

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КРЕМНЕЗЕМНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Л.В. Береза-Киндзерская, Л.В. Кондакова,  
В.В. Янишпольский, В.А. Тертых

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова, 17, 03164, Киев-164*

*Изучена адсорбция и ковалентное связывание щелочной фосфатазы на поверхности аминоксодержащих химически модифицированных кремнезёмов.*

*Adsorption and covalent anchorage of alkaline phosphatase on the surface of amine-containing chemically modified silicas have been studied.*

### Введение

Образование и гидролиз фосфорилированных низкомолекулярных соединений, а также фосфорилирование и дефосфорилирование белков, происходящие под действием специфических и неспецифических фосфатаз [1, 2], относятся к ключевым стадиям многих биохимических процессов, важных для функционирования живых организмов. Иммуобилизация фосфатаз на поверхности носителя позволяет с более благоприятных позиций исследовать свойства биокатализатора и дает ряд существенных преимуществ при его использовании в биотехнологических процессах.

В работе исследованы некоторые возможности получения гетерогенных препаратов щелочной фосфатазы путем иммуобилизации фермента на поверхности химически модифицированных кремнезёмов. Белковая часть фермента содержит аминоксильные и карбоксильные группы, по которым можно осуществить связывание с поверхностью кремнезёма [3].

### Экспериментальная часть

Были синтезированы ряд носителей на основе кремнезёма с аминоксильными группами в поверхностном слое. Для получения аминоксильнокремнезёмов проводили реакцию поверхностных силанольных групп с 3-аминопропилтриэтоксисиланом [4, 5], а также использовали адсорбцию природного полисахарида хитозана [6], макромолекулы которого содержат аминоксильные и гидроксильные группы. Для получения носителя с карбоксильными группами в привитом модифицирующем слое применяли взаимодействие аминоксильнокремнезёма с аскорбиновой кислотой и ее окисленной формой – дегидроаскорбиновой кислотой [7]. Предполагалось при этом, что упомянутые реагенты и мягкие условия активации поверхности должны благоприятствовать получению активных препаратов иммуобилизованной щелочной фосфатазы.

В работе использовали силохром С-120 (Ставропольский завод химреактивов и люминофоров) с удельной поверхностью  $120 \text{ м}^2/\text{г}$  и размером пор 24 нм. Концентрация поверхностных силанольных групп составляет  $1,2 - 1,7 \text{ мкмоль}/\text{м}^2$  ( $0,2 \text{ ммоль}/\text{г}$ ). Использовали также хитозан или поли(D-глюкозамин) (SIGMA) со степенью деацетилирования 85 %, 3-аминопропилтриэтоксисилан (Wacker-Silicone), щелочную фосфатазу (Fluka), полученную из тонких кишок телят (активность  $1,18 \text{ ед.}/\text{мг}$  белка). Готовили исходный

0,1 %-ный раствор хитозана растворением в 2 %-ой аскорбиновой кислоте. Применяли 1 %-ный раствор аскорбиновой кислоты (фарм., Укрхимэкспо), а также раствор окисленной формы аскорбиновой кислоты, который готовили из 1 %-го раствора аскорбиновой кислоты, оставив на неделю при контакте с кислородом воздуха. Образующийся раствор дегидроаскорбиновой кислоты приобретает желтый цвет.

Аминокремнезем готовили следующим образом [4]. Один грамм кремнезема нагревали при 673 К в течение 2 ч для удаления физически сорбированной воды, потом заливали раствором 3-аминопропилтриэтоксисилана в толуоле из расчета 0,2 г силана на 1 г кремнезема и кипятили в реакторе с обратным холодильником при постоянном перемешивании 2 ч. После этого носитель отмывали толуолом и ацетоном до полного удаления несвязавшегося силана, и сушили 4 ч при 353 К. Полноту отмывания несвязавшегося силана контролировали визуально по отсутствию цветной реакции промывной жидкости с салициловым альдегидом (в присутствии первичных аминов появляется желтое окрашивание). Содержание хемосорбированных аминогрупп определяли спектрофотометрическим методом, аналогично описанному в работе [8]. Для этого к аминокремнезему добавляли салициловый альдегид, носитель при этом окрашивался в желтый цвет за счет хемосорбции альдегида на поверхностных аминогруппах. Потом образец сушили и добавляли раствор моноэтаноламина в ацетоне. После десорбции салицилового альдегида раствор желтел вследствие образования альдиминовой связи между альдегидом и моноэтаноламином, и этот желтый раствор спектрофотометрировали в области 400 нм. Количество привитых аминогрупп на 1 г кремнезема составляло 0,22 ммоль.

