

МУХАМЕТЗЯНОВ ТИМУР АНВАРОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА
СВЯЗЫВАНИЕ ПРОФЛАВИНА И
КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БЫЧЬЕГО
ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО α -ХИМОТРИПСИНА**

02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2008

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А. М. Бутлерова Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина" Министерства образования и науки Российской Федерации.

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент
Сироткин Владимир Александрович

Официальные оппоненты

доктор химических наук, профессор
Евтюгин Геннадий Артурович

доктор химических наук, доцент
Рыжкина Ирина Сергеевна

Ведущая организация

Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет

Защита диссертации состоится 5 марта 2008 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 022.005.01 при Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук по адресу: 420088, г. Казань, ул. акад. Арбузова, 8, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420088, г. Казань, ул. акад. Арбузова, 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова Каз НЦ РАН.

Автореферат разослан 31 января 2008 года

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000398402

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Р.Г. Муратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Ферментативный катализ в органических средах является одним из наиболее перспективных направлений современной биотехнологии. На сегодняшний день ферментативный катализ в органических растворителях нашел применение в синтезе лекарственных препаратов, пищевых продуктов, реагентов тонкого химического синтеза (фирмы BASF, Schering-Plough). Исследования ферментативного катализа в органических средах позволяет не только оптимизировать многие биотехнологические процессы, но и значительно расширяет наше представление о факторах, определяющих каталитическую активность и стабильность биокатализаторов, предоставляя информацию, которая зачастую недоступна в рамках традиционных «водных» исследований. Особый интерес представляет функционирование биокатализаторов в смесях органических растворителей с водой, поскольку вода является необходимым участником многих взаимодействий, определяющих структуру и каталитическую активность фермента.

Однако анализ литературных данных свидетельствует о том, что, несмотря на значительный практический интерес к ферментативному катализу в органических средах, многие фундаментальные особенности этого явления до настоящего времени не ясны.

Все это предопределило наш интерес к свойствам белков в органических средах и, в частности, влиянию смесей воды с различными органическими растворителями на свойства модельного фермента – бычьего панкреатического α -химотрипсина.

Цель работы. Основной целью настоящей работы является установление физико-химических параметров, определяющих влияние водно-органических смесей во всем интервале составов на каталитическую активность бычьего панкреатического α -химотрипсина. Для достижения этого необходимо было решить следующие задачи.

- изучение влияния смесей воды с органическими растворителями на каталитическую активность химотрипсина.

- изучение связывания конкурентного ингибитора профлавина химотрипсином в смесях воды с протоноакцепторными растворителями.

- разработка подхода к анализу кинетических кривых ферментативной реакции при воздействии органического растворителя на каталитическую активность фермента.

Научная новизна работы. В ходе работы было впервые исследовано влияние смесей воды с семью протоноакцепторными растворителями, рядом монокислотных алифатических спиртов во всем интервале составов, а также рядом гидрофобных органических растворителей, на каталитическую активность химотрипсина. Впервые разработана методика, позволяющая исследовать связывание конкурентного ингибитора профлавина в низководных органических средах. Связывание профлавина химотрипсином впервые изучено в широком диапазоне активностей воды в смесях воды с семью протоноакцепторными органическими растворителями. Разработаны подходы, позволяющие анализировать воздействие медленных процессов денатурации/ренатурации на протекание ферментативной реакции.

На защиту выносятся следующие положения:

Обнаружено, что смешивающиеся с водой протоноакцепторные растворители можно разделить на две группы по их влиянию на каталитическую активность и связывание конкурентного ингибитора профлавина бычьим панкреатическим α -химотрипсином. В растворителях первой группы (ацетонитрил, ацетон, диоксан и тетрагидрофуран) каталитическая активность подавлена в области активности воды

~0.8, а также наблюдается зависимость связывания профлавина от состава водно-органической смеси с максимумом в области средних активностей воды (0.5-0.6); в растворителях второй группы (ДМФА, ДМСО, пиридин) положения минимума каталитической активности варьирует, связывание профлавина подавлено, либо (в ДМСО) на зависимости доли связанного профлавина от состава водно-органической смеси отсутствует максимум в области средних активностей воды.

Деление растворителей на группы согласуется с различием в протонакцепторной способности растворителя.

На основании данных по влиянию смесей воды с моноатомными алифатическими спиртами (метанол, этанол, пропанол-1 и бутанол-1) во всем интервале составов установлено, что в области высоких содержаний воды наибольшее денатурирующее действие проявляют пропанол-1 и бутанол-1. Величины пороговой термодинамической активности воды денатурации химотрипсина в высоководной области согласуются с гидрофобностью спиртов ($\log P$). В низководной области наибольшим инактивирующим действием обладают спирты с небольшим размером алкильного радикала – метанол и этанол, что согласуется с представлениями о доминирующей роли кинетических факторов в низководных средах.

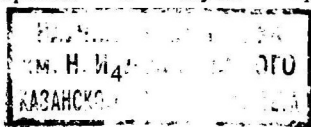
Сопоставление данных полученных в протонакцепторных растворителях и спиртах демонстрирует, что форма зависимости каталитической активности фермента от состава водно-органической смеси определяется соотношением между размером углеводородного радикала и способности растворителя к специфическому межмолекулярному взаимодействию.

Установлено, что инкубация фермента в органических средах не приводит значимым изменениям константы Михаэлиса, при этом наблюдается снижение максимальной скорости ферментативной реакции, что свидетельствует о снижении доли каталитически активной формы фермента. Исключение представляют ароматические органические растворители, такие как толуол и бензол, которые являются конкурентными ингибиторами химотрипсина, они вызывают повышение величин константы Михаэлиса ферментативной реакции в воде.

Предложены модифицированные формы интегрального уравнения Михаэлиса-Ментен, которые позволяют учитывать искажение форм кинетических кривых за счет процессов денатурации/ренатурации. Полученные кинетические уравнения хорошо аппроксимируют экспериментальные кинетические кривые.

Практическая значимость работы состоит в том, что полученные в настоящей работе зависимости каталитической активности химотрипсина от состава водно-органических смесей позволяют определять оптимальный состав реакционной среды для проведения биокаталитических процессов. Проведенные в настоящей работе исследования являются основой для поиска путей повышения каталитической активности ферментов в органических растворителях. Предложены модифицированные формы интегрального уравнения Михаэлиса-Ментен, которые позволяют учитывать протекание процессов ренатурации/денатурации фермента в ходе протекания реакции.

