



УДК 577.155.3.02

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ И РАВНОВЕСНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА

*Ныс П. С., Кольцова Э. В., Карнов В. Я.,
Митрофанов В. Б., Левитов М. М.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков,
Институт прикладной математики Академии наук СССР,
Москва*

Исследован процесс гидролиза бензилпенициллина препаратами пенициллин-амидазы из *E. coli*. Гидролитическое расщепление бензилпенициллина в диапазоне концентраций $(0,84-6,8) \cdot 10^{-2}$ М проводили препаратами нативной и иммобилизованной пенициллинамидазы (КФ 3.5.1.11). В работе дано математическое описание экспериментальной зависимости изменения концентрации 6-аминопенициллановой кислоты от времени и разработан метод, позволяющий на основе полных кривых энзиматического гидролиза бензилпенициллина определять некоторые кинетические и равновесные параметры процесса. Показано, что кривые полного гидролиза бензилпенициллина, проведенного нативной и иммобилизованной пенициллинамидазой, идентичны и описываются одними и теми же уравнениями.

Ферментативный способ получения 6-аминопенициллановой кислоты — ядра пенициллинов — основан на гидролизе бензилпенициллина пенициллинамидазой (КФ 3.5.1.11). Изучению кинетики гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой, и расчету констант скоростей посвящен ряд работ [1—4]. Однако во всех случаях определение констант ферментативной реакции требовало трудоемких графических методов расчета.

Нами предложена математическая модель процесса ферментативного гидролиза бензилпенициллина и разработан метод, который позволяет на основе полной кривой гидролиза бензилпенициллина определить кинетические и равновесные параметры реакций.

При гидролизе бензилпенициллина, катализируемом пенициллинамидазой, происходит разрыв пептидной связи $-\text{CO}-\text{NH}-$ в молекуле пенициллина, в результате чего образуется два продукта: 6-аминопенициллановая и фенилуксусная кислоты. Следовательно, о процессе гидролиза можно судить по накоплению 6-аминопенициллановой кислоты или по расходу щелочи, идущей на титрование выделяющейся фенилуксусной кислоты.

Кривые накопления обоих продуктов в процессе гидролиза бензилпенициллина, катализируемого нативной и иммобилизованной пенициллинамидазой (рис. 1), показывают, что субстрат в данных условиях гидроли-

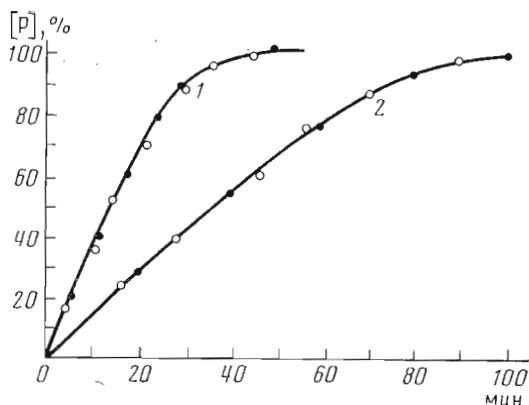


Рис. 1. Выход 6-аминопенициллановой кислоты [P] при гидролизе бензилпенициллина, катализируемом нативной (светлые кружки) и иммобилизованной (темные кружки) пенициллинамидазой: 1 — $[S]_0 1,68 \cdot 10^{-2}$ M, $[E]_0 2,4 \cdot 10^{-7}$ M; 2 — $[S]_0 6,8 \cdot 10^{-2}$ M, $[E]_0 4,8 \cdot 10^{-7}$ M. Для фенилуксусной кислоты получена идентичная кривая

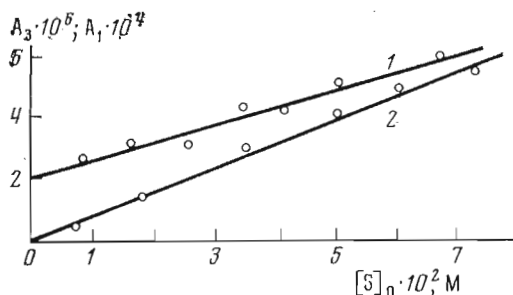


Рис. 2. Зависимость коэффициентов $A_1(1)$ и $A_3(2)$ от концентрации бензилпенициллина

зуется полностью, количество образующейся 6-аминопенициллановой кислоты эквивалентно количеству фенилуксусной кислоты и составляет 100%, кривые гидролиза бензилпенициллина нативным и иммобилизованным ферментом совпадают.

