



УДК 577.154 + 541.182 + 541.128

НОВЫЙ ПОДХОД К ТИТРОВАНИЮ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ
ФЕРМЕНТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МИЦЕЛЛ
ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

*Ишежецкий А. В., Ковальшева Г. В., Черноглазов В. М.,
Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартишек К*.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;
* Институт органической химии и биохимии, Прага, ЧССР*

Для титрования активных центров ферментов предложено использовать обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ в органических растворителях, обмен субстратом между которыми заторможен благодаря высокой вязкости среды, содержащей несшитые каучуки. С использованием в качестве мицеллообразователя аэрозоля ОТ определено содержание активного фермента в препаратах трипсина и целлюлазы, а также число агрегации аэрозоля ОТ в системе аэрозоль ОТ – вода – циклогексан.

В настоящее время метод определения концентрации активного фермента (титрование активных центров) выбирается индивидуально для каждого биокатализатора, исходя из специфики строения его активного центра и катализируемой реакции. Для многих ферментов приемлемых методов титрования активных центров вообще не найдено. В данной работе нами предложен универсальный подход к титрованию активных центров ферментов с использованием обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях – системы, находящей все более широкое применение в различных областях энзимологии (см., например, обзоры [1–4]).

Известно [5, 6], что при определенном подборе условий (природа ПАВ и органического растворителя, степень гидратации (молярное соотношение $[H_2O]/[ПАВ]$), концентрация солюбилизированного белка) обращенные мицеллы одинаковы по размерам, хотя лишь часть их содержит белок (одну молекулу на мицеллу). Перенос субстрата между мицеллами осуществляется как через объемную органическую фазу (гидрофобный субстрат), так и непосредственно из внутренней части одной мицеллы во внутреннюю часть другой при столкновении мицелл (гидрофильный субстрат). В обоих случаях такой перенос существенно быстрее ферментативных реакций [7, 8–12]. Именно поэтому ферментативные реакции в обращенных мицеллах протекают в чисто кинетическом режиме; обычно это расценивают как одно из важнейших достоинств микрогетерогенных систем на основе обращенных мицелл [1–4, 13].

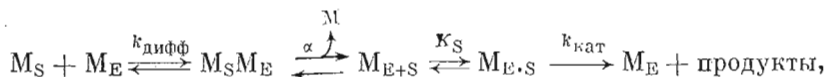
Между тем перевод ферментативной реакции в обращенных мицеллах из кинетического режима в диффузионный может оказаться важным методическим приемом в энзимологии. Дело в том, что в отсутствие межмицеллярного переноса субстрата ферментативному превращению подвергается только та его часть, которая локализована в ферментсодержащих мицеллах. Иными словами, количество образовавшегося продукта будет пропорционально концентрации активного фермента. На наш взгляд, такое титрование активных центров фермента в обращенных мицеллах проще всего реализовать, используя водорастворимые субстраты, когда все реагенты локализованы в мицеллярной фазе. Межмицеллярный перенос субстрата в такой системе можно подавить, препятствуя столкновениям

Принятые сокращения: ПАВ – поверхностно-активное вещество, NPG – *n*-нитроацилид *N*-глутарил-*L*-фенилаланина, АОТ – аэрозоль ОТ.

мицелл, например, понижением температуры или увеличением вязкости объемной фазы. В данной работе описано определение концентрации активного фермента в обращенных мицеллах аэрозоля ОТ (АОТ) в условиях, когда вязкость органического растворителя значительно повышена путем растворения в нем несшитых каучуков.