Личный вклад автора заключается в получении и математической обработке собственных экспериментальных данных, обсуждаемых в работе; обобщении полученных результатов и анализе литературных данных; разработке уравнений для описания кинетических кривых в случае протекания процессов денатурации/ренатурации.



Апробация работы и публикации. Основные результаты диссертации изложены в 3 статьях, опубликованных в центральных российских изданиях, а также в тезисах 12 докладов на следующих конференциях: Международной конференции "BIOCATALYSIS 2002: Fundamentals & Applications" (Москва, 2002); III-VII Научные конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2003-07); XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003); Итоговых конференциях республиканского конкурса научных работ среди студентов на соискание премии им. Н.И. Лобачевского (Казань, 2002-03); Международной конференцией студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2004» (Москва, 2004); IX Международной конференции «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Плес, 2004); Итоговой научной конференции КГУ (Казань, 2007)

При содействии автора были выполнены курсовые и дипломные работы Кармановой Ю.В. и Комиссаровым И.А.

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета. Исследования проводились при поддержке совместной программы CRDF и Российского Министерства Образования "Фундаментальные исследования и высшее образование" (грант REC-007), а также гранта НИОКР АНТ №03-3.10-131/2003 (Ф).

Настоящая диссертационная работа является продолжением систематических исследований свойств белков в органических средах, проводимых в отделе физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова КГУ, и выполнена под руководством к. х. н., доцента В.А. Сироткина. Автор считает своим долгом выразить ему, а также заведующему кафедрой физической химии профессору Б.Н. Соломонову, искреннюю благодарность за постоянное внимание к работе и поддержку в процессе проводимых исследований. Автор признателен к.ф.м.н., инж. каф. физической химии Климовицкому А.Е., а также с.н.с. ИОФХ им. А.Е.Арбузова Захарычеву Д.В.

Структура работы. Работа изложена на 177 страницах, содержит 18 таблиц, 104 рисунка и 118 библиографических ссылок. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы.

В первой главе рассмотрены литературные данные о свойствах белков в органических средах, а также о влиянии органических растворителей на каталитическую активность ферментов.

Вторая глава содержит описание объектов исследования и проведенных экспериментов.

Третья глава посвящена обсуждению собственных результатов. В ней описаны зависимости воздействия водно-органических сред на каталитическую активность химоотрипсина от их состава. Описаны принципы определения связывания профлавины химоотрипсином в смесях воды с органическими растворителями, а также результаты проведенного исследования связывания профлавины. Обсуждается связь между физико-химическими параметрами растворителя и его влиянием на функционирование фермента. Описан подход к анализу кинетических кривых ферментативных реакций при протекании медленных ренатурационных/денатурационных процессов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования и методы измерения: В работе были использованы органические растворители марки «хч». Для приготовления титранта был использован КОН марки «ч». В качестве стандартного раствора для определения концентрации титранта применяли стандарт-титр HCl. Применяли бидистиллированную деионизированную воду

Лиофилизированный препарат бычьего панкреатического α -химотрипсина (ЕС 3.4.21.1, "Sigma", C-4129, Type II), этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина (АТЭЭ, А-6751, "Sigma"), профлавин (Р-2508, "Sigma") были использованы без дополнительной очистки.

Регистрация кинетических кривых гидролитической реакции проводилась на автоматическом титраторе Hiranuma Comtite 101 в pH-статическом режиме. В этом режиме кислота, выделяющаяся в ходе реакции гидролиза, постоянно оттитровывается для поддержания в системе постоянного pH. Зависимость расхода щелочи от времени представляет собой кинетическую кривую реакции. Достоинством pH-статического изучения кинетики ферментативной реакции является то, что отпадает необходимость в буферных смесях. Титратор был сопряжен с компьютером.

УФ-спектры регистрировались на спектрометре Perkin Elmer Lambda 35.

Результаты и обсуждение: Для изучения влияния органических растворителей и водно-органических смесей нами использована методика, основанная на изучении каталитической активности фермента в воде после инкубации (1 час) в водно-органической смеси заданного состава.

Преимуществами использованной методики являются:

- А) Возможность исследования водно-органических смесей любого состава,
- Б) Проведение каталитической реакции в одинаковых условиях. В данном случае, изменения каталитической активности отражают только влияние среды на свойства фермента, а не на модельную химическую реакцию.

На первом этапе наших исследований было проведено изучение влияния смесей воды с семью протонаакцепторными растворителями на каталитическую активность химотрипсина. Изученные растворители охватывают практически все применяемые в области биокатализа смешивающиеся с водой протонаакцепторы.

На рис. 1 представлены типичные кинетические кривые реакции гидролиза АТЭЭ в воде, катализируемой ферментом, инкубированным в смесях воды с тетрагидрофураном. Как видно из рисунка кривые имеют сходную форму, однако время протекания процесса зависит от состава водно-органической смеси, в которой был инкубирован фермент.

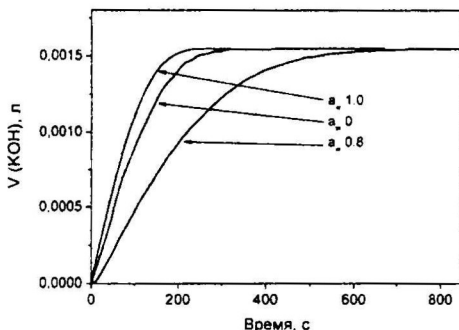


Рис.1 Типичные кинетические кривые реакции гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина (АТЭЭ), катализируемой α -химотрипсином, инкубированным в смесях вода-тетрагидрофуран с различной активностью воды.

