



УДК 577.112.6:577.152.34'135

ПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ СУБТИЛИЗИНОМ-72 В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

© 1999 г. И. В. Гетун, И. Ю. Филиппова[#], Е. Н. Лысогорская, А. В. Бачева, Е. С. Оксенойт*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 30.12.98 г. Принята к печати 23.02.99 г.

Проведено сравнительное изучение растворимости, стабильности и активности нативного субтилизина-72 и его комплекса с SDS в ряде полярных органических растворителей. Показана возможность катализа образования пептидной связи субтилизином, суспендированным в ацетонитриле, и комплексом SDS–субтилизин, растворенным в этаноле и изопропаноле. С помощью SDS–субтилизина получены: трипептид Z-Ala-Ala-Leu-pNA, тетрапептиды общей формулы A-Ala-Ala-P₁-P₁'-B, где A = Z или Abz; P₁ = Leu, Phe, Met, Trp, Ile, Tyr, Phe(NO₂), Glu(OCH₃), P₁' = Leu, Phe, Glu, Ala, Ile, Val, Arg; B = NH₂, pNA, Ded; пентапептиды Z-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-Ala-Phe-pNA, гексапептид Abz-Val-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded. Под действием SDS–субтилизина проведена олигомеризация трипептида H-Phe-Ala-Leu-OCH₃ в этаноле с получением 63% три- и 37% тетраолигомеров соответственно. Показано, что SDS–субтилизин является более эффективным катализатором, чем нативный фермент в виде суспензии.

Ключевые слова: ферментативный пептидный синтез; органические растворители; субтилизин; SDS–субтилизин.

Субтилизин (сериновая протеиназа, КФ 3.4.21.14) – распространенный, доступный фермент микробного происхождения, обладающий широкой субстратной специфичностью. Этим обусловлено его активное использование в различных вариантах ферментативного пептидного синтеза [1–5]. В последнее время интенсивно развиваются подходы, связанные с проведением реакций образования пептидной связи с помощью ферментов в органических растворителях, что способствует улучшению растворимости субстратов и создает предпосылки для синтеза протяженных гидрофобных пептидов. В связи с этим актуальными являются исследования, направленные на изучение свойств протеиназ, участвующих в образовании пептидной связи, в неводной среде.

Цель данной работы – изучение возможностей проведения пептидного синтеза, катализируемого субтилизином-72 [6] (далее – субтилизин) в полярных органических растворителях в отсутствие носителя. Было исследовано поведение нативного субтилизина в ацетонитриле, диоксане, тетра-

гидрофуране, этаноле, наиболее часто используемых в пептидном синтезе [7–11]. Содержание фермента оценивали спектрофотометрически, считая молярные коэффициенты поглощения субтилизина в органических растворителях равными соответствующим коэффициентам нативного белка в воде. Лиофильно высушенный фермент вносили в органический растворитель, при этом в ацетонитриле и диоксане субтилизин образовывал мелкодисперсную (низкоконцентрированную) суспензию [12], а в тетрагидрофуране и в этаноле растворялся в концентрациях 20 и 7 мкМ, соответственно.

Другой подход, позволяющий адаптировать ферменты к функционированию в полярных органических растворителях, состоит в использовании комплекса фермента с анионным детергентом (например, с SDS). Для α-химотрипсина и субтилизина BPN' было показано, что их комплексы с SDS растворимы в полярных органических растворителях и сохраняют свою каталитическую активность [13, 14].

Нами была изучена растворимость и стабильность комплекса субтилизина с SDS в метаноле, этаноле, изопропаноле, диоксане, тетрагидрофуране, ацетонитриле. Комплекс SDS–субтилизин получали по методу, описанному в работе [13], путем добавления концентрированного водного

Сокращения: Abz – о-аминобензоил; Z – бензилоксикарбонил; Phe(NO₂) – п-нитрофенилаланин; pNA – п-нитроанилин; Ded – 2,4-динитрофенилэтилендиамин; Nba – п-нитробензиламин. Все аминокислоты – L-ряда.

[#] Автор для переписки (e-mail: filip@belsin.genebee.msu.su; факс: (095) 932-88-46).