Ранее [3, 4] было показано, что при гидролизе бензилпенициллина, катализируемом пенициллинамидазой, могут иметь место конкурентное ингибирование фенилуксусной кислотой (K_i), некооперативное ингибирование 6-аминопенициллановой кислотой (K_i') и ингибирование субстратом (K_i''). Математическое описание каждого из процессов и совместное решение системы уравнений приводит к уравнению (1), характеризующему накопление продукта (P) во времени (τ):

$$[E]_0 \tau = \frac{1 - K_m \left(\frac{1}{K_i} + \frac{1}{K_i'} \right) + \frac{[S]_0}{K_i''}}{k_2} [P] + \frac{1}{K_i'} - \frac{1}{K_i''} [P]^2 - \frac{K_m}{k_2} \left[1 + [S]_0 \left(\frac{1}{K_i} + \frac{1}{K_i'} \right) \right] \ln \left(1 - \frac{[P]}{[S]_0} \right). \quad (1)$$

В общем виде это уравнение можно выразить следующим образом:

$$[E]_0 \tau = A_1 [P] + A_2 [P]^2 - A_3 \ln \left(1 - \frac{[P]}{[S]_0} \right), \quad (2)$$

где A_1, A_2, A_3 — коэффициенты перед слагаемыми правой части уравнения (1). Как для простейшего механизма Михаэлиса, так и для механизмов, учитывающих возможность ингибирования продуктами реакции и субстратом, общая зависимость накопления продукта реакции от времени остается неизменной (уравнение 2). Изменяются лишь коэффициенты A_1, A_2, A_3 , которые в зависимости от механизма реакции определенным образом зависят от начальной концентрации субстрата $[S]_0$ и констант скоростей отдельных процессов.

Для различных механизмов ферментативной реакции коэффициенты A_1, A_2, A_3 можно выразить через соответствующие константы уравнения (1) (см. таблицу).

Описание экспериментальных кривых зависимости $[P]$ от τ сводится к поиску наилучшего (среднеквадратичного) приближения среди кривых, подчиняющихся уравнению (2). Начальные значения констант A_1, A_2, A_3 выбираются следующим образом. Для простейшего механизма Михаэлиса — Ментен уравнение (2) можно представить в координатах x, y в виде $y = a + bx$, где $y = [P]/\tau$, $x = \ln \left(1 - \frac{[P]}{[S]_0} \right)$ ($A_2^0 = 0$, см. таблицу). Тогда методом наименьших квадратов находятся величины a, b и из них величины k_2 и K_m , $A_1^0 = 1/k_2$, $A_3^0 = K_m/k_2$.

Критерием качества математической модели (2) может служить среднеквадратичное отклонение σ_τ теоретической кривой $[P]_\tau(\tau)$, задаваемой уравнением (2), от экспериментального набора значений $[P]_i$, соответствующих моментам времени τ_i ($i = 1, 2, \dots, n$). Тогда поиск констант A_1, A_2, A_3 , наилучшим образом удовлетворяющих эксперименту, сводится к поиску минимума функций трех переменных σ_A . В качестве начальной точки принимается найденный набор значений A_1^0, A_2^0, A_3^0 . Для поиска используется программа RANDOM (см. приложение).

Если ферментативная реакция соответствует хотя бы одному из представленных в таблице механизмов, мы можем выяснить, какой именно механизм не противоречит экспериментальным данным. Для этого, с точностью до ошибок, величины A_1 и A_3 должны либо линейно зависеть от $[S]_0$, либо быть постоянными.

Существующая зависимость A_1 и A_3 от $[S]_0$ (рис. 2) позволяет сделать вывод, что наш случай соответствует одному из механизмов (6, 7 или 8 в таблице). В исследованной нами области достаточно высоких концентраций субстрата линейная зависимость A_3 от $[S]_0$ (рис. 2, кривая 2) упрощается, принимая вид $y = bx$, и позволяет определить коэффициент b , равный $\frac{K_m}{k_2} \left(\frac{1}{K_i} + \frac{1}{K_1} \right)$. Зависимость A_1 от $[S]_0$ (рис. 2, кривая 1) может быть представлена выражением вида $y = c - dx$ (где $d = k_2/K_i''$, $c = \frac{1}{k_2} - b$) и, следова-

тельно, позволяет определить значения k_2, K_i'' и произведение $K_m \left(\frac{1}{K_i} + \frac{1}{K_1} \right)$, которые равны $3,45 \cdot 10^3 \text{ мин}^{-1}$, $0,26 \text{ М}$ и $0,32$ соответственно. Найденный набор констант является достаточным для описания полных кривых гидролиза субстрата в исследованном интервале концентраций и может быть использован для поиска оптимальных условий проведения данного процесса. Совпадение кривых гидролиза бензилпенициллина при использовании нативного и иммобилизованного ферментных препаратов (рис. 1) свидетельствует о том, что при иммобилизации не происходит существенных изменений каталитического участка активного центра фермента; отношение константы Михаэлиса и констант ингибирования остается неизменным, однако абсолютные значения могут различаться.