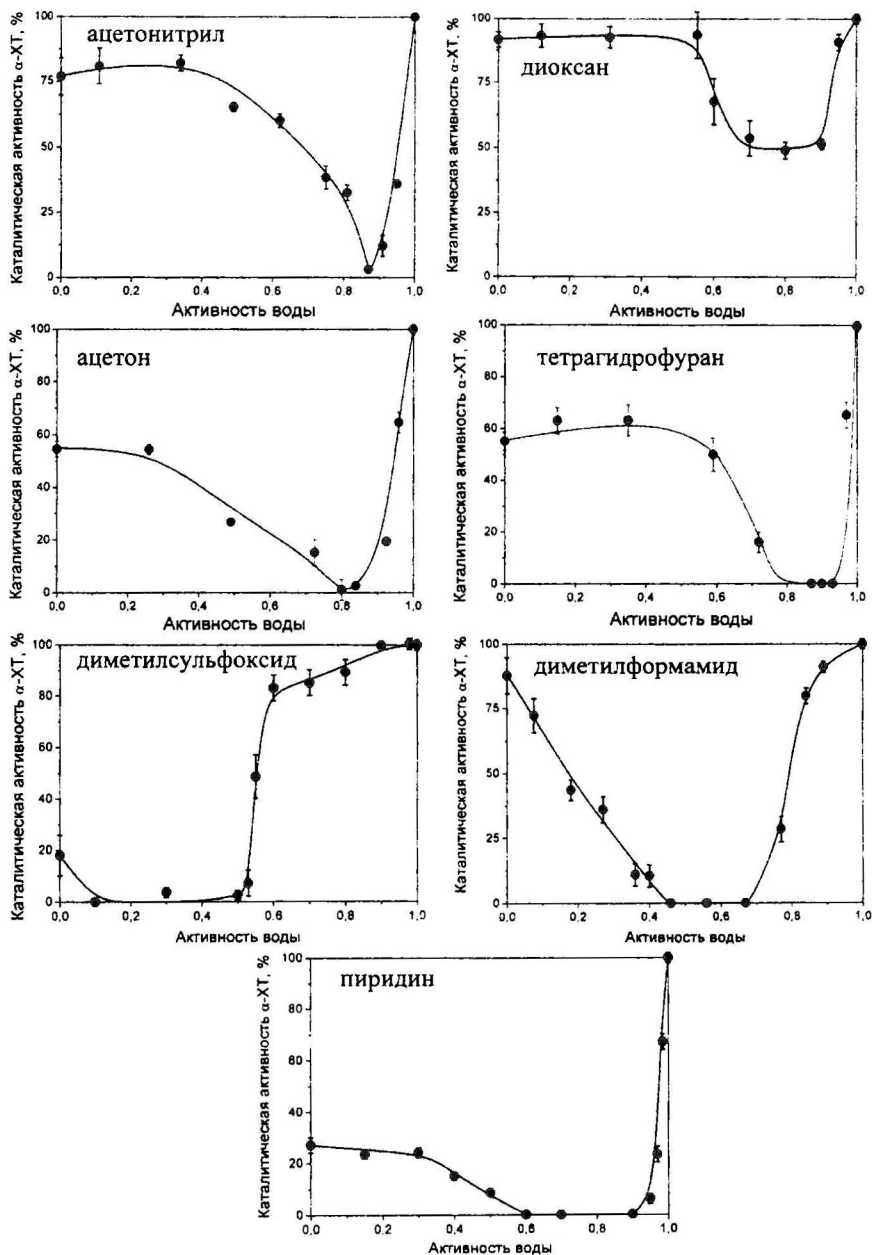


Рис. 2. Каталитическая активность α-химотрипсина после инкубации в водно-органических смесях с различной активностью воды.

На рис.2 представлены зависимости относительной каталитической активности химотрипсина от активности воды в органических растворителях. В качестве меры относительной каталитической активности химотрипсина мы приняли выход реакции гидролиза субстрата за 200 секунд, отнесенный к выходу реакции за такое же время в воде.

Изученные растворители можно разделить на две группы по их влиянию на каталитическую активность фермента – в отдельную группу можно выделить ацетонитрил, диоксан, тетрагидрофуран и ацетон, другую группу представляют пиридин, ДМФА и ДМСО.

Как видно из рисунка 2, остаточная каталитическая активность фермента в ацетонитриле, ацетоне, диоксане и ТГФ достаточно высока. Зависимости остаточной каталитической активности фермента от активности воды имеют в этих растворителях сходную форму. Минимум активности фермента наблюдается при активности воды около 0.8 и занимает узкий интервал активностей. Выше и ниже этого интервала каталитическая активность восстанавливается.

Растворители второй группы (пиридин, ДМФА и ДМСО) обладают более выраженным денатурирующим действием. Остаточная каталитическая активность близка к нулю в широком интервале активностей. Положение минимума активности фермента варьирует. Пороговая активность воды (активность воды, при которой наблюдается 50% остаточная активность фермента) в случае ДМСО составляет 0.55, ДМФА – 0.8, пиридин – 0.97.

Полученные в настоящем исследовании данные по влиянию инкубации фермента в водно-органических смесях на его каталитическую активность согласуются с результатами работы [Tomiuchi Y. *et al* // Bull.Chem. Soc. Jpn. –1993. – V.66. –P.1176-1181], в которой каталитическая активность α -химотрипсина была измерена непосредственно в водно-органических средах, однако в настоящем исследовании изучен весь диапазон активностей воды, чего не сделано в упомянутой работе.

Механизм денатурирующего действия водно-органических смесей был проанализирован, исходя из каталитических параметров ферментативной реакции. Они были рассчитаны с использованием интегрального уравнения Михаэлиса-Ментен по методу, описанному в работе [Goudar, C.T. *et al* // Journal of Microbiological Methods. –2004. –V.59. –P.317–326.]. Было установлено, что константа Михаэлиса (K_m) ферментативной реакции практически не меняется при действии изученных водно-органических смесей (рис.3). Основной вклад в изменение остаточной каталитической активности вносит величина максимальной скорости ферментативной реакции (V_{max}). В качестве примера на рис.4 представлена зависимость V_{max} от активности воды в смеси вода-ацетонитрил. Как видно из рис.4, величины V_{max} ферментативной реакции изменяются согласованно с изменениями каталитической активности α -химотрипсина после инкубации в водно-органических смесях.

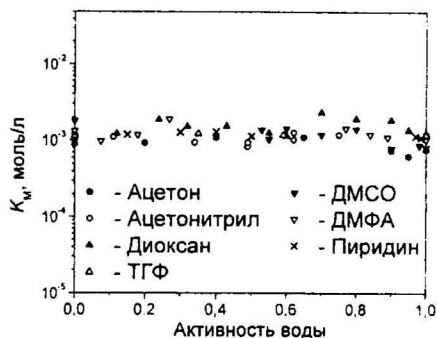


Рис. 3. Зависимость величины K_M ферментативной реакции от состава водно-органической смеси

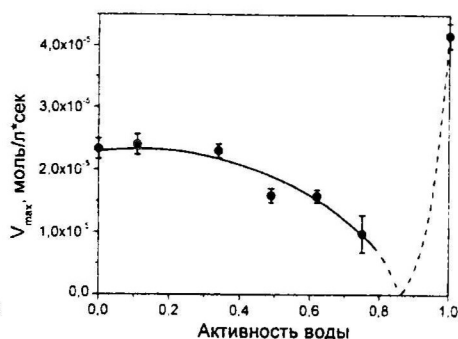


Рис. 4. Зависимость величины V_{max} ферментативной реакции от активности воды в смеси вода-ацетонитрил

V_{max} зависит от константы скорости реакции деацилирования ацилфермента (k_{cat}) и от суммарной концентрации фермента в системе. Таким образом, снижение величины V_{max} может являться результатом как снижения k_{cat} , так и уменьшения доли каталитически активного фермента. Принимая во внимание постоянство величины K_M , которая не зависит от концентрации фермента в системе, снижение доли нативного фермента после инкубации представляется наиболее вероятной причиной снижения величин V_{max} .