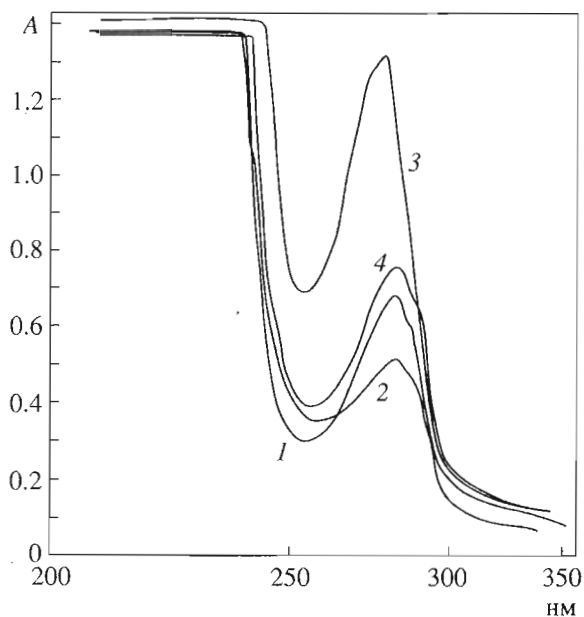


Рис. 1. УФ-спектры раствора комплекса SDS-субтилизин в этаноле (1), изопропанол (2), тетрагидрофуране (3) и раствора нативного субтилизина в воде, содержащей 1 мМ CaCl_2 (4).

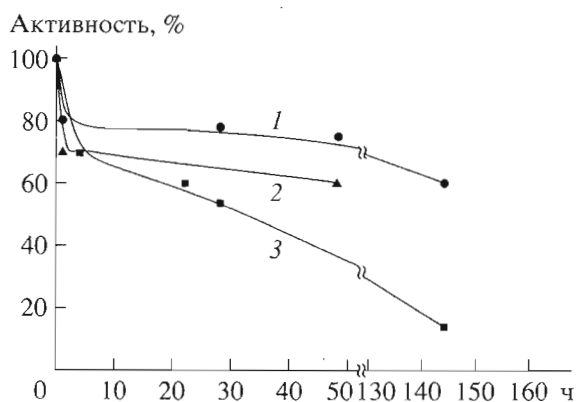


Рис. 2. Стабильность SDS-субтилизина в этаноле (1), изопропанол (2) и субтилизина в ацетонитриле (3).

раствора SDS к раствору субтилизина в воде, содержащему 1 мМ CaCl_2 при pH 5.5. Молярное соотношение $[\text{SDS}]/[\text{E}]$ составляло 50 : 1, концентрация детергента – 2.4 мМ, что примерно в 3 раза ниже критической концентрации мицеллообразования.

Лиофильно высушенный осадок комплекса перемешивали в течение 1–1.5 ч в соответствующих растворителях, после чего центрифугировали и измеряли оптическое поглощение супернатантов при 280 нм. Субтилизин в составе комплекса плохо растворялся в диоксане (A_{280} 0.1), значительно лучше в изопропанол (A_{280} 0.5), этаноле (A_{280} 0.8), тетрагидрофуране (A_{280} 1.3), а в ме-

танол и ацетонитриле образовывал суспензию. УФ-спектры исходного раствора субтилизина в воде и растворов комплекса SDS-субтилизин в органических растворителях практически не различаются (рис. 1). Кажущаяся величина растворимости белка составила 3 мкМ в диоксане, 17 мкМ в изопропанол, 25 мкМ в этаноле, 40 мкМ в тетрагидрофуране.

За активностью субтилизина и его комплекса с SDS следили по расщеплению хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA [15], после разбавления пробы фермента в органическом растворителе большим объемом воды. Установлено, что субтилизин наиболее стабилен в виде суспензии в ацетонитриле (активности водного раствора субтилизина и субтилизина, суспендированного в ацетонитриле, практически не отличались). Фермент, суспендированный в диоксане, через 15 ч сохранял всего 10% активности [12] и полностью инактивировался при растворении в тетрагидрофуране и в этаноле. Напротив, раствор комплекса SDS-субтилизина в этаноле и изопропанол сохранял высокую активность в течение длительного времени (рис. 2), что хорошо согласуется с аналогичными данными для субтилизина BPN' [13]. В диоксане, метаноле, тетрагидрофуране и ацетонитриле комплекс субтилизина с SDS был неактивен.

Таким образом, было обнаружено, что наиболее активным и стабильным фермент оказался в ацетонитриле в виде суспензии нативного субтилизина и в спиртах (изопропанол и этаноле) в виде комплекса SDS-субтилизин, причем в последнем случае как активность, так и стабильность были выше (рис. 2).

Было проведено сравнение каталитической эффективности субтилизина, суспендированного в ацетонитриле и растворенного в виде комплекса с SDS в спиртах в пептидном синтезе на примере подробно изученной ранее в водно-органических средах [16] модельной реакции синтеза Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA из Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ и Phe-pNA (схема 1).

За ходом реакции между amino- и карбоксильным компонентами в эквимольных количествах следили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Была изучена зависимость выхода Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA от времени и от концентрации фермента при комнатной температуре.

