



УДК 577.152.02

КООРДИНАЦИОННО-ИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

I. СВЯЗЫВАНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНАМИДОГИДРОЛАЗЫ ЧЕРЕЗ КОМПЛЕКСЫ МЕДИ

Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А.

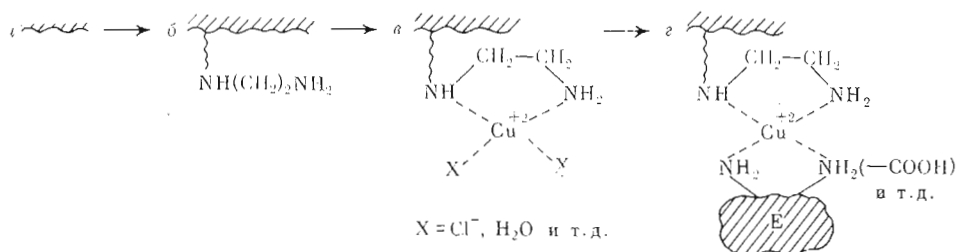
Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва

На примере пенициллинамидогидролазы исследован координационно-ионный метод иммобилизации ферментов через комплексы меди (II). В основе метода лежит образование смешанного комплекса фермента и хелатирующей группировки стационарного лиганда полимерного носителя с ионами металла. В качестве стационарных лигандов использованы остатки этилендиамина, диэтилентриамина и триэтилентетраамина, в качестве носителей — силорены, полистиролы различной структуры, полиакриламид, гели на основе поливинилового спирта. Субстратом служил *N*-фенацетил-*D*, *L*-фенилглицин.

Настоящая работа открывает серию сообщений, демонстрирующих возможности координационно-ионного связывания ферментов на разнообразных носителях. В основе процесса координационно-ионной иммобилизации лежит образование смешанного комплекса фермента и хелатирующей группировки стационарного лиганда полимерного носителя с ионами металла [1, 2].

В данной работе в качестве стационарных би-, три- и тетраденатных лигандов нами использованы соответственно остатки этилендиамина, диэтилентриамина и триэтилентетраамина, а в качестве металла-комплексобразователя — ион Cu^{2+} , имеющий координационное число 4 и образующий прочные комплексы с аминами. На носителях различной природы, содержащих указанные лиганды, проведена иммобилизация пенициллинамидогидролазы (КФ 3.5.1.11).

Для осуществления процесса иммобилизации полимерный носитель, имеющий склонные к комплексообразованию аминные группировки и заряженный ионами металла, обрабатывается раствором фермента. При этом происходит замена части лигандирующих атомов координационной сферы иона металла на функциональные группы фермента, способные к координации:



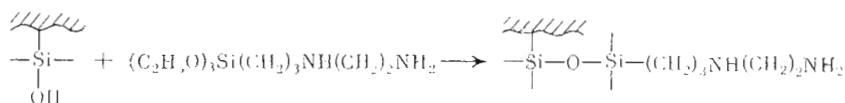
a — полимер-носитель, *b* — модифицированный носитель, *г* — комплекс с Cu^{2+} , *г* — иммобилизованный фермент.

В качестве субстрата использовался *N*-фенацетил-*D,L*-фенилглицин. Показано, что пенициллин-амидогидролаза способна энантиоселективно гидролизовать данный субстрат с образованием *L*-фенилглицина, в то время как *N*-фенацетил-*D*-фенилглицин данным ферментом не расщепляется [2–5].

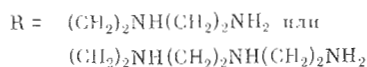
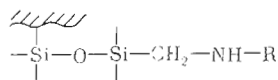
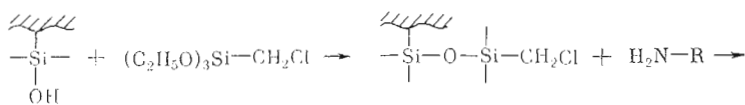
Активность и энантиоселективность действия пенициллин-амидогидролазы определяли поляриметрическим методом [5] с помощью проточной поляриметрической кюветы, соединенной в замкнутый цикл с реактором, в котором проводился гидролиз 0,01 М раствора субстрата. Активность фермента рассчитывали из наклона прямолинейного участка кинетических кривых гидролиза, полученных этим методом, и выражали в ммольх *L*-фенилглицина, образующегося под действием 1 мг иммобилизованного белка или белка в растворе в течение 1 ч. Ранее были найдены оптимальные условия для проведения данной реакции [5].

