

УДК 541.183.123.8

ИК СПЕКТРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ИНУЛАЗА-НОСИТЕЛЬ

© 2004 г. И.В.Шкутина, О.Ф.Стойнова, В.Ф.Селеменев

Воронежский государственный университет

Методами ИК спектроскопии и гравиметрии проведено исследование характера связывания инулазы с носителем и состояния воды в фазе сорбента. Рассчитаны параметры водородных связей (E_{H} , ΔH , K_{H}), характеризующие связь фермента с носителем при адсорбционной иммобилизации. Изучено влияние иммобилизации на изменение конформации белка.

Проблема получения гетерогенных биокатализаторов приобретает в последнее время все большее значение для биотехнологических процессов, при этом значительный интерес представляет иммобилизация гидролитических ферментов с максимальным сохранением активности в твердой фазе. При иммобилизации ферментов, обладающих субъединичной структурой, носитель может оказывать влияние не только на подвижность отдельных белковых глобул, но и на процесс взаимодействия субъединиц. Результатом является уменьшение активности иммобилизованного фермента, а также изменение избирательности действия субстрата. Поэтому изучение взаимодействия фермента с твердым носителем необходимо не только для углубления наших знаний о состоянии ферментов в природных условиях, но и для оптимизации соответствующих биокаталитических процессов. В большинстве реализованных в настоящее время процессов, основанных на биокатализе иммобилизованными ферментами, используются гетерогенные биокатализаторы, полученные методами адсорбции на органических носителях и ионообменных смолах [1-3]. В работах [4-6] нами было показано, что аминокарбоксильные полиэлектролиты являются перспективными сорбентами для иммобилизации амилотических ферментов. В данной работе приводятся результаты по исследованию характера взаимодействия инулазы с ионообменниками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования были использованы фермент инулаза из *Aspergillus awamori* и иониты КБ-2, АН-251, АНКБ-2, К-3. Образцы сорбентов и иммобилизованной инулазы высушивали до постоянной массы при 50-60°C и запрессовывали с KBr (соотношение 1:100). ИК спектры регистрировали на спектрометре Specord-IR-75 в интервале частот 400-4000 см⁻¹.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Интерпретация спектрограмм инулазы, аминокарбоксильных полиэлектролитов гранульного (АНКБ-2) и волокнистого (К-3) типов, а также ионообменников после иммобилизации фермента использовалась для выяснения механизма связывания инулазы с носителями. Поскольку полиамфолиты содержат два типа функциональных групп, для получения достоверных результатов о состоянии фермента в фазе сорбента сопоставляли спектроскопические данные для инулазы, иммобилизованной на ионитах, содержащих только карбоксильные (КБ-2) и только аминогруппы (АН-251).

В случае белков наибольший интерес вызывают полосы, связанные с колебательными переходами в пептидном остове – полосы поглощения Амид I, II, III, V, а также полосы валентных колебаний NH-групп.

В спектре свободной инулазы в области частот 3000-3800 см⁻¹ присутствуют полосы поглощения валентных колебаний групп NH, NH₂ и OH. Полосы поглощения 3387, 3400 см⁻¹ относятся к симметричным валентным колебаниям свободной, а 3207, 3320, 3341, см⁻¹ – связанной NH₂-группы. К асимметричным валентным колебаниям свободной NH₂-группы могут быть отнесены полосы поглощения 3520, 3547 см⁻¹. Полоса 3067 см⁻¹ обусловлена деформационными колебаниями NH в плоскости пептидной группы. Перечисленные группы участвуют в образовании внутримолекулярных водородных связей и наряду с прочными дисульфидными связями обуславливают жесткость каркаса молекулы фермента, препятствуя ее температурной денатурации. Межмолекулярный характер имеет полоса 3280 см⁻¹, которая определяет валентные колебания связей NH пептидных групп. Частоты 3364, 3497 см⁻¹ относятся к валентным колебаниям связанной OH-группы [7,8].

В области частот 1450-1700 см⁻¹ следует выделить

сильные полосы поглощения, называемые Амид I и Амид II. Первая определяется валентными колебаниями групп C=O пептидной связи и характеризует колебание, в котором изменяется длина связи C=O. Полоса Амид I состоит из основного максимума при 1654 см⁻¹ и трех максимумов при 1620, 1641 и 1667 см⁻¹. Наличие этих полос поглощения свидетельствует о том, что в структуре молекулы глюкоамилазы присутствуют неидентичные связи C=O, что связано с участием кислорода групп C=O в образовании энергетически неравноценных водородных связей.