При катализе данной реакции суспензией субтилизина в ацетонитриле ($[\text{S}]/[\text{E}] = 10^5 : 1$) через 2 ч выход составил всего 3%. Только через 7 сут выход продукта достиг 90% (рис. 3). Очевидно, что при таком содержании фермента эффективность синтеза низка. При том же соотношении $[\text{S}]/[\text{E}]$ в случае катализа реакции SDS-субтилизин за 2 ч выход продукта также относительно низок и составляет 14%. Однако достаточно высокая

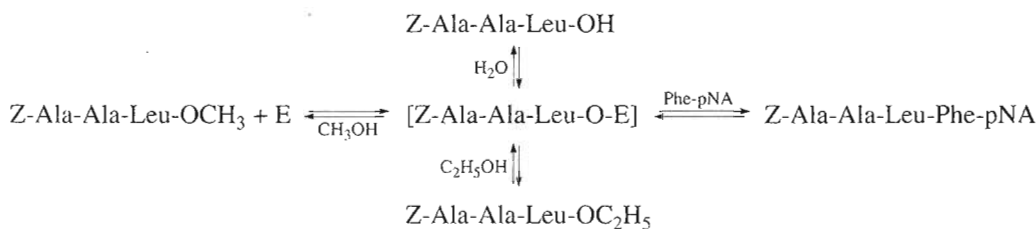


Схема 1.

растворимость SDS–субтилизина в спиртах позволяет повысить концентрацию фермента в реакционной смеси. При этом максимальное значение выхода модельного пептида через 2 ч реакции достигается при концентрациях фермента выше 7 мкМ (молярное соотношение $[S]/[E] = 5 \times 10^3 : 1$) (рис. 4).

В этих условиях в этаноле через 30 мин выход Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA составлял 56%, а через 2 ч – 87%, после чего содержание продукта не менялось в течение 8 ч. В изопропанолe процесс шел медленнее, и выход 80% достигался через 8 ч (рис. 5).

Мы попытались воспроизвести эксперимент по пептидному синтезу с использованием субтилизина, суспендированного в ацетонитриле при соотношении $[S]/[E] = 10^3 : 1$ [12]. На примере реакции $\text{Z-Ala-Ala-OCH}_3 + \text{Leu-pNA} \rightarrow \text{Z-Ala-Ala-Leu-pNA} + \text{CH}_3\text{OH}$ показано, что через 2 ч выход продукта составил только 14%, тогда как в случае катализа реакции тем же количеством SDS–субтилизина в этаноле выход достигал 50%. Кроме того, ранее было установлено, что увеличение концентрации фермента в суспензии приводит к образованию побочных продуктов двойного присоединения нуклеофила – Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA, отсутствующих при использовании SDS–субтилизина [12, 17].

Применение комплекса SDS–субтилизина как катализатора позволило синтезировать с достаточно высокими выходами целый ряд (три-гекса)пептидов, содержащих флуорофорные и хромофорные группировки (таблица), которые могут быть использованы как хромогенные и флуорогенные субстраты для различных протеиназ. Ацилирующими компонентами обычно являлись метиловые эфиры пептидов, содержащие в P₁-положении остатки Leu, Ala, Phe, Met, Trp, Tug, а также Phe(NO₂) или Glu(OCH₃). В качестве аминокомпонентов использовались различные амиды и *n*-нитроанилиды аминокислот и пептидов, содержащие в P₁'-позиции остатки Ala, Phe, Leu, Glu, Val, Ile, Arg. Интересно отметить, что в некоторых случаях в качестве ацилирующего компонента оказались эффективными *N*-защищенные трипептиды со свободной карбоксильной группой. При этом, например, выход Z-Ala-Ala-

Leu-Phe-pNA мало различался при использовании Z-Ala-Ala-Leu-OH или Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ (80 и 87% соответственно) (таблица). Вероятно, в выбранных условиях активация карбоксильной группы не так важна, как при проведении аналогичных реакций в водно-органических смесях, где такой же выход продукта наблюдался только через

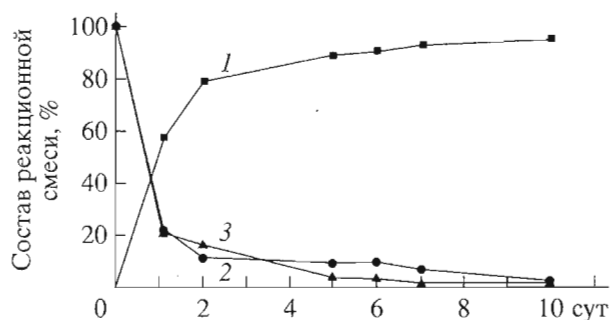


Рис. 3. Синтез Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA, катализируемый суспензией субтилизина в безводном ацетонитриле. ($[S]/[E] = 10^5 : 1$); Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA (1), Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ (2), Phe-pNA (3).