Кинетическая теория ферментативных реакций в обращенных мицеллах ПАВ в органическом растворителе в условиях высокой вязкости среды

Ферментативное превращение водорастворимого субстрата в обращенных мицеллах можно описать следующей схемой:



где E — фермент, S — субстрат, E·S — фермент-субстратный комплекс; M, M_S, M_E, M_{E+S}, M_{E·S} — мицеллы, содержащие компонент, указанный индексом. Эта схема состоит из двух частей — диффузионной и кинетической. Скорость диффузии можно выразить следующим образом:

$$v = k_{\text{дифф}} \alpha [M_S] [M_E], \quad (1)$$

где [M_S] и [M_E] — концентрации фермент- и субстратсодержащих мицелл, k_{дифф} — константа скорости диффузии мицелл, α — коэффициент, отражающий вероятность переноса субстрата в ферментсодержащую мицеллу при столкновении мицелл. Показано [10], что приблизительно одно из 10 000 столкновений мицелл приводит к обмену субстратом, т. е. α ≈ 10⁻⁴. В свою очередь, константа скорости диффузии мицелл, согласно уравнению Стокса — Эйнштейна, определяется следующим уравнением:

$$k_{\text{дифф}} = 4\pi (D_M^E + D_M^S)(R_M^E + R_M^S), \quad (2)$$

где D_M^E и D_M^S — коэффициенты диффузии, а R_M^E и R_M^S — гидродинамические радиусы фермент- и субстратсодержащих мицелл. Если обращенные мицеллы представляют собой сферические частицы одинакового размера, выражение (2), согласно уравнению Смолуховского, преобразуется к виду

$$k_{\text{дифф}} = \left(\frac{4RT}{\eta} \right) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}, \quad (3)$$

где T — температура (K), R — универсальная газовая постоянная, η — вязкость объемной органической фазы. Как следует из уравнения (3), межмицеллярный перенос субстрата в системе можно подавить, заменив диффузию мицелл повышением вязкости или понижением температуры. Подставляя в выражение (1) значения α и k_{дифф} (рассчитанные по уравнению (3)), можно предположить, что для большинства ферментативных реакций при не слишком высокой концентрации мицелл (децимолярные растворы ПАВ) и температуре увеличение вязкости на три и более порядка приведет к переводу реакции в диффузионный режим.

При относительно низких концентрациях фермента (степень заполнения Θ = [M_E]/[M] < 0,1, где [M] — общая концентрация мицелл в растворе) фермент и субстрат распределяются между мицеллами равномерно и независимо друг от друга [5, 6]. Иными словами, выполняются соотношения

$$[M_E] = [E]_0; \quad [M_S] = [S]_0; \quad \frac{[M_{E+S}]}{[S]_0} = \frac{[E]_0}{[M]} = \Theta, \quad (4)$$

где [E]₀ и [S]₀ — начальные концентрации фермента и субстрата в системе.

В системе, находящейся в диффузионном режиме, скорость реакции

резко падает после того, как превращению подвергнутся все молекулы субстрата, первоначально находившиеся в одних мицеллах с молекулами фермента. Концентрация продукта, образовавшегося в результате этой быстрой стадии, будет равна $[P] = [M_{E+S}]$.

Таким образом, зная концентрацию ПАВ и число молекул ПАВ, входящих на одну мицеллу (число агрегации, n), начальную концентрацию субстрата и концентрацию продукта, образовавшегося в результате быстрой стадии реакции (так называемый начальный выброс), можно определить концентрацию активного фермента, $[E]_a$:

$$[E]_a = \frac{[\text{ПАВ}]}{n} \frac{[P]}{[S]_0} \quad (5)$$

С другой стороны, если известна концентрация активного фермента, можно решить обратную задачу — определить концентрацию обращенных мицелл и тем самым число агрегации ПАВ:

$$n = \frac{[\text{ПАВ}][P]}{[S]_0[E]_a} \quad (6)$$

Обе эти задачи нами были решены на примере реакций, катализируемых α -химотрипсином, трипсином и целлюбиазой, в мицеллярных растворах АОТ в октане и циклогексане.