Полоса Амид II, обусловленная деформационными колебаниями NH в плоскости пептидной группы, обладает сложной структурой – наблюдаются компоненты этой полосы поглощения с максимумами при 1456, 1521, 1534, 1547 и 1565 см⁻¹.

На спектрограммах инулазы можно выделить также полосы поглощения Амид III (1200 – 1300 см⁻¹) и Амид V (590-700 см⁻¹), обусловленные соответственно плоскими и неплюскими деформационными колебаниями NH-групп [9].

В ИК спектрах аминокислотных полиэлектролитов АНКБ-2 и АК-22-1 в Н-С1 форме самыми интенсивными являются полосы поглощения: для АНКБ-2 1699-1720 см⁻¹ (ν_{C=O}), 2494-2600 см⁻¹ (ν_{OH} в неионизированных карбоксильных группах), 1281 см⁻¹ (δ_{OH}), 1585 и 1690 см⁻¹ пиридинового и бензольного колец [10]; для К-3 1700-1734 см⁻¹ (ν_{C=O}), 2500-2620 см⁻¹ (ν_{OH}), 1281 см⁻¹ (δ_{OH}), 1480, 1663 см⁻¹ имидазолиновые группы.

При иммобилизации инулазы на ионитах в ИК спектрах появляются изменения в области водородных связей (3400-3700 см⁻¹). В спектрах КБ-2 после

иммобилизации инулазы практически исчезают полосы поглощения 2500-2600 и 900-960 см⁻¹, характерные для деформационных колебаний OH – групп в димеризованных карбоновых кислотах. На спектрограммах появляются полосы поглощения 1387 и 1605 см⁻¹, относящиеся к асимметричным и симметричным валентным колебаниям ионизированных COO⁻ – групп, что свидетельствует о связывании фермента с носителем за счет концевых карбоксильных групп (аспарагиновой и глутаминовой кислот). В спектрах АН-251, насыщенного инулазой, можно отметить четкие полосы поглощения 1641 см⁻¹ (валентные колебания ионизированных COO⁻ – групп в цвиттер-ионе) и 1605 см⁻¹ (колебания ионизированных COO⁻), принадлежащие ферменту, поскольку своих карбоксильных групп в анионите нет. Полоса 1027 см⁻¹, отвечающая за колебания пиридинового кольца, смещается до 1007 см⁻¹.

На спектрограммах носителей АНКБ-2 и К-3 с адсорбционно связанным ферментом наблюдаются аналогичные изменения по карбоксильной и аминокислотной группе, и также, как в спектрах иммобилизованной инулазы на КБ-2 и АН-251, появляются новые полосы поглощения – Амид I, II, IV, V, принадлежащие инулазе (табл. 1).

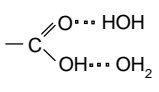
Таким образом, ИК-спектроскопические исследования позволяют предположить, что при адсорбционной иммобилизации взаимодействие осуществляется между функциональными группами полиамфолитов и карбоксильными и аминокислотными группами белка, расположенными на внешних областях глобулярной структуры.

Таблица 1

Основные аналитические частоты (ν см⁻¹) валентных и деформационных колебаний иммобилизованной инулазы

АНКБ-2 - инулаза	К-3 – инулаза	Отнесение полос поглощения
3376, 3400	3387, 3400	Симметричные валентные колебания свободной NH ₂ группы
3200, 3307, 3347	3213, 3320, 3354	Симметричные валентные колебания связанной NH ₂ группы
3540, 3520	3547, 3527	Асимметричные валентные колебания свободной NH ₂ группы
3280	3287	Валентные колебания связей NH пептидных групп
3067	3080	Деформационные колебания ≡N-H ⁺ группы
1614-1676	1627-1683	Валентные колебания групп C=O пептидной связи (Амид I)
1485-1580	1498-1587	Деформационные колебания NH групп пептидной связи (Амид II)
1370	1377	Симметричные валентные колебания ионизированных COO ⁻ групп
1200-1292	1207-1305	Плоские деформационные колебания NH групп (Амид III)
1041	-	Колебания пиридинового кольца
600-707	613-700	Неплоские деформационные колебания NH групп (Амид V)

Энергетические параметры водородных связей в системе инулаза-носитель
(E_H – энергия Н-связи, кДж/моль, ΔH – энтальпия, кДж/моль, K_H – силовая константа Н-связи, см⁻²)