Для иммобилизации пенициллин-амидогидролазы нами был синтезирован ряд нерастворимых носителей, содержащих диамино-, триамино- и тетрааминсодержащие стационарные лиганды, на основе как неорганического носителя («силохром»), так и органических полимеров (полистирол, полиакриламид, поливиниловый спирт).

Образец «силохрома» имел внутреннюю поверхность 73 м²/г и средний диаметр пор 630 Å. Введение группировок этилендиамина осуществляли обработкой γ -*N*-(β -аминоэтил)аминопропилтриэтоксисиланом в условиях, аналогичных аминированию силохрома γ -аминопропилтриэтоксисиланом [6].



Для введения остатков диэтилентриамина и триэтилентетраамина силохром предварительно обрабатывали хлорметилтриэтоксисиланом и далее проводили реакцию аминирования хлорметилсилохрома по хлорметильным группам:

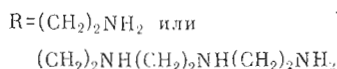
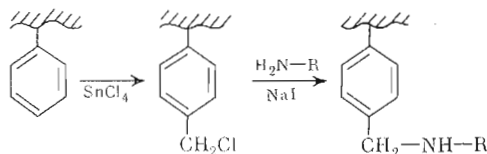


При данном способе аминирования возможно присоединение аминов как по первичным, так и по вторичным аминогруппам, что, однако, не должно оказывать существенного влияния на комплексообразующие свойства стационарных лигандов.

В качестве полистирольных каркасов нами были исследованы: а) макропористый полистирольный анионит АН-221 с остатками этилендиамина, содержащий 4% *n*-дивинилбензола и обладающий внутренней поверхностью 37 м²/г со средним диаметром пор 650 Å; б) макропористый полистирол, полученный нами эмульсионной сополимеризацией стирола с 25% дивинилбензола в присутствии осадителя. Величина внутренней поверхности, определенная сорбцией аргона, составляет 130 м²/г, диаметр пор ~1000 Å; в) изопористый полистирол, полученный сшиванием поли-

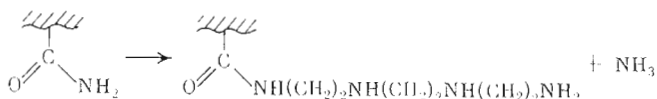
стирола в дихлорэтано 7 мол. % *n*-ксилилендихлорида [7] и не обладающий пористостью в сухом состоянии; г) гетеропористый полистирол, сшитый 40 мол. % моноклордиметилового эфира в присутствии 40% (по объему) порообразователя [8], с поверхностью ~500 м²/г и крупными порами диаметром ~10⁴ Å.

Все полистирольные носители, кроме АН-224, подвергались хлорметилированию моноклордиметилловым эфиром и последующему аминированию в одинаковых условиях:

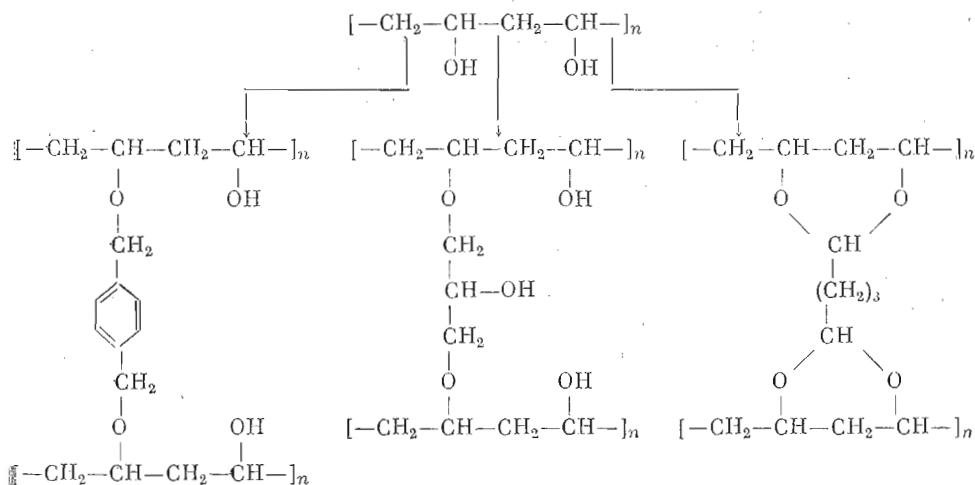


Как и в случае хлорметилировавшего силохрома, присоединение триэтилентетрамина может происходить по первичным и вторичным аминогруппам. Для уменьшения доли процесса сшивания полистирольных цепей в реакции аминирования использовались большие избытки амина по отношению к хлорметильным группам.

Сшитый полиакриламидный гель «акрилекс Р-60» модифицировали триэтилентетрамином реакцией переамидирования аналогично [9].