Определение числа агрегации мицелл АОТ в системе АОТ — вода — циклогексан — каучук

На рис. 1 приведена зависимость скорости катализируемого α -химотрипсином гидролиза n -нитроанилида N -глутарил- L -фенилаланина (NGP) в обращенных мицеллах АОТ в циклогексане от вязкости раствора (определяемой содержанием нешищеного каучука). Наблюдаемая линейная зависимость может свидетельствовать либо о диффузионном режиме реакции (уравнение (1)), либо об ингибировании ферментативной реакции каучуком. Последнее предположение выглядит маловероятным в свете экспериментов с хлоридом 4-хлор-2-метилдiazобензола, который вступает с каучуком в реакцию азосочетания по двойным связям с образованием окрашенного продукта. В системе АОТ — вода — циклогексан этот водорастворимый реагент, включенный в обращенные мицеллы, не вступает в реакцию с растворенным в циклогексане каучуком. Отсюда следует, что молекулы каучука экранированы от внутренней водной полости мицеллы монослоем АОТ и, следовательно, в принципе не могут непосредственно влиять на ферментативную реакцию.

Как видно из рис. 1, скорость реакции начинает уменьшаться при содержании каучука в растворе 3%. Подставив в уравнение (1) численные значения вязкости, температуры и концентрации фермент- и субстратсодержащих мицелл (равные соответственно концентрациям фермента и субстрата), можно получить величину скорости межмицеллярного обмена субстратом $8,9 \cdot 10^{-10} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$. Эта скорость практически равна скорости ферментативного гидролиза NGP ($9,2 \cdot 10^{-10} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$), рассчитанной для данных

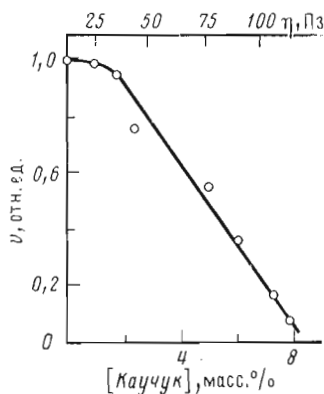


Рис. 1. Влияние содержания каучука в смеси на скорость катализируемого α -химотрипсином гидролиза NGP в обращенных мицеллах АОТ в циклогексане $[АОТ]=0,1 \text{ М}$; $0,02 \text{ М}$ трис-буфер, рН 9,0; $[E]_0=20 \text{ мкМ}$; $[S]_0=0,4 \text{ мМ}$; степень гидратации 8,3; 25° С

условий по уравнению Михаэлиса – Ментен. Значение $k_{кат}$ и K_m для мицеллярной системы АОТ – вода – октан, равные соответственно $9 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $3 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, были определены в работе [13]. Такое совпадение рассчитанных и экспериментальных данных свидетельствует о правильности сделанных выше предположений.

Повышение содержания каучука до 8% снижает скорость ферментативного гидролиза NCP почти на 2 порядка (см. рис. 1). В этих условиях, когда межмицеллярный обмен субстратом почти полностью подавлен, мы определили число агрегации АОТ (степень гидратации 8,3), используя препараты химотрипсина, различающиеся содержанием активного фермента (см. табл. 1). Среднее число агрегации ($n=120 \pm 50$) хорошо согласуется со значениями, ранее найденными из данных светорассеяния, ультрацентрифугирования [14] и ЯМР [15] ($n=114$). Отсюда следует, что каучук практически не влияет на число агрегации АОТ, т. е. на число мицелл.

Определение концентрации активного фермента. (Титрование активных центров)

Определив число агрегации АОТ в системе АОТ – вода – циклогексан, мы смогли измерить содержание активного фермента в препарате трипсина (см. табл. 2). Значения E_a , вычисленные с помощью уравнения (5), находятся в хорошем соответствии с результатами титрования трипсина *n*-нитрофенилгуанидинобензоатом (см. «Экспериментальную часть»). Для химотрипсина и трипсина известны более простые приемы определения концентрации активного фермента. Поэтому особенный интерес представляет использовать предложенный метод для таких ферментов, методы титрования которых были неизвестны. Мы применили описанный выше подход для определения концентрации активной целлюlobиазы (β -глюко-