Для качественной и количественной характеристики хитозана осуществляли реакцию комплексообразования между кислотной формой сульфата леинового красителя и основной аминогруппой хитозана. Метод еще известен как белковая ошибка индикатора [9]. В качестве сульфата леинового красителя использовали бромпирогаллоловый красный в фосфатном буфере. Исходный красный раствор бромпирогаллолового красного при добавлении в раствор хитозана изменял окраску на фиолетовую. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны  $\lambda = 590$  нм в кювете толщиной 1 см. В качестве раствора сравнения применяли раствор бромпирогаллолового красного.

Количество хемосорбированной аскорбиновой кислоты на кремнеземах определяли по разнице между количеством кислоты, взятой для модификации, и ее остатком в промывных жидкостях, определенное спектрофотометрическим методом, описанным в работе [10]. Метод основан на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать подкисленный раствор гептамолибдата аммония до молибденовой сини и измерении оптической плотности синего раствора при 720 нм.

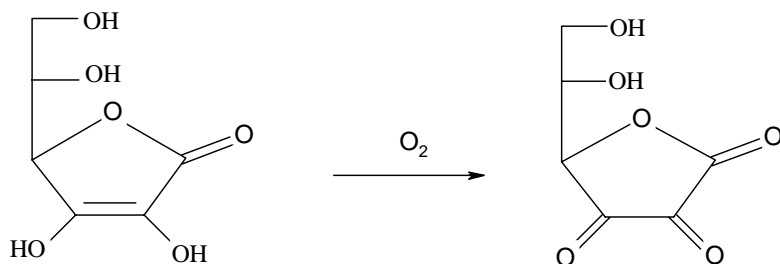
ИК-спектры образцов модифицированных кремнезёмов регистрировали на однолучевом ИК Фурье спектрометре Thermo Nicolet Nexus FT-IR в области частот 500 – 4000  $\text{см}^{-1}$ . Для этого модифицированные образцы смешивали со свежепрокаленным KBr при массовом соотношении компонентов 0,015:0,3.

## **Результаты и их обсуждение**

Для иммобилизации фермента вначале получали аминокремнезем (образец 1), затем полученный модифицированный кремнезем обрабатывали аскорбиновой кислотой (образец 2) или окисленной формой аскорбиновой кислоты (образец 3). Для этого 200 мг аминокремнезема заливали 10 мл 1 %-го раствора аскорбиновой кислоты и соответственно 10 мл раствора окисленной аскорбиновой кислоты, которую получали из 1 %-ой аскорбиновой кислоты. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при комнатной температуре, перемешивая. Потом образцы промывали дистиллированной водой и сушили

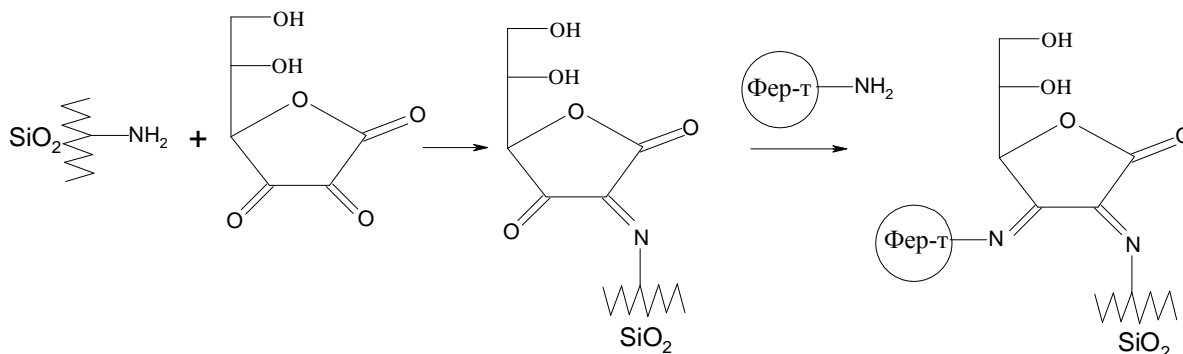
при 303 К два дня. Параллельно для сравнения подобным образом обрабатывали раствором аскорбиновой кислоты (образец 4) или раствором окисленной аскорбиновой кислоты (образец 5) поверхность исходного силохрома. Количество аскорбиновой кислоты, привитой к поверхности аминокремнезема, и кислоты, сорбированной на силохроме, составляет 0,095 и 0,020 ммоль/г соответственно. Следует отметить, что кремнезем по ходу синтеза образцов 4, 5 изменял цвет на слегка желтоватый.