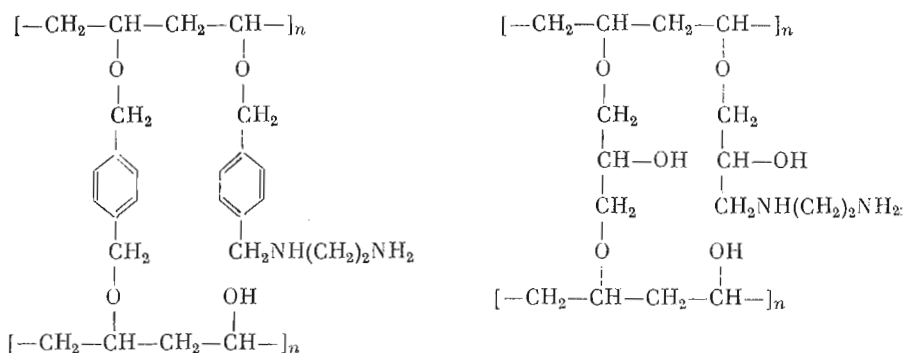


В качестве сшивающих агентов для получения гидрофильных гелей на основе поливинилового спирта использовали *n*-ксилилендихлорид и эпихлоргидрин при проведении реакции в щелочной среде [10] и глутаровый диальдегид — в кислой среде, аналогично работе [11].

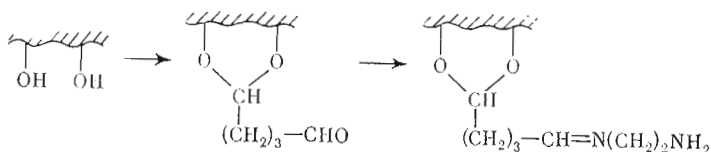


Последующее введение лигандов в подобные носители осуществлялось при этом тремя способами:

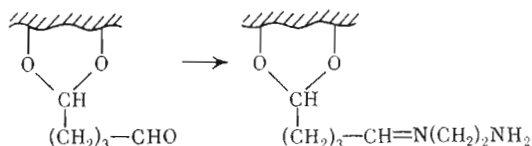
а) добавлением амина в реакционную смесь при получении геля в щелочной среде с образованием следующих структур:



б) обработкой полученных гелей избытком глутарового диальдегида в кислой среде и далее соответствующим амином с образованием основания Шиффа:



в) для носителей на основе поливинилового спирта, сшитых избытком глутарового диальдегида, непосредственной обработкой их соответствующим амином:



Таким образом, был получен широкий набор полимеров различной природы и структуры, которые исследовали далее в качестве носителей для координационно-ионной иммобилизации пенициллинамидагидролазы.

Для получения комплекса стационарного лиганда с ионом меди носители обрабатывали избытком 0,2 М тетрааммиаката хлорной меди.

В таблице приведены основные характеристики синтезированных носителей.

Сравнение содержания стационарных лигандов на силохромах (образцы 1–3) в ряду этилендиамин – диэтилентриамин – триэтилентетраамин свидетельствует о том, что двухстадийный способ модификации носителя в последних двух случаях оказывается предпочтительным по отношению к прямому введению остатков этилендиамина. Относительно низкое содержание стационарных лигандов во всех образцах силохромов и жесткая структура неорганической подложки приводят к образованию во всех трех случаях стационарного комплекса с медью состава 1:1 независимо от типа лиганда.

Как видно из таблицы, наибольшее количество стационарных лигандов вводится в полистирольные носители типа 5–8. Взаимодействие их с ионами Cu^{2+} приводит во всех случаях к образованию комплексов состава 2:1, что связано как с большим содержанием стационарных лигандов, так и с большей подвижностью полистирольных цепей носителя.

Характеристики синтезированных носителей и свойства иммобилизованной на них пенициллинамидогидролазы