Таблица 1

Определение числа агрегации АОТ в циклогексане

$[E]_a \cdot 10^6$	$[S]_0 \cdot 10^4$	$[P] \cdot 10^7$	$[M] \cdot 10^4$	n
М				
1,7	2,5	7	6,0	82
1,7	2,5	70	6,0	82
3,7	2,5	24	3,9	126
1,9	2,5	27	4,7	105
7,5	2,5	44	4,2	117
3,5	2,5	31	2,8	177
7,5	1,1	98	8,1	62
4,8	1,1	15	3,8	130
				4,1 120±50

Таблица 2

Титрование активных центров трипсина
 $[S]_0 = 4 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $[M] = 4,1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$

$[P] \cdot 10^6$	$[E]_0 \cdot 10^6$	$[E]_a \cdot 10^6$	$[E]_a/[E]_0, \%$
М			
2,6	1,0	2,7	37
4,9	2,0	5,0	25
4,2	1,5	4,3	35
			32±5

Таблица 3

Титрование активных центров целлюlobиазы
 $[S]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $[M] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $[E]_0 = 0,15 \text{ мг/мл}$;
 $[R]$ – концентрация хлорида 4-хлор-2-метилдiazобензола

$[R] \cdot 10^4, \text{ М}$	$[E]_a/[E]_0, \%$
5	9,7
2,5	13,7
1,0	13,6
12±2	

зидазы из гриба *Aspergillus japonicus*), являющейся одним из основных компонентов целлюлазного комплекса, так как разработка метода определения концентрации этого фермента в настоящее время исключительно актуальна.

Для титрования целлюбиазы мы использовали гидролиз 2-нафтил- β -D-глюкопирапозида (см. табл. 3). Для повышения чувствительности спектрофотометрического определения образующегося 2-нафтола его превращали в краситель ($\lambda_{\max}=430$ нм) реакцией с 4-хлор-2-метилдiazобензолом (см. «Экспериментальную часть»).

В заключение следует отметить общий характер предложенного подхода. В самом деле, он позволяет титровать активные центры любого фермента, способного катализировать спектрофотометрически детектируемую реакцию с водорастворимыми субстратами. Чувствительность метода может быть повышена использованием реакций, продукты которых обладают более высокими коэффициентами молярного поглощения, и увеличением концентрации субстрата в системе (несколько молекул субстрата на мицеллу).

В настоящей работе для инициации ферментативной реакции в мицеллярную систему, содержащую субстрат, вводили водный раствор фермента (несколько микролитров на 1 мл). Для ферментов с высокими каталитическими константами такой метод может оказаться неприемлемым, так как часть субстрата будет подвергаться превращению еще в процессе формирования «конечных» мицелл. В этом случае реакционную систему целесообразно готовить в условиях, когда фермент мало активен или неактивен. Так, например, систему можно готовить в условиях, далеких от рН-оптимума ферментативной реакции, и тогда фермент возможно активировать внесением в систему органорастворимой кислоты или основания (например, трифторуксусной кислоты, алкоголята натрия).

Помимо возможности титровать активные центры ферментов ферментативные мицеллярные системы с заторможенным межмицеллярным обменом позволяют исследовать истинные кинетические параметры ферментативной реакции внутри обращенной мицеллы, не осложненные влиянием межмицеллярных взаимодействий.

Экспериментальная часть

В работе использовался α -химотрипсин из поджелудочной железы крупного рогатого скота (КФ 3.4.21.1) производства фирмы Sigma (США), а также Олайнского завода химреактивов (как без предварительной очистки, так и очищенный гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (элюент — 1 мМ HCl). Содержание активного фермента в этих препаратах, определенное титрованием N-трансцианнаоимидазолом (Sigma, США) по методике [16], составляло соответственно 78, 48 и 70%.

Трипсин (КФ 3.4.21.4) производства Олайнского завода химреактивов использовался без дополнительной очистки. Содержание активного фермента в препарате, определенное титрованием *n*-нитрофенилгуанидидобензоатом (Sigma, США) по методике [17], составляло 32%.