Отнесение полос	АНКБ-2			К-3		
	E_H	ΔH	$K_H \cdot 10^5$	E_H	ΔH	$K_H \cdot 10^5$
НОН...ОН ₂	21,7	23,9	13,1	22,2	24,1	13,3
≡ННОН...ОН	26,9	26,6	14,6	27,4	26,8	14,7
	28,8	27,5	15,1	29,3	27,7	15,2
Инулаза-носитель	82,6	46,5	25,6	83,1	46,6	25,7

В ходе проведенного эксперимента было обнаружено, что адсорбция инулазы сопровождается изменением состояния гидратной воды ионообменников. С одной стороны, за счет образования прочных ионных пар активная группа-противоион наблюдается разрыхление структуры растворителя (появление порогов в области 3400-3700 см⁻¹), с другой, – упрочнение водородных связей вода – гидрофильная группа сорбата (полосы поглощения 3150-3400 см⁻¹).

Изучение состояния воды представляет интерес и потому, что адсорбционная иммобилизация инулазы на ионитах протекает в водных растворах, и вода является не только средой, но и реагентом. Гравиметрическим методом было установлено, что непосредственному взаимодействию фермента с но-

сителем предшествует вытеснение воды из фазы полиэлектролита (рис.). Исключение растворителя из области связывания инулаза-носитель приводит к увеличению числа центров адсорбции. При малых степенях заполнения наблюдается более резкое уменьшение количества воды, чем при сорбат-сорбатных взаимодействиях.

В таблице 2 представлены энергетические параметры водородной связи в системе полиэлектролит – инулаза, вычисленные, исходя из величин смещения $\Delta\nu_{OH}$ [11,12]. Рассчитанные силовые параметры водородных связей дают возможность оценить затраты системы на разрушение гидратных оболочек функциональных групп и вытеснение молекул воды при сорбции инулазы. Наиболее прочная водородная связь во всех рассматриваемых сорбентах образуется во фрагменте фермент-носитель – 82,6-83,1 кДж/моль.

При иммобилизации белок может быть присоединен к носителю в конформации, отличной от нативной. Поскольку каталитическая активность ферментов тесно связана со вторичной и третичной структурой белковой молекулы, то даже при небольших структурных изменениях активность может резко уменьшаться. Кроме того существенно затрудняется изучение свойств ферментов на иммобилизационных моделях, поскольку приходится иметь дело совсем с другим белком, обладающим “ненативными свойствами” [13].

Влияние носителя на конформацию белка исследовали методом ИК-спектроскопии. Конформация полипептидной цепи может быть определена двумя способами-или по дихроизму основных полос поглощения пептидной группы, или по значению частот различных компонентов полосы, расщепленных вследствие взаимодействия соседних групп при колебании. Если первый способ требует получения ориентированных образцов, то второй может быть

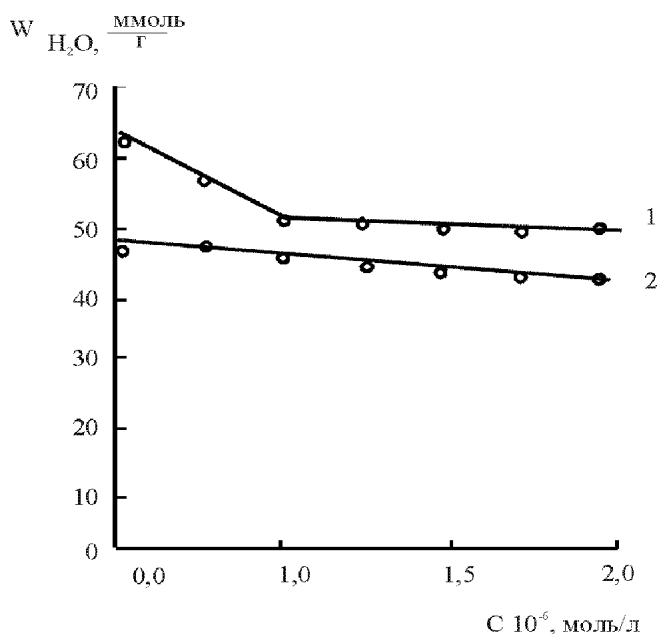


Рис. Изменение содержания воды в ионообменниках в процессе иммобилизации: 1-К-3; 2-АНКБ-2.