Как известно, аскорбиновая кислота под действием кислорода воздуха окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты, и в молекуле появляются три карбонильные группы (рис. 1).

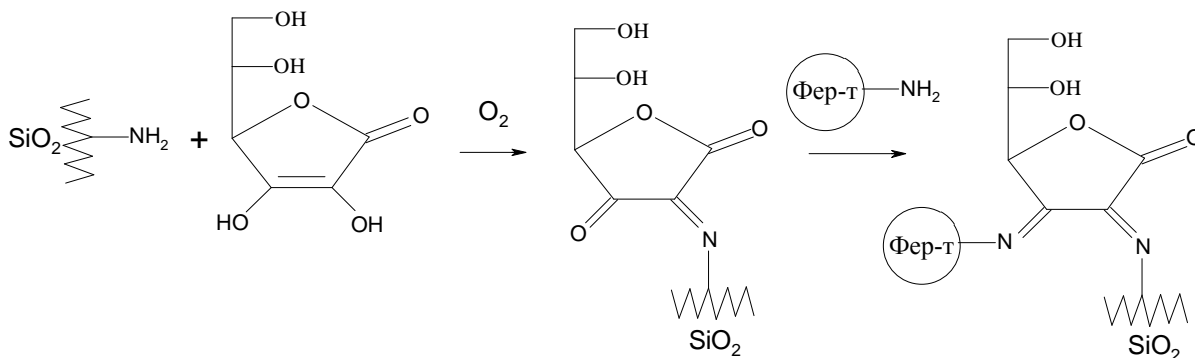


**Рис. 1.** Реакция перехода аскорбиновой кислоты в окисленную форму.

Обе формы аскорбиновой кислоты были использованы, так как при взаимодействии с аминокремнеземом они связываются с поверхностью аналогичным способом (рис. 2, 3), при этом кремнеземы окрашиваются в одинаковый цвет – оранжево-коричневый, который не меняется после промывания и высушивания, что свидетельствует о присоединении одних и тех же поверхностных групп. Схемы происходящих при этом химических реакций представлены на рис. 2, 3.

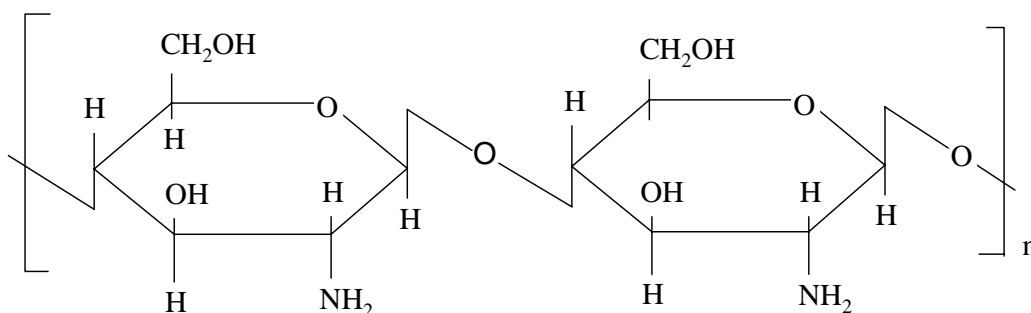


**Рис. 2.** Реакция взаимодействия аминокремнезема с окисленной формой аскорбиновой кислоты.



**Рис. 3.** Реакция взаимодействия аминокремнезема с аскорбиновой кислотой.

Для иммобилизации фермента применяли также кремнезем, модифицированный природным биополимером – хитозаном (образец 6). Хитозан, как известно, обладает такими свойствами как гидрофильность, биосовместимость, и содержит в структуре amino- и гидроксигруппы (рис. 4).