Значение коэффициентов A_1 , A_2 и A_3 в уравнении (2) для различных механизмов реакции

№	Механизм реакции	A_1	A_2	A_3
1	Механизм Михаэлиса — Ментен	$\frac{1}{k_2}$	0	K_m/k_2
2	Конкурентное ингибирование фенилуксусной кислотой	$\frac{K_m}{1 - K_1} \frac{1}{k_2}$	0	$\frac{K_m}{k_2} \left(1 + \frac{[S]_0}{K_1} \right)$
3	Неконкурентное ингибирование 6-аминопенициллановой кислотой	$\frac{K_m}{1 - K_1'} \frac{1}{k_2}$	$\frac{1}{2k_2 K_1'}$	$\frac{K_m}{k_2} \left(1 + \frac{[S]_0}{K_1'} \right)$
4	Конкурентное ингибирование фенилуксусной кислотой и неконкурентное ингибирование 6-аминопенициллановой кислотой	$\frac{1}{1 - K_m \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_1'} \right)} \frac{1}{k_2}$	$\frac{1}{2k_2 K_1'}$	$\frac{K_m}{k_2} \left[1 + [S]_0 \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_1'} \right) \right]$
5	Ингибирование субстратом	$\frac{[S]_0}{1 + K_1''} \frac{1}{k_2}$	$\frac{1}{-2k_2 K_1''}$	K_m/k_2
6	Ингибирование субстратом и конкурентное ингибирование фенилуксусной кислотой	$\frac{K_m}{1 - K_1} + \frac{[S]_0}{k_2 K_1''}$	$\frac{1}{-2k_2 K_1''}$	$\frac{K_m}{k_2} \left(1 + \frac{[S]_0}{K_1} \right)$
7	Ингибирование субстратом, и неконкурентное ингибирование 6-аминопенициллановой кислотой	$\frac{K_m}{1 - K_1'} + \frac{[S]_0}{k_2 K_1''}$	$\frac{1}{K_1'} - \frac{1}{K_1''}$	$\frac{K_m}{k_2} \left(1 + \frac{[S]_0}{K_1} \right)$
8	Ингибирование субстратом, конкурентное ингибирование фенилуксусной кислотой, неконкурентное ингибирование 6-аминопенициллановой кислотой	$\frac{1}{1 - K_m \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_1'} \right)} \frac{[S]_0}{k_2 K_1''}$	$\frac{1}{K_1'} - \frac{1}{K_1''}$	$\frac{K_m}{k_2} \left[1 + [S]_0 \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_1'} \right) \right]$

В настоящей работе нами была изучена кинетика гидролиза бензилпенициллина в интервале концентраций $(0,84-1,68) \cdot 10^{-2}$ М в таких условиях, когда достигается 100%-ная глубина превращения субстрата. Поскольку исследуемая нами система содержит два лабильных компонента — субстрат и один из продуктов реакции, 6-аминопенициллановую кислоту, — при изменении исходных параметров процесса необходимо учитывать возможность инактивации этих веществ. В таких случаях рассматриваемая система усложняется и для описания ее необходимо совместное решение системы уравнений, учитывающих как ферментативную реакцию, так и процессы инактивации субстрата, продукта и фермента.

В заключение сделаем одно замечание относительно метода нахождения констант A_1, A_2, A_3 . В описанном случае, видимо, можно использовать метод наименьших квадратов более последовательно и тем самым упростить задачу, исключив из решения случайный поиск. Действительно, уравнение (2) задает зависимость τ от $[P]$ в виде линейной комбинации трех функций, причем искомые величины A_1, A_2, A_3 — коэффициенты этой линейной комбинации. Поэтому численные значения величин A_1, A_2, A_3 можно найти путем решения системы нормальных уравнений (3)

$$\sum_{j=1}^3 A_j \left[\sum_{i=1}^n \psi_j [P]_i \psi_k [P]_i = \left[\sum_{i=1}^n \tau_i \psi_k [P]_i \right] \right], \quad (3)$$

$$k = 1, 2, 3, \dots; \psi_1 [P] = \frac{1}{[E]_0} [P]; \psi_2 [P] = \frac{1}{[E]_0} [P]^2; \psi_3 [P] = \\ = \frac{1}{[E]_0} \ln \left(1 - \frac{[P]}{[S]_0} \right).$$

При более сложной, нелинейной зависимости частных производных $\partial \tau / \partial A_i$ от искомых параметров A_i система уравнений, аналогичная системе (3), становится нелинейной, и в этом случае действительно необходимо применение случайного поиска.

Экспериментальная часть

Гидролиз калиевой соли бензилпенициллина 98%-ной чистоты проводили нативной и иммобилизованной пенициллинамидазой *E. coli* при рН 7,5, температуре 40° в 0,1 М КСl и постоянном перемешивании. Использовали нативную пенициллинамидазу с удельной активностью 450 ед./мг белка. Иммобилизованную пенициллинамидазу получали сочетанием приемов включения в структуру полиакриламидного геля и ковалентного связывания. В работе использовали фермент с активностью 5000 ед./г влажного носителя.

