. А. Успехи биол. химии, 1970, т. 11, с. 107.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. H., Randall R. I. G. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
4.V.1982

УДК 541.64:547 (391.1+538.14)

ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА СПИВАЮЩЕГО АГЕНТА НА МОРФОЛОГИЮ СОПОЛИМЕРОВ АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ДИВИНИЛБЕНЗОЛА

*Радзяевич Ю. И., Шатаева Л. К., Крылова В. В.,
Чернова И. А., Жукова Н. Г., Самсонов Г. В.,
Ласкорин Б. Н.*

В связи с широким использованием пористых ионообменных материалов пристальное внимание исследователей сосредоточено на закономерностях формирования неоднородных сетчатых структур полиэлектролитов. Механизм образования пористых структур стирол-дивинилбензольного типа определяется, главным образом, природой разбавителя (порообразователя), тогда как спивающий агент обеспечивает устойчивость сформированной пористой структуры по отношению к смене или удалению растворителя [1, 2]. Механизм образования пористых структур на основе гибкоцепных полимеров (например, сополимеров акриловой или метакриловой кислот), спиваемых дивинильным или тривинильным спивающим агентом, зависит не только от природы растворителя, но и от количества спивающего агента в системе [3, 4]. При этом существенную роль, по-видимому, играет циклизация цепей уже на начальных стадиях реакции, что повышает неоднородность системы при низких степенях конверсии [5]. При средних и высоких концентрациях спивающего агента такая циклизация создает спитые гелевые компактные микроглобулы, имеющие на поверхности подвешенные двойные связи, которые на последующих этапах обеспечивают спивание между глобулами и образование разреженных участков полиэлектролитной сетки.

Из литературы известно также, что пористые сополимеры глицидилметакрилата и этилендиметакрилата имеют на поверхности гранулы различимую уплотненную оболочку [6]. Образование этой оболочки было приписано радиальным силам, возникающим из-за поверхностного натяжения на границе формирующейся гранулы. Аналогичное наблюдение было сделано при исследовании морфологии карбоксильного катионита КМ-2п в нашей предыдущей работе [7].

В настоящей работе исследовано влияние количества спивающего агента на степень неоднородности пористой структуры на примере карбоксильного катионита СГК-7 — сополимера акриловой кислоты (АК) и дивинилбензола (ДВБ). При этом обращено внимание на характер поверхности пленки на гранулах катионита.

Карбоксильный катионит СГК-7 получали гранульной сополимеризацией АК и ДВБ в присутствии этилбензола. Полимеризацию инициировали перекисью бензоила. Дисперсионной средой служил водный раствор, содержащий 25% хлорида натрия и 1% крахмала. Сополимеризацию проводили при 85° в течение 2,5 ч, затем температуру повышали до 95° и выдерживали при этой температуре еще 2 ч. Этилбензол удаляли из сополимера отгонкой его азеотропной смеси с водой. Сополимер получали в виде сферических белых гранул.

Для исследования выбрали образцы, содержащие 10, 15, 20 и 30 вес.% ДВБ, а также образец карбоксильного катионита СГК-7а, полученного гранульной сополимеризацией АК и ДВБ в присутствии активного растворителя.