Деление протоноакцепторов на группы прослеживается и при изучении связывания ферментом профлавина. Профлавин является конкурентным ингибитором бычьего панкреатического α -химотрипсина. Конкурентные ингибиторы можно рассматривать как структурные аналоги боковой цепи специфических субстратов данного фермента, поэтому закономерности образования комплекса фермент-ингибитор могут быть распространены и на механизм образования комплекса Михаэлиса в случае самих субстратов [К. Мартинек, А.В. Левашов, И.В. Березин // Молекулярная Биология. –1970. –Вып. 3. –С.339-347.]. Тем не менее, информация по взаимодействию конкурентных ингибиторов с ферментами в низководном окружении весьма ограничена.

Разработанная нами методика определения связывания профлавина основывается на методе УФ-спектрофотометрии. По нашей методике, к препарату фермента добавляется раствор профлавина в водно-органической смеси. Для поддержания постоянной кислотности используется Трис-буфер, обеспечивающий pH 8.0 в воде. Реакционная смесь выдерживается 1 час при температуре 25°C, после чего фиксируются спектры профлавина в исходной водно-органической смеси и в присутствии фермента.

Типичный вид разностных спектров профлавина (отличия между спектрами раствора профлавина в присутствии и отсутствии фермента) в водно-органических смесях представлен на рис.5. Как видно из рис.5, при низких и высоких активностях воды возмущение спектров профлавина белком отсутствует, из чего можно сделать вывод, что в таких смесях фермент не связывает профлавин. В области средних активностей воды белок нерастворим, поэтому наличие в разностных спектрах минимума свидетельствует об убыли концентрации профлавина, за счет связывания

его ферментом. Отношение величины минимума в разностном спектре профлавина к величине максимума в спектре исходного раствора соответствует доле связанного профлавина при данной концентрации белка.

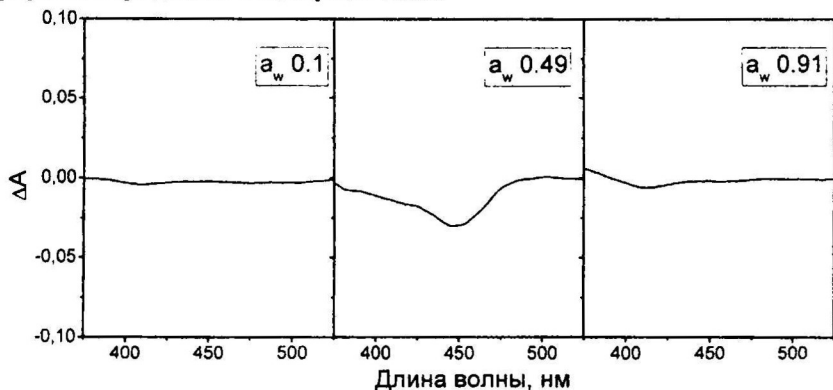


Рис. 5. Разностные спектры профлавина в присутствии фермента в смесях вода-ацетонитрил при различных активностях воды (отличия между спектрами раствора профлавина в присутствии и отсутствии фермента; концентрация профлавина $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, концентрация фермента $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Как и при изучении влияния смесей воды на каталитическую активность фермента, было установлено, что изученные протонаакцепторные растворители можно разделить на две группы по их влиянию на связывание конкурентного ингибитора профлавина. Зависимости доли профлавина, находящегося в связанном состоянии в условиях эксперимента (концентрация профлавина $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, концентрация фермента $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л), представлены на рис. 6.

Первую группу растворителей представляют ацетонитрил, диоксан, ТТФ и ацетон. На изотермах полученных в этих растворителях можно выделить три этапа. Способность фермента связывать профлавин максимальна в чистой воде (в условиях эксперимента связывается 83% профлавина). При снижении активности воды до 0.8 – 0.9 наблюдается полное подавление связывания. Однако дальнейшее понижение активности воды (0.4–0.7) приводит к заметному восстановлению способности фермента связывать профлавин. В самой низководной области (0–0.3) фермент практически не связывает профлавин. Унификация зависимостей в активностных координатах свидетельствует о том, что взаимодействие фермента с водой является решающим фактором, управляющим способностью фермента связывать профлавин в этих растворителях. Во второй группе растворителей трехэтапная изотерма связывания не наблюдается, в пиридине и ДМФА связывание полностью подавлено в широком диапазоне активностей воды, в ДМСО наблюдается небольшой постоянный уровень связывания без максимума в области активности воды 0.5.

Таким образом, по данным двух различных методик изученные растворители можно разделить на две группы. Деление растворителей на группы по данным обеих методик совпадает, что свидетельствует общности полученных закономерностей.