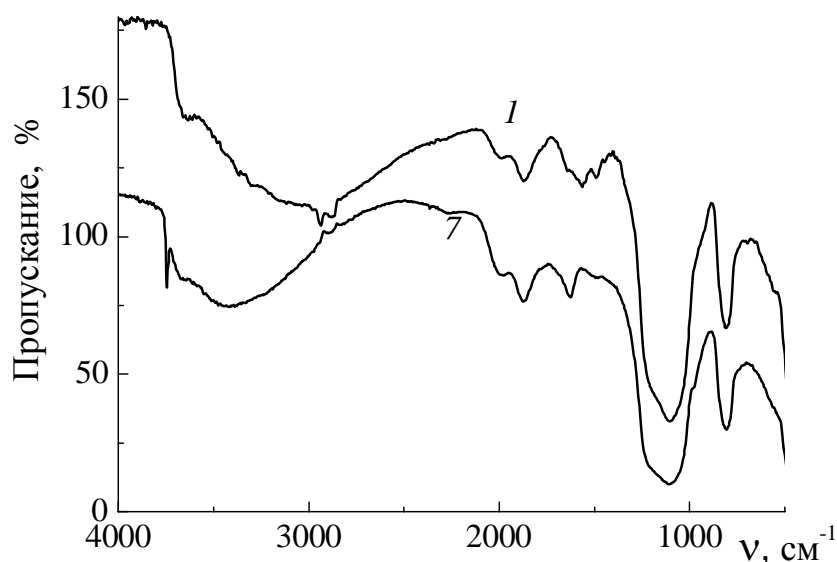


**Рис. 4.** Структурная формула хитозана.

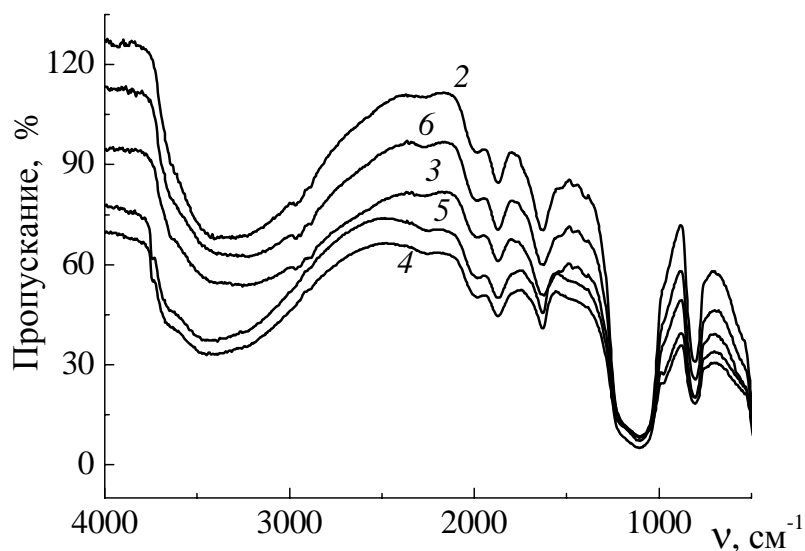
При этом использовали как способность хитозана к растворению в аскорбиновой кислоте, так и возможность одновременной модификации входящих в состав полимера аминогрупп под действием аскорбиновой кислоты. Синтез проводили следующим образом: к 200 мг силохрома прибавляли 1 мл 0,1 %-го раствора хитозана в 2 %-ой аскорбиновой кислоте. Смесь выдерживали 24 ч при 303 К, промывали 25 мл дистиллированной воды, за степенью отмывки хитозана следили качественно по реакции с бромпирогаллоловым красным. Модифицированный кремнезем сушили 5 ч при 353 К. Следует отметить, что кремнезем также приобретал оранжево-коричневый цвет, что свидетельствует о покрытии поверхности хитозаном и присоединении к поверхностным аминогруппам окисленной формы аскорбиновой кислоты по реакции, представленной на рис. 3. Количество привитого хитозана составило 1,5 мг/г, количество хемосорбированной аскорбиновой кислоты составило 0,04 ммоль/г.

Синтезированные образцы 1 – 6 были охарактеризованы методом ИК-спектроскопии и спектры сопоставлены со спектром чистого силохрома. Спектры представлены на рис. 5, 6 (номера кривых соответствуют номерам образцов).

Как видно из спектров (рис. 5), аминокремнезем характеризуется поглощением в области валентных колебаний С-Н связей при  $2930\text{ см}^{-1}$ , принадлежащим пропильным группам, отсутствием характерной полосы поглощения изолированных силанольных групп силохрома при  $3750\text{ см}^{-1}$ . Также проявляется полоса поглощения аминогрупп при  $1520\text{ см}^{-1}$ . Спектры аминокремнезем + аскорбиновая кислота, аминокремнезем + окисленная аскорбиновая кислота, силохром + хитозан + аскорбиновая кислота схожи (рис. 6), что свидетельствует о присутствии на поверхности одинаковых функциональных групп. Они имеют полосу поглощения при  $2930\text{ см}^{-1}$  валентных колебаний С-Н связей. Отсутствует характерная полоса поглощения изолированных силанольных групп силохрома, появляется интенсивная полоса поглощения при  $1660\text{ см}^{-1}$ , принадлежащая карбонильным группам, в области  $1400 - 1540\text{ см}^{-1}$  проявляются также слабые полосы деформационных колебаний углеводородной цепи. Спектры поглощения силохром + аскорбиновая кислота и силохром + окисленная аскорбиновая кислота также подобны (рис. 6), они не содержат полосу поглощения изолированных силанольных групп при  $3750\text{ см}^{-1}$ , но имеют интенсивную полосу в области поглощения карбонильных групп при  $1660\text{ см}^{-1}$ .