Тип носителя	Носитель	Стационарный тип ^{1*}	Содержание лиганда, ммоль/г носителя	Содержание Cu, ммоль/г носителя	Соотношение стационарных лигандов Cu	Степень набухания, %	Содержание пенициллинамидогидролазы ^{2*} , мг белка/г носителя	Связывание белка, %	Эффективность связывания белка (2+), мг белка/ммоль	Эффективность связывания белка (1+), мг белка/ммоль	Активность фермента, ммоль субстрата/л носителя	Активность фермента, ммоль субстрата/мл белка	Сохранение активности фермента в процессе иммобилизации, %
1	Силохром	I	0,10	0,10	1:1	0	30	75	300	300	3000	100	25
2	»	II	0,25	0,28	0,9:1	0	47	43	60	68	2100	123	27
3	»	III	0,35	0,35	1:1	0	40	25	25	25	3300	330	75
4	Полистирол	I	0,91	0,32	2,7:1	0	9	22	27	40	420	47	40
5	макропористый АН-221	I	0,50	0,27	1,9:1	0	22	55	81	44	1900	85	19
6	макропористый сополимер с дивинилбензолом (25%)	I	0,50	0,22	2,3:1	50	0	0	-	-	-	-	-
7	изопористый гетеропористый	I	0,93	0,40	2,3:1	120	17	43	42	18	6000	350	78
8	гетеропористый	III	0,90	0,42	2,1:1	80	26	65	62	29	1500	58	13
9	Акрилекс Р-60	III	0,18	0,19	1:1	1000	8	20	42	39	2400	300	67
10	Поливиниловый спирт ^{4*}	I	0,20	0,21	1:1	520	4	40	19	20	500	125	28
11	n-ксилилендихлорид	I	0,30	0,47	0,6:1	550	3	8	6	10	1200	400	89
12	эпихлоргидрин	I	0,16	0,21	0,8:1	400	5	12	31	24	400	80	18
13	n-ксилилендихлорид и глутаровый диальдегид	I	0,40	0,24	1,7:1	550	4	10	17	10	1400	350	78

^{1*} I — этилендиамин, II — диэтилентриамин, III — триэтилтетраамин.

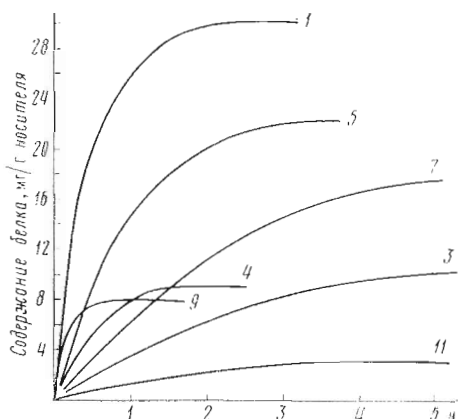
^{2*} Белок определен по Лоури.

^{3*} Исходная активность 400 ммоль субстрата/мг белка·ч.

^{4*} Ниже приведен реагент, использованный для шивки цепей поливинилового спирта.

Несмотря на резкое различие в надмолекулярной структуре полистирольных каркасов носителей, содержание на них стационарных лигандов и Cu^{2+} различается не более чем в 2 раза; по-видимому, полимерные цепи этих образцов в равной степени доступны для низкомолекулярных аминов и ионов металла. Модификация гетеропоρισтого полистирола триэтилентетраамином приводит к некоторому уменьшению набухаемости носителя по сравнению с этилендиаминным аналогом, что связано с большей вероятностью образования дополнительных сшивок при реакции аминирования тетрафункциональными молекулами триэтилентетраамина.

Носители на основе поливинилового спирта и модифицированный полиакриламид «акрилекс Р-60» обладают высокой набухаемостью в воде по сравнению с другими носителями, несмотря на меньшее содержание



Кинетика связывания пенициллинамидогидролазы носителями различных типов (количество белка на носителе определено УФ-спектрофотометрией равновесного раствора). Обозначение кривых соответствует типу системы (см. таблицу)

лигандов. Это приводит к образованию комплексов стационарный лиганд — ион металла состава 1 : 1 и менее. Последнее обстоятельство связано с возможностью образования достаточно прочных комплексов Cu^{2+} с гидроксильными группами цепей поливинилового спирта. Лишь в случае носителя типа 13, модифицированного большим количеством глutarового альдегида, значительная доля комплексов имеет состав 2 : 1, так как количество гидроксильных групп здесь существенно понижено, а концентрация стационарных лигандов достаточно высока.

Иммобилизацию пенициллинамидогидролазы на всех приведенных в таблице носителях проводили в стандартных условиях (см. «Экспериментальную часть»), чтобы иметь возможность изучить влияние свойств носителей на активность полученного иммобилизованного препарата и сохранение активности фермента в процессе иммобилизации. Контроль за ходом иммобилизации осуществляли параллельно тремя методами: а) УФ-спектроскопией растворов фермента; б) определением содержания белка на носителях по методу Лоури; в) определением остаточной активности фермента в растворе.

Методом УФ-спектроскопии для ряда носителей была изучена кинетика присоединения пенициллинамидогидролазы, представленная на рисунке. Видно, что, несмотря на резкое различие свойств носителей, иммобилизация фермента через комплексы Cu^{2+} протекает однотипно и равновесная концентрация белка достигается достаточно быстро.