Для определения содержания активной целлюбиазы (β -глюкозидазы, КФ 3.2.1.21) использовали частично очищенный препарат «Целлюбиазин 50X» отечественного производства с общим содержанием белка 92%. Для сравнения использовали высокоочищенную целлюбиазу из того же источника (*Aspergillus japonicus*), которая была выделена из культуральной жидкости с помощью ионообменной хроматографии на CM-сфереоне (Chemapol, СССР) и очищена хроматографией на DEAE-сфереоне, фенилсефарозе и высокоэффективным хроматофокусированием на колонке «Моно-P» (Pharmacia, Швеция). Выделенный таким образом фермент был одлороден по данным электрофореза в градиентном 4–30% ПААГ и аналитического изоэлектрофокусирования (молекулярная масса 120 кДа).

Аэрозоль ОТ (натриевая соль диизооктилового эфира сульфоянтарной кислоты; Merck, ФРГ), *n*-нитроанилид N-глутарил-L-фенилаланина (Reanal, ВНР), хлорид 4-хлор-2-метилдiazобензола (торговое название

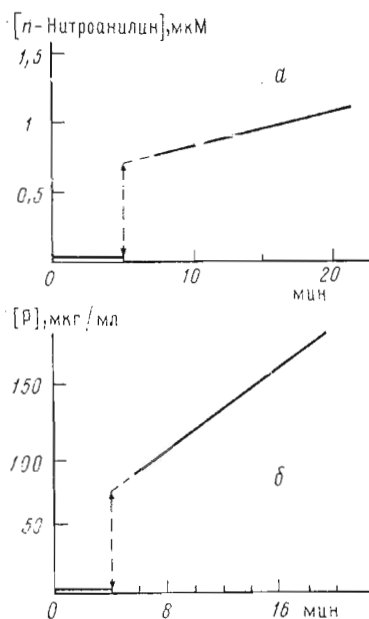


Рис. 2. Гидролиз NGR, катализируемый α -химотрипсином (а), и гидролиз 2-нафтил- β -D-глюкопиранозид, катализируемый целлюбиазой (б), в обращенных мицеллах АОТ в органическом растворителе, содержащем 8% каучука. Условия эксперимента «а» см. в подписи к рис. 1; б — $[AOT]=0,1$ М; $[E]_0=0,15$ мг/мл; $[S]_0=0,1$ мМ; $0,01$ М Натрий-ацетатный буфер, pH 3,5; степень гидратации 22; 25°C

Fast Red TR) и 2-нафтил- β -D-глюкопиранозид (Chemapol, ЧССР), синтетический изопреновый несшитый каучук СКИ-3с отечественного производства использовали без дополнительной очистки. Органические растворители — октан (Союзреактив, ч.) и циклогексан (Merck, ФРГ) очищали по методике, описанной в работе [18].

Определение концентрации активного фермента в препаратах α -химотрипсина и трипсина. В спектрофотометрическую кювету вносили 1 мл 0,1 М раствора АОТ в циклогексане, 10 мкл 20 мМ трис-буфера (pH 9,0) и 25 мкл 10–50 мМ раствора NGR в ацетоне. Смесь встряхивали 2–4 мин до полной прозрачности. Затем в кювету вносили 1 мл раствора каучука в циклогексане (0–20%), после чего смесь снова энергично встряхивали и измеряли ее оптическую плотность при 380 нм. Далее вносили 5 мкл 2–4 мМ в 1 мМ HCl раствора фермента, после чего смесь встряхивали в течение 1 мин. Концентрацию образующегося *p*-нитроанилина определяли по скачку оптической плотности при 380 нм ($\epsilon=10\,200$ М⁻¹·см⁻¹) (см. рис. 2а).