**Рис. 5.** ИК-спектры исходного силохрома (7) и аминокремнезема на его основе (1).



**Рис. 6.** ИК-спектры аминокремнезема и силохрома, модифицированных аскорбиновой кислотой (2 и 4 соответственно), или обработанных окисленной аскорбиновой кислотой (3 и 5 соответственно); (6) – спектр силохрома, модифицированного хитозаном в присутствии аскорбиновой кислоты.

В дальнейшем на всех полученных образцах носителей (образцы 1 – 6) была проведена сорбция щелочной фосфатазы. При этом наибольшая активность фермента была отмечена на аминокремнеземном носителе, она соответствует содержанию 1 мг биокатализатора на 1 г носителя. На других носителях активность существенно не отличалась и соответствовала 0,5 мг фермента на 1 г носителя. Активность сорбированной щелочной фосфатазы на аминокремнеземном носителе наблюдалась в течение 7 – 8 циклов работы, а на других модифицированных кремнеземах активность уменьшалась за 3 – 4 цикла работы. Но синтезированные носители, особенно силохром + хитозан + аскорбиновая кислота, наиболее перспективны для иммобилизации биологически-активных веществ вследствие природного происхождения модифицирующего поверхность полимера. Полученные

препараты иммобилизованной щелочной фосфатазы могут быть использованы для дальнейшего исследования их термостабильности и рН-зависимости.

### **Выводы**

Синтезированы образцы кремнезема для иммобилизации щелочной фосфатазы. Наряду с традиционным использованием аминоорганокремнеземов была исследована возможность получения карбонильных групп закреплением аскорбиновой кислоты на поверхности модифицированного кремнезема, а также методом покрытия поверхности кремнезема хитозаном с одновременным присоединением аскорбиновой кислоты к аминогруппам полимера. Проведена сорбция щелочной фосфатазы из тонких кишок теленка на всех полученных носителях. Наибольшая активность фермента отмечена при иммобилизации фермента на аминокремнеземе.

### **Благодарность**

Авторы признательны профессору А.И. Вовку (Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины) за предоставленные образцы фермента.

### **Литература**

1. Admiraal S.J., Herschlag D. Mapping the transition state for ATP hydrolysis: implications for enzymatic catalysis // *Chem. Biol.* – 1995. – V. 2, № 11. – P. 729 – 739.
2. Maegley K.A., Admiraal S.J., Herschlag D. Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: a new perspective from model studies // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1996. – V. 93, № 16. – P. 8160 – 8166.
3. Кольман Я., Рем К-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир. – 2000. – 469 с.
4. Иммобилизация  $\alpha$ -амилазы на поверхности высокодисперсного кремнезема / В.А. Тертых, В.В. Янишпольский, А.А. Чуйко, И.П. Галич, А.С. Цыперович, Т.А. Ковальчук // *Докл. АН УССР. Сер.Б.* – 1977. – № 7. – С. 654 – 657.
5. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния // Под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наук. думка, 2003. – 416 с.
6. Majeti N.V., Kumar R. A review of chitin and chitosan applications // *Reactive & Functional Polymers.* – 2000. – V. 46. – P. 1 – 27.
7. Tiller J., Berlin P., Klemm D. A novel efficient enzyme-immobilization reaction on  $\text{NH}_2$  polymers by means of *L*-ascorbic acid // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1999. – V. 30. – P. 155 – 162.
8. Озольниш А.Я. Спектрофотометрические методы определения доступных амино- и альдегидных групп на модифицированных силохромах // *Труды Таллинского политехн. ин-та.* – 1980. – С. 33 – 43.
9. Кузнецов В.В. Определение рН // *Соросовский образовательный журнал.* – 2001.– Т. 7, № 4. – С. 44 – 51.
10. Цап М.Л. Спектрофотометрический метод определения малых количеств аскорбиновой кислоты в водных растворах // *Биохимия.* – 1956. – Т. 21, № 5. – С. 534 – 537.