Для оценки десорбции иммобилизованного фермента с носителя препараты инкубировали при 20° в 1 М хлористом натрии и определяли содержание белка в растворе с помощью УФ-спектроскопии. Показано, что в этих условиях перехода фермента в раствор практически не наблюдается. Напротив, при полном связывании пенициллинамидогидролазы на тех же носителях, но не содержащих Cu^{2+} , десорбция фермента в аналогичных условиях происходит быстро и практически количественно. Кроме того,

сорбированный в таких условиях фермент почти не проявляет гидролазной активности.

Содержание пенициллинамидогидролазы на носителях, определенное методом Лоури и по остаточной активности раствора фермента, оказалось в ряде случаев в 1,5–2 раза выше, чем при контроле белка в равновесном растворе с помощью УФ-спектроскопии (например, для носителей типа 1, 3, 4, 7). Это может объясняться либо инактивацией фермента за счет автолиза в растворе в процессе иммобилизации, либо избирательностью его связывания в комплекс по сравнению с балластными белками и другими УФ-поглощающими примесями, составляющими по весу 60% используемого нами препарата. Если второй фактор является преобладающим, то предлагаемый нами способ связывания белков может найти применение для селективной иммобилизации ферментов, в частности металл-зависимых ферментов, а также для выделения их из смесей с другими белками.

В процессе иммобилизации пенициллинамидогидролазы на носителях типа 12 и 13 небольшая часть (10–20%) ионов Cu^{2+} переходит в раствор за счет образования комплекса Cu^{2+} с белком вследствие низкой прочности стационарного комплекса в случае присоединения этилендиамина к носителям через основание Шиффа с глутаровым альдегидом. Однако переход Cu^{2+} в раствор фермента не приводит к его инактивации, что доказано полным сохранением активности растворимого фермента в присутствии Cu^{2+} в эквимолярном количестве по отношению к субстрату.

Процент сохранения активности пенициллинамидогидролазы при иммобилизации рассчитывали как отношение активности связанного белка к активности такого же количества белка в растворимом состоянии.

Как видно из таблицы, для носителей на основе силохрома в ряду би-, три- и тетраденатных лигандов содержание белка монотонно убывает, что связано с затруднением вхождения функциональных групп фермента в координационную сферу Cu^{2+} . В этом же направлении уменьшается и эффективность Cu^{2+} и лигандов в процессе связывания белка, определяемая как отношение количества связанного белка к содержанию Cu^{2+} или лиганда на носителе. Однако удельная активность иммобилизованного фермента при переходе от этилендиамина к триэтилентетрамину возрастает второе, что приводит к приблизительно одинаковой общей активности этих препаратов. С точки зрения полноты использования активности нативного фермента наиболее удачным представляется носитель типа 3.

Сравнение свойств препаратов пенициллинамидогидролазы, иммобилизованной на полистирольных носителях, показало, что структура полистирольного каркаса оказывает существенное влияние как на общую активность препарата, так и на сохранение его активности при иммобилизации. Так, изопористый полистирол, широко используемый в качестве сорбента в хроматографических процессах, оказался непригодным для иммобилизации данным методом из-за отсутствия в нем крупных пор. Переход от макропористого полистирола, содержащего 4% дивинилбензола, к синтезированному нами макропористому носителю с 25% дивинилбензола позволил повысить вдвое количество связанного белка и процент сохранения активности, что дает пятикратное увеличение общей активности фермента в иммобилизованном виде. Видно, что увеличение содержания дивинилбензола в макропористых полистиролах, полученных эмульсионным методом, приводит к большей гетерогенности носителей и увеличению количества крупных пор, что позволяет молекуле фермента располагаться «удобным» для нее образом и сохранять при иммобилизации высокий процент активности.

Применение гетеропористых полистирольных каркасов позволяет увеличить общую активность препаратов при высокой удельной активности, так как очень крупные поры, образуемые наполнителем при синтезе каркаса, способствуют сохранению нативной конфигурации фермента при

связывании. Кроме того, хорошая проницаемость гетеропористых носителей обеспечивает быстрый транспорт субстрата и продуктов реакций внутри гранул носителя. Этим, по-видимому, также объясняется высокая активность препаратов такого рода. В то же время часть стационарных лигандов оказывается недоступной для молекул фермента, о чем свидетельствует пониженная эффективность связывания белка Cu^{2+} и остатками этилендиамина по сравнению с носителем типа 5.