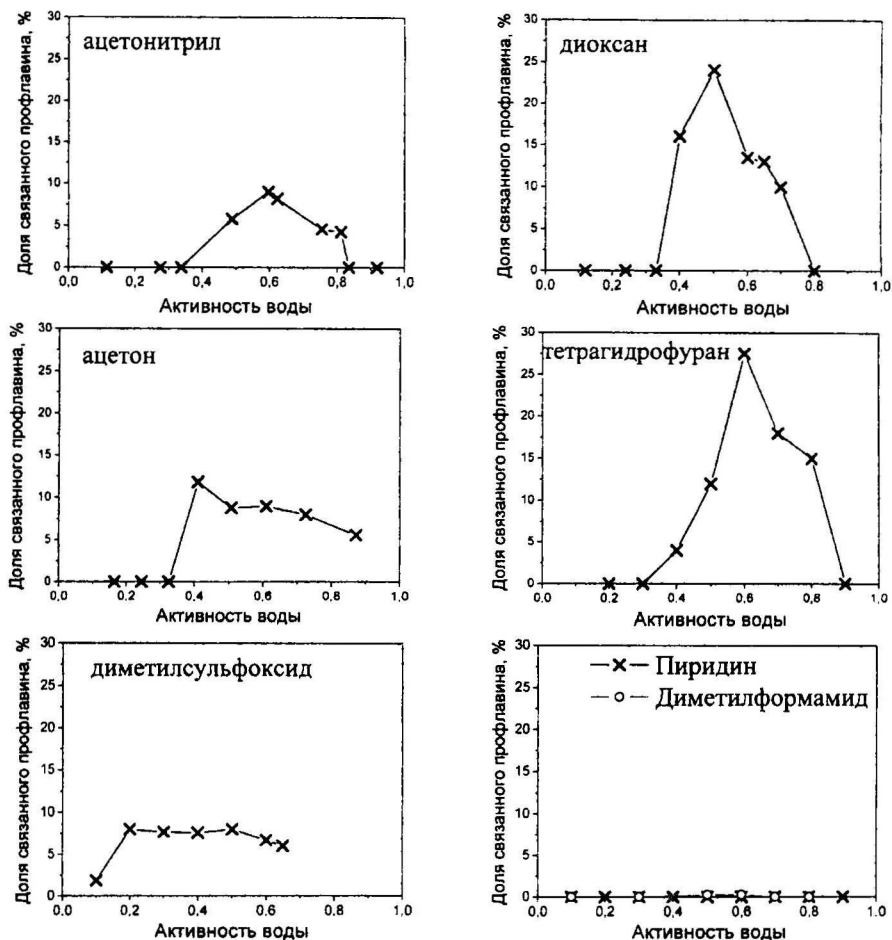


Рис. 6. Зависимости доли профлавина, находящегося в связанном состоянии (концентрация профлавина $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, концентрация фермента $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л), от активности воды в водно-органических смесях.

Мы сопоставили основные физико-химические параметры изученных растворителей. Хорошая корреляция была найдена только для протонноакцепторной способности растворителя. В качестве меры протонноакцепторности нами была использована энтальпия специфической взаимодействия воды с органическими растворителями ($\Delta H_{\text{вз(сп)}}^{\text{H}_2\text{O/S}}$) [М.Д. Борисов, А.А. Столов, А.Р. Черкасов, С.В. Изосимова, Б.Н. Соломонов // Журнал Физической Химии. –1994. –Т.68. –С.56–62.]. Первая группа растворителей представлена протонноакцепторами средней силы. Вторую группу растворителей представляют сильные протонноакцепторы. Другие физико-химические характеристики не позволяют провести такого деления. Так,

например, в разных группах оказываются близкие по полярности ацетонитрил и ДМФА, пиридин и ТГФ, достаточно гидрофильные ДМФА ($\log P = -1.0$) и диоксан ($\log P = -1.1$) и относительно более гидрофобные пиридин и ТГФ.

Связь между размером гидрофобного радикала органического растворителя и его влиянием на каталитическую активность фермента была изучена на основе ряда моноатомных алифатических спиртов. В этом ряду протонодонорные и протоноакцепторные свойства ОН- группы меняются незначительно и единственным значительным различием между спиртами является размер их радикала.

Параметры каталитической активности фермента после инкубации в водно-спиртовых смесях (рис. 7) получали аналогично смесям вода-протоноакцептор.

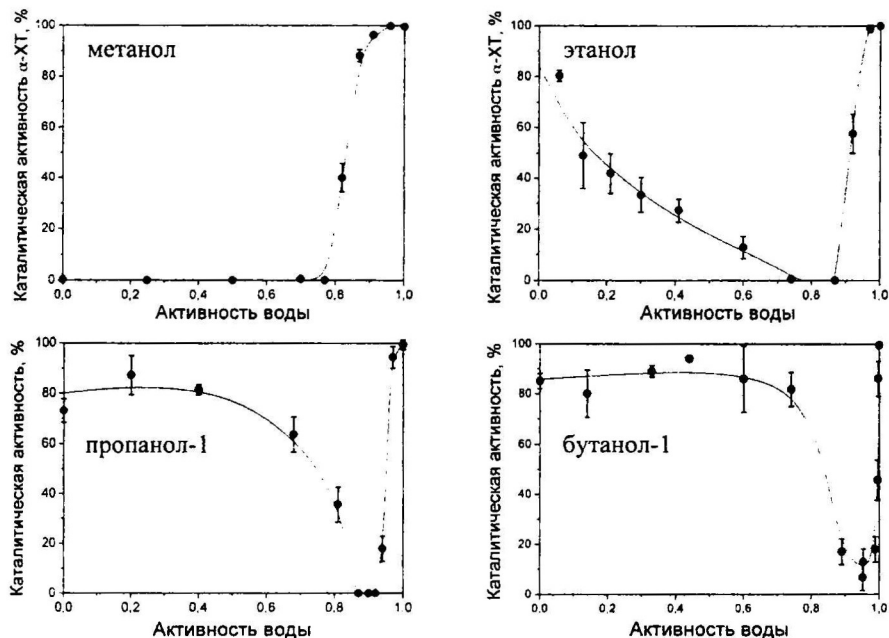


Рис. 7. Каталитическая активность α -химотрипсина после инкубации в водно-органических смесях с различной активностью воды.

На рис. 7 представлены зависимости каталитической активности химотрипсина от состава водно-спиртовой смеси, в которой фермент был инкубирован. Как видно из рисунка, по мере увеличения размера углеводородного радикала спирта область минимума каталитической активности сдвигается в область более высоких активностей воды. В низководной области с ростом длины радикала повышается стабильность фермента, однако в области высоких термодинамических активностей воды денатурирующее действие наоборот усиливается.

На рис. 8 представлено сопоставление каталитической активности химотрипсина и длины радикала спирта для области низких и высоких активностей воды. Как видно из рис. 8, в области низких и высоких активностей воды наблюдается

противоположное соотношение между длиной радикала спирта и его воздействием на каталитическую активность фермента.

Денатурирующее действие органических растворителей в области высоких активностей воды неоднократно обсуждалось в литературе. Полученные в настоящей работе данные согласуются с литературными представлениями о большем денатурирующем действии гидрофобных соединений в области малых добавок органического растворителя. Для изученного ряда спиртов наблюдается близкая к линейной корреляция (рис.9) между величинами $\log P$ (логарифм коэффициента распределения вода-октанол-1) растворителя и активностью воды, при которой каталитическая активность фермента снижается на 50% (a_{w50}). Наблюдающийся эффект, очевидно, объясняется тенденцией более гидрофобных спиртов перераспределяться из водного раствора в окружение неполярных групп фермента, нарушая его конформацию.