Содержание типов вторичной структуры свободной и иммобилизованной инулазы в процентах (%)

Конформация	ν, см ⁻¹	Свободная инулаза	Иммобилизованная инулаза	
			АНКБ-2	К-3
α-спираль	1521	29	24	27
β-слои	1534	28	29	28
Неупорядоченная структура	1548	43	47	45

применен к неориентированным образцам [9]. Поскольку инулаза относится к глобулярным белкам со сложной четвертичной структурой, молекулы которой не имеют выделенного направления ориентации полипептидных цепей, поэтому именно второй способ был использован для оценки изменения конформации иммобилизованной инулазы.

Известно, что вторичная структура белков может быть представлена в виде α-спирали, β-структуры и беспорядочного клубка. Для анализа использовали полосу Амид II, которая хорошо проявляется как в спектрах свободной, так и иммобилизованной инулазы. Максимумы полос поглощения 1521 и 1654 см⁻¹ позволяют отнести полосу Амид II к колебанию типа ν_{II}(0) [14].

Соотношение типов вторичной структуры определяли, используя закон Бугера-Ламберта-Бера. Результаты расчета типов вторичной структуры (табл.3.) для свободной и иммобилизованной инулазы показывают, что конформация инулазы, иммобилизованной на носителях различной природы, не изменяется.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования метода ИК-спектроскопии для изучения процесса иммобилизации инулазы на ионообменниках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коваленко Г.А. Иммобилизация ферментов на углеродминеральных носителях. Некоторые закономерности адсорбционной иммобилизации ферментов/ Г.А. Коваленко, М.П. Ванина // Биотехнология.- 1997.- №4. – С.3 -12.
2. Черкасов А.Н. Мембраны и сорбенты в биотехнологии/ А.Н. Черкасов, В.А. Пасечник.- Л.: Химия, 1991.- 239с.
3. Халгаш Я. Биокатализаторы в органическом синтезе/ Я.Халгаш.- М.: Мир, 1991. – 204с.
4. Шкутина И.В. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на амфотерных полиэлектролитах/ И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.Ф. Селеменев, Г.А. Григорьева // Журнал физической химии.- 2001.

-Т.75, №11.- С.2008-2010.

5. Шкутина И.В. Иммобилизация глюкоамилазы на ионогенных и неионогенных носителях/ И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.Ф. Селеменев, Т.А. Ковалева // Вестник ВГУ.- 2002.- Т.1, №1. – С.48-52.

6. Патент РФ №2181770, RU 2181770 C2, 7 C12N 11/08, 9/34. Способ получения иммобилизованной глюкоамилазы В.Ф. Селеменев, О.Ф. Стоянова, И.В. Шкутина и др.; Воронежский госуниверситет.- 2000116346/13; Заявл. 20.06.2000; Опубл. 27.04.2002; Бюл. №12 // ФИПС.- 2002.- С.6.

7. Казицына Л.А. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии/ Л.А. Казицына, Н.Б. Куплетская. – М.: Высшая школа, 1971. -264 с.

8. Иванов А.А. Исследование структуры сывороточного альбумина человека с помощью ИК спектроскопии/ А.А. Иванов, В.И. Филипчик, В.В. Кирковский // Журнал прикладной спектроскопии.- 1989.- Т.51, №1 (135).- С.135-138.

9. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков/ Ю.Н. Чиргадзе.- М.: Наука, 1965.-136 с.

10. Угрянская В.А. Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов/ В.А. Угрянская, Г.А. Чикин, В.Ф. Селеменев, Т.А. Завьялова.- Воронеж: Изд-во ВГУ, 1989.-208 с.

11. Стоянова О.Ф. Применение ИК спектроскопии для исследования сорбции железа (III) амфотерным ионитом АНКБ-2/ О.Ф. Стоянова, В.А. Угрянская, Д.Р. Измайлова и др. // Журнал физической химии.- 1986.- Т.60, №10.- С2495-2499.

12. Юхневич Г.В. Инфракрасная спектроскопия воды/ Г.В. Юхневич.- М.: Наука, 1973.- 208 с.

13. Шерман С.А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул/ С.А. Шерман, А.М. Андрианов, А.А. Ахрем.- Минск: Наука и техника, 1989.- 238 с.

14. Кантор Ч. Биофизическая химия/ Ч. Кантор, П. Шиммель.- М.: Мир, 1984.-Т.2.- 495 с.