В случае гетеропористых полистирольных каркасов переход от этилендиамина к триэтилететраамину, практически не изменяя содержания лиганда, металла и стехиометрии стационарного комплекса, приводит к повышению связыванию фермента на носителе, которое, однако, сопровождается резким падением его удельной активности. Таким образом, наиболее перспективным в ряду исследованных полистирольных носителей представляется гетеропористый полистирол, модифицированный группировками этилендиамина. Интересно, что применение данного гидрофобного по своей природе носителя приводит к увеличению общей активности препарата иммобилизованного фермента, вдвое превышающей активность аналогичных препаратов на гидрофильных силохромах.

«Акрилекс Р-60», модифицированный триэтилететраамином (как и следует ожидать, исходя из небольшого содержания лиганда и высокой набухаемости), образует стационарный комплекс состава 1 : 1. Небольшое содержание белка не позволило получить высокую общую активность связанного фермента, несмотря на высокий процент сохранения активности.

Из таблицы видно, что носители на основе поливинилового спирта связывают меньшее количество белка по сравнению с силохромами и полистиролами. Наиболее перспективными среди них представляются образцы типа 11 и 13, обладающие высоким процентом сохранения активности. Очевидно, из трех использованных нами сшивающих агентов *m*-ксилилендихлорид наименее удобен.

Исследование стабильности образцов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы проводили инкубацией их в растворе субстрата (рН 8) при 25 и 50°. Инактивация связанного таким образом фермента может происходить за счет инактивации как иммобилизованного белка, так и белка, частично переходящего с носителя в раствор. Последнее обстоятельство связано с тем, что образующийся при гидролизе *L*-фенилглицин способен к координации с Cu^{2+} . При длительной инкубации это может приводить к перераспределению Cu^{2+} и фермента между носителем и раствором гидролизата и в свою очередь к падению общей активности образцов. Оказалось, что образцы фермента, связанного с силохромом и полистиролом, выдерживают инкубацию при 25° в течение суток без падения активности. Образцы на основе поливинилового спирта при этих условиях за 2 сут теряют до 3% активности. Однако при 50° иммобилизованные ферменты на силохромах и полистиролах имеют период полуйнактивации от 1 до 1,5 ч, причем стабильность возрастает при переходе от би- к тетраденатным стационарным лигандам, а в случае иммобилизации на гелях на основе поливинилового спирта в этих же условиях период полуйнактивации составляет 3—5 ч. Таким образом, термостабильность связанной гидролазы в последнем случае выше, чем для силохромов и полистиролов, по-видимому, благодаря гидрофильности цепей поливинилового спирта. Из исследованных гелей на его основе в этом плане наилучшими характеристиками обладает образец типа 13, сшитый глутаровым диальдегидом.

В заключение можно отметить, что предложенный координационный метод иммобилизации пенициллинамидогидролазы в ряде случаев позволяет получить образцы связанного фермента, не уступающие по активности соответствующим препаратам, полученным другими методами иммобилизации. Важным достоинством метода следует считать возможность легкой десорбции инактивированного фермента (например, обработкой растворами кислот) с последующим многократным использованием носителя.

Экспериментальная часть

Препарат пенициллинамидогидролазы, содержащий 40% белка, предоставлен Всесоюзным научно-исследовательским институтом антибиотиков (активность [5] 440 мкмоль субстрата/мг белка · ч).

Содержание стационарных лигандов в синтезированных носителях определяли титрованием хлоргидратов аминов щелочью. Содержание меди определяли после разрушения комплексов и элюции ионов Cu^{2+} с носителя 1 н. HCl комплексометрическим титрованием или спектрофотометрически.

γ -N-(β -Аминоэтил)-аминопропилсилохром получен реакцией силохрома с γ -N-(β -аминоэтил)-аминопропилтриэтоксисилопаном аналогично [6].

Хлорметилсилохром получен обработкой силохрома хлорметилтриэтоксисилопаном аналогично [6]. Содержание хлорметильных групп — 0,51 ммоль на 1 г носителя.

Диэтилентриаминометилсилохром. Раствор 10 мл диэтилентриамина в 10 мл диоксана смешивали с 5 г хлорметилсилохрома, добавляли каталитическое количество NaI и нагревали при перемешивании 10 ч при 95°. Носитель отфильтровывали, промывали диоксаном и этанолом и высушивали на фильтре.

Триэтилентетрааминометилсилохром получен аналогично диэтилентриаминометилсилохрому.

Макропористый сополимер стирола с дивинилбензолом. К 50 г смеси мономеров, состоящей из 25% *n*-дивинилбензола, 25% *n*-винилэтилстирола и 50% стирола, добавляли 75 г смеси органических растворителей, состоящей из 14% мезитилена, 43% изоамилового спирта и 43% додекана, прибавляли в качестве инициатора 250 мг азодиизобутиронитрила и органическую фазу вливали в 1,5 л воды, содержащей в качестве эмульгатора 15 г водорастворимого крахмала. Интенсивным перемешиванием переводили органическую фазу в эмульсию с размером капель не более 0,5 мм и перемешивали 15 ч при 80°. Суспензию выливали в 10 л воды и сополимер многократно промывали декантированием. Остатки стирола и дивинилбензола удаляли отгонкой с паром, после чего полимер промывали водой, этанолом, гексаном и ацетоном, сушили в вакууме при 60° и фракционировали на ситах. Выход 40 г.