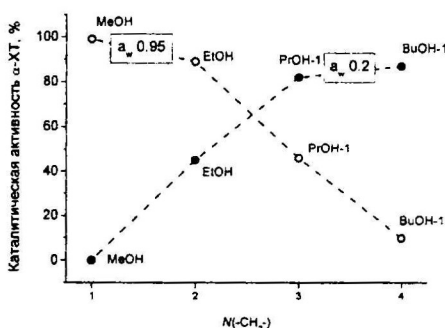


Рис. 8. Влияние размера углеводородного радикала спирта на каталитическую активность α -хитотрипсина в области высоких и низких термодинамических активностей воды.

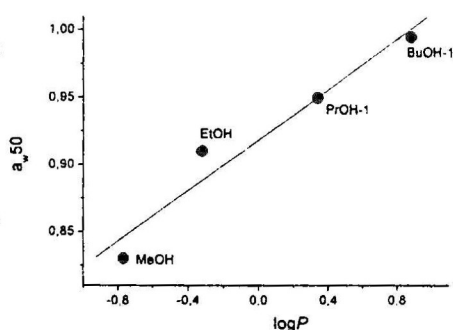


Рис. 9. Сопоставление величин $\log P$ спиртов и пороговой активности воды водно-спиртовой смеси (a_{w50}).

В низководном окружении гидрофобный эффект уже не может быть движущей силой воздействия органического растворителя на свойства фермента. В данном случае большую роль играют кинетические (стерические) ограничения. Спирты с меньшим размером радикала (метанол и этанол) сильнее воздействуют на состояние осушенных белков, что согласуется с экспериментальными данными [Sirotkin, V.A. A.N. Zinatullin, B.N. Solomonov, D.A. Faizullin, V.D. Fedotov // *Thermochimica Acta.* – 2002. – V.382. – P.151–160.]: интегральные структурные изменения хитотрипсина, наблюдаемые в области полосы Амид I в ИК-спектрах, были значительны по величине в метаноле и этаноле (4.4 и 4.2 см^{-1}) и близки нулю в пропаноле-1 и бутаноле-1 (0.8 и 0.5 см^{-1}). Сравнение зависимостей каталитической активности хитотрипсина от активности воды в смеси вода-спирт, в которой был инкубирован фермент, с зависимостями, полученными для смесей воды с протоноакцепторными растворителями, свидетельствует о том, что по действию на свойства фермента метанол близок к протоноакцепторам второй группы (ДМСО). Пропанол-1 и бутанол-1 близки к растворителям первой группы (ацетонитрил, ТГФ), этанол же занимает промежуточное положение. Это является важным результатом, поскольку в данном

случае принадлежность спирта к той или другой группе растворителей зависит от размера углеводородного радикала. Результаты, полученные в протоноакцепторных растворителях, в свою очередь, свидетельствуют о большом значении способности растворителя к специфическому межмолекулярному взаимодействию (например, ацетон и ДМСО при близкой структуре и одинаковом объеме углеводородных радикалов (две CH_3 - группы) оказывают различное воздействие на свойства фермента). Таким образом, можно заключить, что форма зависимости каталитической активности фермента от активности воды в водно-органической смеси определяется суммарным действием двух параметров растворителя: способности растворителя к специфическому межмолекулярному взаимодействию и объема углеводородного радикала.

Кинетические параметры ферментативной реакции изменяются аналогичным образом при воздействии смесей вода-спирт и вода-протоноакцептор. Так, наиболее чувствительным параметром к действию водно-спиртовых смесей оказывается величина максимальной скорости ферментативной реакции $V_{\max}$. Величины константы Михаэлиса ферментативной реакции в случае инкубации химотрипсина в водно-спиртовых смесях, как и при действии смесей вода-протоноакцептор, меняются незначительно.

Разработанная методика позволяет изучать влияние практически любых растворителей, в том числе несмешивающихся с водой. В таблице 1 представлены данные, полученные после инкубации химотрипсина в четыреххлористом углеороде, гексане, гексаноле, бензоле и толуоле.

Таблица 1

Параметры ферментативной реакции гидролиза АТЭЭ, катализируемой химотрипсином, инкубированным в органических растворителях.

растворитель	каталитическая активность, %	$V_{\max} \cdot 10^5$, моль/л*с	$K_M \cdot 10^3$, моль/л
CCl_4	57	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.2
гексан	88	2.6 ± 0.4	0.9 ± 0.2
гексанол-1	85	2.9 ± 0.5	1.4 ± 0.3
бензол	70	8.8 ± 1.3	12.9 ± 2.0
толуол	84	7.1 ± 1.0	6.0 ± 0.9

Как видно из таблицы 1, гидрофобные органические растворители оказывают влияние на параметры ферментативной реакции. Обращает на себе значительное снижение каталитической активности химотрипсина после инкубации в CCl_4 , а также значительное повышение константы Михаэлиса ферментативной реакции после инкубации фермента в бензоле и толуоле. Повышение величины K_M наблюдающееся при действии на химотрипсин ароматических соединений – бензола и толуола, свидетельствует о снижении сродства фермента к субстрату. Как известно, химотрипсин проявляет специфичность по отношению к ароматическим субстратам, соответственно конфигурация активного центра фермента способствует связыванию таких соединений, примером чего является изученное в настоящей работе взаимодействие химотрипсина с профлавином. По-видимому, наблюдаемое увеличение величин константы Михаэлиса связано с тем, что химотрипсин связывает молекулы бензола и толуола, которые при этом являются помехой для эффективного связывания субстрата.

Можно предположить, что существует еще один механизм, который может приводить к потере каталитической активности фермента. При переносе из органического растворителя в водный раствор локальное окружение фермента меняется из чисто органического на чисто водное. Молекулы гидрофобных органических растворителей при этом, вероятно, будут стремиться остаться вблизи гидрофобных боковых групп полипептидной цепи фермента, нарушая структуру биокатализатора, что, в свою очередь, может сказаться на ферментативной активности. Согласно этой гипотезе основные изменения каталитической активности фермента при действии гидрофобных растворителей происходят в момент переноса фермента из органического растворителя в воду.

Чтобы проверить справедливость этого предположения, нами было проведено исследование влияния времени инкубации химотрипсина в органических растворителях на каталитическую активность химотрипсина. В случае, если высказанное предположение верно, каталитическая активность химотрипсина не должна зависеть от времени инкубации в гидрофобных органических растворителях.

В таблице 2 представлены величины каталитической активности химотрипсина в различных органических растворителях, полученные при различной продолжительности инкубации.

Таблица 2

Каталитическая активность химотрипсина инкубированного в течении 1 часа и 24 часов в различных органических растворителях.