Определение концентрации активного фермента в препарате целлюбиазы. В спектрофотометрическую кювету вносили 1 мл 0,1 М раствора АОТ в октане, затем 7–15 мкл 10 мМ натрий-ацетатного буфера (pH 3,5), 8 мкл 25 мМ водного раствора 2-нафтил- β -D-глюкопиранозид, 2–10 мкл 0,1 М водного раствора хлорида 4-хлор-2-метилдiazобензола и встряхивали до полной солюбилизации. В прозрачный раствор вносили 1 мл раствора каучука в октане и перемешивали до полной однородности. Последним вносили 15 мкл раствора ферментного препарата (20 г/л), после чего измеряли скачок оптической плотности при 430 нм (см. рис. 2б) ($\epsilon=19\,500$ М⁻¹·см⁻¹). Все спектрофотометрические измерения были выполнены на приборах Beckman 25 (США) и SP 1800 (Pye Unicam, Англия) при 25°C .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. // Усп. химии. 1984. Т. 53. № 4. С. 545–564.
2. Levashov A. V., Khmelnistky Yu. L., Klyachko N. L., Martinek K. // Surfactants in solution. V. 2./Eds Mittal K. L., Lindman B. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 1069–1091.
3. Reversed micelles/Eds Luisi P. L., Straub V. E. N. Y.: Plenum Press, 1984. 350 P.
4. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л. // Бюл. мембраны. 1985. Т. 2. № 7. С. 669–680.
5. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Черняк Ю. Я., Мартинек К. // Биохимия, 1982. Т. 47. № 1. С. 86–89.

6. *Levashov A. V., Khmel'nitsky Yu. L., Klyachko N. L., Chernyak V. Ya., Martinek K.* // J. Coll. Interface Sci. 1982. V. 88. № 2. P. 444-457.
7. *Zulauf M., Eicke H. F.* // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. P. 480-486.
8. *Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Мартинек К.* // Вестн. МГУ. Сер. 2. ХИМИЯ. 1981. Т. 22. С. 195-199.
9. *Menger F. M., Donohue J. A., Williams R. F.* // J. Amer. Chem. Soc. 1973. V. 95. P. 286-288.
10. *Robinson B. H., Steyler D. C., Tack R. D.* // J. Chem. Soc. Faraday 1. 1979. V. 75. P. 481-496.
11. *Wong M., Thomas J. K., Gratzel M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. P. 2391-2397.
12. *Konno K., Miyazawa K., Kitachara A.* // Bull. Chem. Soc. Japan. 1975. V. 48. P. 2955-2956.
13. *Левашов А. В., Клячко Н. Л., Пантин В. И., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К.* // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 6. С. 929-943.
14. *Day R. A., Robinson B. H., Clarke Y. H. R., Doherty Y. V.* // J. Chem. Soc. 1979. V. 75. P. 132-139.
15. *Maitra A.* // J. Phys. Chem. 1984. V. 88. P. 5122-5125.
16. *Schonbaum B. R., Zerner B., Bender M. L.* // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. P. 2930-2935.
17. *Chase T. Jr., Show E.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1967. V. 29. P. 508-514.
18. Purification of laboratory chemicals./Eds Perriu D. D., Arwarego W. L. F., Perriu D. R. N. Y.: Plenum Press, 1985. 568 P.

Поступила в редакцию
13.VII.1988

После доработки
31.X.1988

A NEW APPROACH TO THE ACTIVE-SITE TITRATION OF ENZYMES USING THE SURFACTANT REVERSED MICELLES IN APOLAR ORGANIC SOLVENTS

PSHEZHETSKY A. V., KOVALYSHEVA G. V., CHERNOGLAZOV V. M.,
LEVASHOV A. V., KLYACHKO N. L., MARTINEK K.*

*M. V. Lomonosov Moscow State University,
Chemistry Department:*

* *Institute of Organic Chemistry
and Biochemistry, Prague*

Micellar solutions of surfactant in organic solvents with rubber additions are proposed for determination of active enzyme concentration. A kinetic theory of enzymatic reactions in reversed micellar systems is developed, suggesting the intermicellar transport of the substrate to be the limiting step in viscous medium. Under these conditions, it is shown that the fraction of the product formed after quick transformation of the substrate located in the enzyme-containing micelles depends upon active enzyme concentration and aggregation number of surfactant molecules. The proposed approach is used for the active-site titration of trypsin and cellobiase and for the determination of the aggregation number of Aerosol OT (AOT) molecules in the ternary system AOT/water/cyclohexane.