Изопористый полистирол получен сшиванием полистирола с M 290 000 7 мол. % *n*-ксилилендихлорида аналогично [7].

Гетеропористый полистирол получен сшиванием полистирола в дихлорэтане 40 мол. % монохлордиметилового эфира в присутствии 40% (по объему) инертного разбавителя [8].

Хлорметилирование полистирольных носителей проводили согласно [8]. Содержание Cl в носителях (%): макропористый сополимер стирола с дивинилбензолом — 12, изопористый полистирол — 19, гетеропористый полистирол — 15.

*Аминирование *n*-хлорметилполистиролов.* К суспензии 5 г хлорметилированного полистирола в 25 мл смеси диоксан — метанол, 6 : 1 (по объему), добавляли каталитическое количество NaI и 3,6 мл этилендиамина (или соответственно 25 мл триэтилентетраамина), нагревали 8 ч при перемешивании при 80°. Полимер отфильтровывали и промывали диоксаном, водой, метанолом и сушили на фильтре. Содержание лигандов для полистиролов различной структуры приведено в таблице.

Аминирование «Акрилекса Р-60». Модификацию акрилекса триэтилентетраамином проводили аналогично [9].

*Сшивание поливинилового спирта *n*-ксилилендихлоридом.* Растворяли 20 г поливинилового спирта ($M \sim 20$ 000) при 80° в 100 мл воды и перемешивали при 80° в течение 2 ч, затем последовательно добавляли по каплям при 60° при интенсивном перемешивании раствор 4,5 г NaOH в 100 мл воды и 11 г тонкоизмельченного ксилилендихлорида и смесь пе-

ремешивали при 60° до начала гелеобразования. Мешалку останавливали, температуру повышали до 90° и выдерживали блок геля при этой температуре 5 ч. Блок геля измельчали, промывали на фильтре водой, этанолом, ацетоном и сушили в вакууме при 60°. Высушенный гель измельчали в мельнице и фракционировали, отбирая фракцию 0,1--0,2 мм. Выход 17,0 г (64%).

Сшивание поливинилового спирта п-ксилилендихлоридом с одновременным введением остатков этилендиамина. Раствор 1 г полихлорвинилового спирта в смеси 10 мл воды и 10 мл диоксана перемешивали при 95° 2 ч, затем последовательно добавляли раствор 0,2 г NaOH в 4 мл воды при 95°, 0,5 г тонкоизмельченного ксилилендихлорида при интенсивном перемешивании и через 10 мин 0,2 мл этилендиамина. Смесь перемешивали 15 мин до начала гелеобразования и выдерживали далее без перемешивания еще 5 ч при 95°. Блок геля измельчали, промывали на фильтре водой, этанолом, ацетоном и сушили в вакууме при 60°. Высушенный гель измельчали в мельнице и фракционировали, отбирая фракцию 0,1--0,2 мм. Выход 1,1 г (65%).

Сшивание поливинилового спирта эпихлоргидрином. Раствор 10 г поливинилового спирта в 30 мг воды, полученного при 97°, перемешивали при этой температуре 2 ч, затем добавляли раствор 5 г NaOH в 10 мл воды при интенсивном перемешивании в течение 30 мин. Температуру понижали до 70° и приливали 10 мл эпихлоргидрина, перемешивали до начала гелеобразования, мешалку останавливали и нагревали 3 ч при 70°. Блок геля измельчали, промывали водой, этанолом, ацетоном и сушили в вакууме при 60°. Высушенный гель измельчали в мельнице и фракционировали, отбирая фракцию 0,1--0,2 мм. Выход 12,8 г (58%).

Сшивание поливинилового спирта эпихлоргидрином с одновременным введением этилендиамина. Раствор 2 г поливинилового спирта в 15 мл воды, полученного при 95°, перемешивали 2 ч, охлаждали до 60°, добавляли раствор 1 г NaOH в 10 мл воды, через 1 ч приливали 2 мл эпихлоргидрина и через 10 мин — 0,4 мл этилендиамина. Смесь перемешивали при 60° до начала гелеобразования, мешалку останавливали и нагревали гель при 80° в течение 3 ч. Далее обработку проводили как указано выше. Выход 1,3 г (54%).