Растворитель	Каталитическая активность, %		влияние инкубации на каталитическую активность.
	время инкубации 1 час	время инкубации 24 часа	
CCl ₄	57	61	+7%
гексан	88	91	+3%
гексанол-1	85	93	+9%
бензол	70	77	+10%
ацетонитрил	77	64	-17%
ТГФ	56	36	-36%
ДМСО	18	14	-22%
ДМФА	88	69	-22%
этанол	81	34	-58%
пропанол-1	73	56	-23%

Как видно из таблицы 2, в случае несмешивающихся с водой растворителей, изменения каталитической активности химотрипсина при увеличении времени инкубации до 24 часов невелики (наблюдается даже некоторое увеличение каталитической активности фермента, которое связано, вероятно, с отличиями условий инкубации). В случае смешивающихся с водой растворителей каталитическая активность химотрипсина с увеличением времени инкубации падает, что свидетельствует о медленно протекающем процессе денатурации фермента в этих растворителях. Полученные результаты свидетельствуют в пользу высказанного ранее предположения о том, что несмешивающиеся с водой органические

растворители оказывают воздействие на каталитическую активность химотрипсина в момент переноса фермента из органического окружения в водное.

Реакции, катализируемые α -химотрипсином в воде и органических средах, подчиняются кинетической модели Михаэлиса-Ментен. Принимая, что модификация фермента, приводящая к усложнению механизма каталитического процесса, маловероятна, причиной, вызывающей искажение формы кинетических кривых, может являться зависимость параметров уравнения Михаэлиса-Ментен от времени. Поскольку максимальная скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации фермента, процессы, приводящие к изменению содержания каталитически активной формы фермента (денатурация или ренатурация), будут приводить к изменениям величины максимальной скорости ферментативной реакции в ходе регистрации кинетической кривой, приводя к ее искажению. В случае, если фермент ренатурирует при протекании каталитической реакции, интегральное уравнение Михаэлиса-Ментен необходимо модифицировать следующим образом:

$$K_M \ln \left(\frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} \right) + [P] = -V_{\max} \left(\frac{k_p t + e^{-k_p t} - 1}{k_p} \right) \quad (1)$$

где $[P]$ – концентрация продукта реакции, $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата, k_p – константа скорости ренатурации.

Характерной особенностью кинетической кривой, постоянного уравнению 1, является наличие «индукционного» периода (рис. 11). Кинетические кривые с подобными искажениями начального участка были обнаружены при инкубации химотрипсина в некоторых смесях вода-метанол и вода-пропанол-1.

В случае, если фермент частично денатурирует в ходе реакции, интегральное уравнение Михаэлиса-Ментен необходимо модифицировать следующим образом:

$$K_M \ln \left(\frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} \right) + [P] = V_{\max} \left(t(1 - \alpha) + \alpha \frac{e^{-k_d t} - 1}{k_d} \right) \quad (2)$$

где α – доля денатурирующего в ходе реакции фермента, k_d – константа скорости денатурации.

На рис. 12 представлена аппроксимация кинетической кривой, полученной в смеси вода-ацетонитрил с активностью воды 0.91 уравнением 2. Значения параметров уравнения 2, определенные из представленной аппроксимации составляют: $\alpha = 0.62$, $k_d = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

Модель, положенная в основу уравнения 2, заключается в предположении о частичной денатурации фермента в ходе реакции. Такой процесс кажется неожиданным, поскольку вода является естественным окружением биокатализаторов, стабилизирующим нативную каталитически активную конформацию ферментов. Можно предположить два механизма, которые могут вызывать подобную денатурацию.

Первый заключается в том, что молекулы фермента образуют в органической среде устойчивые агрегаты; входящие в эти агрегаты молекулы могут сохранять каталитическую активность, но при помещении в воду подвергаются аутолитическому расщеплению. Этот процесс заторможен в органических средах из-за недостатка воды – необходимого реагента для аутолитического процесса.

Второй механизм денатурации заключается в том, что молекула фермента связывает молекулы органического растворителя, в результате чего, при переносе в воду, конформацию фермента определяет уже не взаимодействие воды с ферментом, а взаимодействие воды с комплексом «фермент – органический растворитель». Наиболее выгодная конформация для такого комплекса может отличаться от нативной конформации фермента, что приводит к снижению каталитической активности.

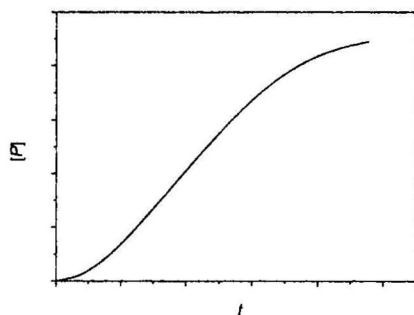


Рис. 11. Теоретическая кинетическая кривая, рассчитанная по уравнению 1.

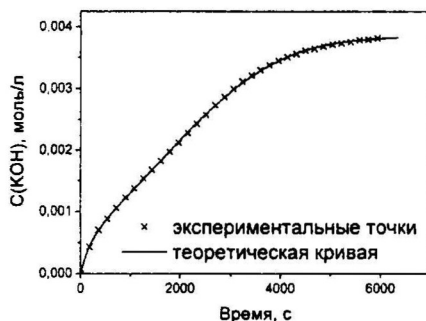


Рис. 12. Аппроксимация экспериментальной кинетической кривой уравнением 2.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. В соответствии с данными по влиянию смесей воды с протоноакцепторными растворителями (ацетонитрил, ацетон, диоксан, ТГФ, пиридин, ДМФА и ДМСО) во всем интервале составов на каталитическую активность и связывание профлавина α -химотрипсином, изученные органические среды можно разделить на две группы. Первую группу растворителей представляют ацетонитрил, ацетон, диоксан и тетрагидрофуран, вторую – пиридин, ДМФА и ДМСО. Деление растворителей на группы согласуется с протоноакцепторной способностью растворителя.
2. На основании данных по влиянию смесей воды с моноатомными алифатическими спиртами (метанол, этанол, пропанол-1 и бутанол-1) во всем интервале составов установлено, что в области высоких содержаний воды наибольшее денатурирующее действие проявляют пропанол-1 и бутанол-1. Величины пороговой термодинамической активности воды денатурации химотрипсина в высоководной области согласуются с гидрофобностью спиртов ($\log P$). В низководной области наибольшим инактивирующим действием обладают спирты с небольшим размером алкильного радикала – метанол и этанол, что согласуется с представлениями о доминирующей роли кинетических факторов в низководных средах.
3. Сопоставление данных полученных в протоноакцепторных растворителях и спиртах демонстрирует, что форма зависимости каталитической активности фермента от состава водно-органической смеси определяется соотношением между размером углеводородного радикала и способности растворителя к специфическому межмолекулярному взаимодействию.