Единица активности нативного фермента соответствует количеству 6-аминопенициллановой кислоты (мкмоль), образующейся за 1 ч при гидролизе 0,016 М раствора бензилпенициллина при рН 7,5 и 40° [5]. Количество образующейся при гидролизе 6-аминопенициллановой кислоты определяли колориметрическим методом [5], фенилуксусной кислоты — потенциометрическим титрованием растворами NaOH.

Расчеты констант скоростей реакции проводился на ЭВМ БЭСМ-6 с использованием программы многомерного случайного поиска RANDOM.

Описание программы поиска

Программа предназначена для приближенного нахождения в прямоугольной области пространства входных параметров минимума критерия качества. Программа написана на языке ФОРТРАН и приспособлена для работы на ЭВМ БЭСМ-6. При незначительной переделке она может быть использована для работы на любой другой вычислительной машине, имеющей транслятор с языка ФОРТРАН. Программа RANDOM оформлена как подпрограмма. Вызов ее осуществляется оператором

$$\text{CALL RANDOM (X, XH, XB, NP, NS),} \quad (1.1)$$

где X — вещественный одномерный массив длины NP — координаты начальной точки поиска; XH — вещественный одномерный массив длины NP — нижней границы области поиска; XB — вещественный одномерный массив длины NP — верхней границы области поиска; NP — целое число или целая переменная — размерность пространства поиска; NS — целое число или целая переменная — управляющее число: его абсолютная величина определяет число серий случайных проб, а его знак служит признаком печати (при $NS > 0$ основная информация выводится на печать, при $NS < 0$ печати нет).

В вызывающей подпрограмме вещественные массивы X, XH, XB должны быть описаны, например, при помощи оператора

$$\text{DIMENSION X (NP), XH (NP), XB (NP),} \quad (1.2)$$

где вместо целой переменной NP должно стоять ее числовое значение. Для вычисления критерия качества в каждом отдельном случае должна быть составлена подпрограмма — функция CRIT (X)

```

FUNCTION CRIT (X)
DIMENSION X (NP)
.....
CRIT = .....
RETURN
END
    
```

где, как и в (1.2), в операторе DIMENSION вместо целой переменной NP должно стоять ее числовое значение. За оператором DIMENSION следует тело подпрограммы — функции CRIT (X), которая содержит запись конкретной процедуры вычисления критерия качества точки с координатами X. Вычисленное значение критерия присваивается вещественной переменной CRIT при помощи оператора присвоения.

После окончания работы подпрограммы RANDOM и возвращения в вызывающую программу или подпрограмму в ячейках вещественного массива X находятся координаты конечной точки поиска. Остальные фактические параметры (1.1) сохраняют значения, которые они имели при входе в подпрограмму RANDOM.

Программа RANDOM предназначена для поиска минимума критерия качества. Она работает увереннее, если в процессе поиска наилучшее значение критерия качества приближается к нулю. Поэтому, если заранее известно приближенное значение Q^* минимизируемой функции Q в точке минимума, за критерий качества следует принять функцию $(Q - Q^*)$. Описание программы см. в работе [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Self D. A., Kay C., Lilly M. D., Dunnill P. (1969) Biotechnol. and Bioeng., 11, 337—348.
2. Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M. D. (1972) Biochim. et biophys. acta, 276, 250—256.
3. Kutzbach C., Rauenbusch E. (1974) Hoppi-Seylers Z. physiol. Chem., 354, 45—53.
4. Березин И. В., Клесов А. А., Швидас В. К., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1974) Антибиотики, №10, 880—887.
5. Ныс Н. С., Савицкая Е. М., Колыгина Т. С. (1973) Антибиотики, № 3, 270—273.
6. Мятрофанов В. Б. (1974) Об одном алгоритме многомерного случайного поиска. Препринт № 118, М.

Поступила в редакцию
20.X.1975

После переработки
2.II.1976

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BENZYL PENICILLIN. DETERMINATION
OF SOME KINETIC AND EQUILIBRIUM PARAMETERS

NYS P. S., KOLTSOVA E. V., KARPOV V. Ya.,
MITROPHANOV V. B., LEVITOV M. M.

*All-Union Research Institute of Antibiotics, Moscow; Institute
of Applied Mathematics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The process of benzylpenicillin hydrolysis catalysed by native and immobilized penicillinamidase from *E. coli* was studied. A mathematical model of the process is proposed and a computer programme is described which allows to determine the kinetic and equilibrium parameters of the process from the analysis of a complete curve of benzylpenicillin hydrolysis.