Модификация геля поливинилового спирта, сшитого ксилилендихлоридом, этилендиамином через глутаровый диальдегид. К 1 г набухшего в воде геля добавляли 1 мл конц. HCl и 1 мл 25% водного глутарового диальдегида и смесь перемешивали 10 мин при 20°. Гель быстро отфильтровывали и промывали водой до pH 7, этанолом, суспендировали в растворе 1 мл этилендиамина в 10 мл этанола и выдерживали 1 ч при 20°. Гель промывали этанолом, водой, ацетоном и высушивали в вакууме при 60°.

Сшивание поливинилового спирта глутаровым диальдегидом. К раствору 5 г поливинилового спирта в 200 мл воды, полученного при 80°, при 25° добавляли 10 мл конц. HCl, перемешивали 20 мин,вливали 15 мл 25% водного глутарового диальдегида и перемешивали до начала гелеобразования, мешалку останавливали и гель выдерживали 4 ч при 25°. Дальнейшую обработку проводили как указано выше. Выход 5,5 г (50%).

Модификация геля поливинилового спирта, сшитого глутаровым диальдегидом, этилендиамином. К 1 г геля добавляли раствор 1 мл этилендиамина в 5 мл этанола, через 1 ч гель отфильтровывали, промывали этанолом, ацетоном и сушили в вакууме при 60°.

Получение комплексов стационарных лигандов с Cu²⁺. 1 г носителей обрабатывали 1—5 ч избытком 0,2 М тетрааммиаката хлористой меди при 20°, носители отфильтровывали, промывали 0,1 н. NH₄OH и водой до pH 7, этанолом и высушивали на фильтре.

Иммобилизация пенициллинамидогидролазы на медьсодержащих носителях. 1 г носителей, полученных в предыдущих опытах, заливали 0,1 М фосфатным буфером (pH 8) и выдерживали 15 ч при 20°, отфильтровывали

вали и заливали раствором 100 мг препарата пенициллинамидогидролазы в 10 мл того же буфера, инкубировали при 20° до установления равновесной концентрации белка в растворе (2—5 ч). Носители отфильтровывали, промывали 1 М раствором NaCl, водой и 0,1 М фосфатным буфером. Продукт хранили под слоем буфера при 0—5° с добавлением в качестве антисептика тимола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Песлякас И. И., Кулис Ю. Ю., Даванков В. А. (1974) Получение и применение иммобилизованных ферментов. Тез. докл. I Всес. симпоз., с. 109—110, Таллин.
2. Беликов В. М., Овчаров А. К., Слободяникова Л. С., Латов В. К. (1974) Получение и применение иммобилизованных ферментов. Тез. докл. I Всес. симпоз., с. 110—112, Таллин.
3. Cole M. (1964) *Nature*, **203**, 519—520.
4. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1977) Матер. II Всес. симпоз. «Получение и применение иммобилизованных ферментов», с. 129, Абовян.
5. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 603—609.
6. Рогожин С. В., Варламов В. П., Вальковский Д. Г. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **8**, 1718—1721.
7. Марцинявич Р. В., Солдатов В. С., Даванков В. А., Цюрупа М. П., Рогожин С. В. (1977) *Ж. физ. химии*, **51**, 1465—1467.
8. Davankov V. A., Tsyurupa M. P., Rogozhin S. V. (1976) *Angew. Makromol. Chem.*, **53**, 19—27.
9. Inman I., Dintzis H. (1969) *Biochemistry*, **8**, 4074.
10. Ямсков И. А., Буданов М. В., Михайлова Е. Л., Даванков В. А., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1977) Тез. докл. конф. «Методы получения и анализа биохимических препаратов», с. 95, Олайн.
11. Manecke G., Vogt H. G. (1976) *Macromol. Chem.*, **177**, 725—739.

Поступила в редакцию
25.IX.1978

COORDINATION-IONIC ENZYME IMMOBILIZATION.

I. PENICILLINAMIDOHYDROLASE BINDING THROUGH COPPER COMPLEXES

YAMSKOV I. A., BUDANOV M. V., DAVANKOV V. A.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

As illustrated with penicillinamidohydrolyase, the coordination-ionic method for enzyme immobilization via copper (II) complexes was studied. The method relies upon the formation of a mixed complex incorporating the metal ion, the enzyme and chelating grouping of the polymeric stationary ligand. The ethylenediamine, diethylenetriamine and triethylenetetraamine moieties were used as stationary ligands, whereas silochromes, various polystyrenes, and polyvinylalcohol-based gels were tested as polymeric supports, N-phenacetyl-D,L-phenylglycine being used as a substrate.