4. Определены величины максимальной скорости и константы Михаэлиса ферментативной реакции катализируемой α -химотрипсином после инкубации в водно-органических смесях. Установлено, что инкубация фермента в органических средах не приводит значимым изменениям константы Михаэлиса, при этом наблюдается снижение максимальной скорости ферментативной реакции, что свидетельствует о снижении доли каталитически активной формы фермента. Исключение представляют ароматические органические растворители, такие как толуол и бензол, которые являются конкурентными ингибиторами химотрипсина, они вызывают повышение величин константы Михаэлиса ферментативной реакции в воде.

5. Предложены модифицированные формы интегрального уравнения Михаэлиса-Ментен, которые позволяют учитывать искажение форм кинетических кривых за счет процессов денатурации/ренатурации. Полученные уравнения хорошо аппроксимируют обнаруженные в работе искаженные кинетические кривые.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

- 1) Сироткин, В.А. УФ-спектрофотометрическое изучение связывания профлавина бычьим панкреатическим α -химотрипсином в смесях вода-ацетонитрил / В.А.Сироткин, Т.А. Мухаметзянов, Б.Н. Соломонов // Вестник МГУ, Серия 2, Химия, –2003. –Т. 44. –С.19-24.
- 2) Сироткин, В.А. Влияние ацетонитрила на связывание конкурентного ингибитора профлавина и каталитическую активность бычьего панкреатического α -химотрипсина / В.А.Сироткин, Т.А.Мухаметзянов // Журнал физической химии, – 2006. –Т.80. – С. 923-928.
- 3) Сироткин, В.А. Влияние диоксана на связывание конкурентного ингибитора профлавина и каталитическую активность бычьего панкреатического α -химотрипсина / В.А. Сироткин, Т.А. Мухаметзянов Ю.В. Карманова // Журн. физ. химии. –2007. – Т.81. –С.1160-1164.
- 4) Комиссаров, И.А. Денатурирующее действие ацетонитрила на каталитическую активность химотрипсина: влияние способа увлажнения фермента / Комиссаров И.А., Т.А.Мухаметзянов, В.А.Сироткин // Тез. докл. VI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» Казань, 28 апреля 2006 г., -Казань, -С. 62.
- 5) Карманова, Ю.В. Денатурирующее действие смесей вода – протоноакцепторный органический растворитель на каталитическую активность α -химотрипсина / Ю.В.Карманова, Т.А.Мухаметзянов, В.А.Сироткин // Тез. докл. VI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» Казань, 28 апреля 2006 г., -Казань, -С. 62.
- 6) Мухаметзянов, Т.А. Ферментативный гидролиз этилового эфира N-ацетил-L-тирозина в смесях вода-ацетонитрил по данным потенциометрического титрования / Т.А.Мухаметзянов, Ю.В.Карманова. И.А.Комиссаров. В.А.Сироткин // Тез. докл. V Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века», Казань, 26-27 апреля 2005 г., -Казань, -С. 63.
- 7) Соломонов, Б.Н. Связывание красителя профлавина бычьим панкреатическим химотрипсином в смесях вода-диоксан / Б.Н.Соломонов, Т.А.Мухаметзянов,

- В.А.Сироткин // Тез. докл. IX Международной конференции «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах», Плес, 28 июня-2 июля 2004 г., -Плес, -С.104.
- 8) Мухаметзянов, Т.А. Влияние протоноакцепторных органических растворителей на связывание профлавина химотрипсином / Т.А.Мухаметзянов, В.А.Сироткин, Б.Н.Соломонов // Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «ЛОМОНОСОВ – 2004», Секция Химия, Москва, 10-13 апреля 2004 г., -Москва, -Том I, -С.103.
- 9) Мухаметзянов, Т.А. Связывание профлавина бычьим панкреатическим химотрипсином в смесях вода-протоноакцепторный органический растворитель / Т.А.Мухаметзянов, В.А.Сироткин, Б.Н.Соломонов // Тез. докл. IV Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века», Казань, 16-17 марта 2004 г., -Казань, -С. 58.
- 10) Мухаметзянов, Т.А. Связывание α -химотрипсином профлавина в органических растворителях с низким содержанием воды / Т.А.Мухаметзянов, В.А. Сироткин, Б.Н.Соломонов // Тез. докл. XVII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Казань, 21-26 сентября 2003 г., -Казань, -С.106.
- 11) Мухаметзянов, Т.А. Связывание профлавина α -химотрипсином в смесях вода-органический растворитель по данным УФ-спектрофотометрии // Тез. докл. Итоговой научной студенческой конференции Казанского Государственного Университета 2003 года, -Казань, -С. 52-53
- 12) Мухаметзянов, Т.А. УФ-спектры профлавина в смесях вода-органический растворитель / Т.А.Мухаметзянов, В.А.Сироткин, Б.Н.Соломонов // Тез. докл. III Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века», Казань, 14-15 февраля 2003 г., -Казань, -С. 65.
- 13) Sirotkin, V. UV/VIS-spectrophotometric study of the interaction of proflavine with α -chymotrypsin in water-acetonitrile mixtures / V.Sirotkin, T.Mukhametzyanov, B.Solomonov // Тез. докл. международной конференции "BIOCATALYSIS 2002: Fundamentals & Applications" Москва, 22-27 июня 2002 г., -Москва, -С. 134-135.
- 14) Мухаметзянов, Т.А. Изучение связывания α -химотрипсином профлавина / Т.А.Мухаметзянов, В.А.Сироткин, Б.Н.Соломонов // Тез. докл. Республиканского конкурса научных работ среди студентов и аспирантов на соискание премии им. Н.И.Лобачевского, Казань, 1-2 марта 2002 г., -Казань, -Том II, -С. 36
- 15) Мухаметзянов, Т.А. Энтальпии взаимодействия сухого сывороточного альбумина человека со смесями вода-диоксан // Тез. докл. Итоговой научной студенческой конференции Казанского Государственного Университета, Казань, 2000 год, -Казань, -С. 37-38.



102

Отпечатано в ООО «Печатный двор».
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф.207
Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 25.01.2008г. Усл. п.л 1,2
Заказ № К-6500. Тираж 100 экз. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать - ризография.