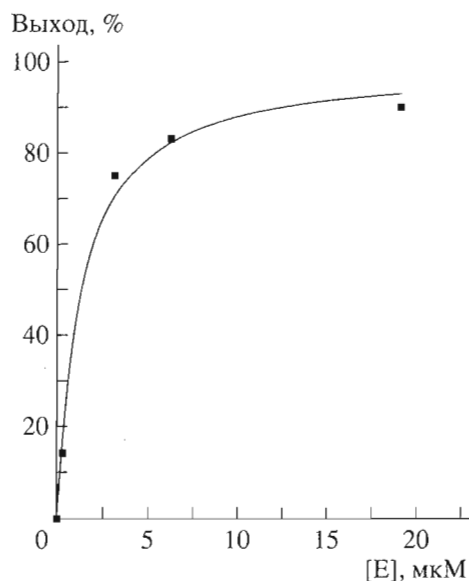


Рис. 4. Зависимость выхода Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA от концентрации SDS–субтилизина в этаноле. Условия: [S] 31 мМ, 30% DMF, 2 ч.

Характеристики пептидов, синтезированных с помощью SDS-субтилизины^а. Условия проведения конденсации: 31 мМ ацилирующий компонент, 31 мМ аминокислотный компонент, 6 мМ SDS-субтилизин в этаноле; 20°C, 2 ч

| Ацилирующий компонент | Аминокислотный компонент | Продукт | Выход ^а , % | ВЭЖХ, время удерживания, мин | Аминокислотный состав, нмоль в образце ^б |
|---|--------------------------|--|------------------------|------------------------------|--|
| Z-Ala-Ala-OCH ₃ | H-Leu-pNA | Z-Ala-Ala-Leu-pNA (1) ^г | 50 | 23.2 | Ala 4.2(2), Leu 2.4(1) |
| Z-Ala-Ala-Leu-OCH ₃ | H-Phe-pNA | Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA (2) ^г | 87(82) | 25.7 | Ala 10.4(2), Leu 5.5(1), Phe 5.2(1) |
| Z-Ala-Ala-Leu-OH | » | Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA (2a) | 80 | 25.7 | |
| Z-Ala-Ala-Phe-OH | » | Z-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA (3) ^г | 45 | 25.7 | Ala 14.8(2), Phe 13.3(2) |
| Z-Ala-Ala-Leu-OCH ₃ | H-Leu-pNA | Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA (4) ^г | 98 ^б (80) | 25.7 | Ala 4.0(2), Leu 4.1(2) |
| » | H-Glu-pNA | Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNA (5) | 84 | 15.6 | Ala 8.3(2), Leu 4.1(1), Glu 4.0(1) |
| » | H-Ala-Ala-pNA | Z-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-pNA (6) ^г | 95 | 21.5 | Ala 40.4(4), Leu 9.1(1) |
| » | H-Ala-Phe-pNA | Z-Ala-Ala-Leu-Ala-Phe-pNA (7) ^г | 82 | 24.9 | Ala 24.4(3), Leu 11.0(1), Phe 9.7(1) |
| » | H-Phe-NH ₂ | Z-Ala-Ala-Leu-Phe-NH ₂ (8) ^г | 50 ^б | 18.5 | Ala 8.8(2), Leu 4.3(1), Phe 3.6(1) |
| » | H-Leu-NH ₂ | Z-Ala-Ala-Leu-Leu-NH ₂ (9) ^г | 50 ^б | 18.4 | Ala 10.6(2), Leu 8.4(2) |
| Z-Ala-Ala-Met-OCH ₃ | H-Phe-pNA | Z-Ala-Ala-Met-Phe-pNA (10) ^г | 86 | 23.7 | Ala 3.4(2), Phe 1.9(1) |
| Z-Ala-Ala-Trp-OCH ₃ | » | Z-Ala-Ala-Trp-Phe-pNA (11) ^г | 33 | 24.2 | Ala 4.3(2), Phe 2.1(1) |
| Z-Ala-Ala-Phe(NO ₂)-OCH ₃ | » | Z-Ala-Ala-Phe(NO ₂)-Phe-pNA (12) | 85 | 27.7 | Ala 2.6(2), Phe 0.6(1), Phe(NO ₂) 0.8(1) |
| Z-Ala-Ala-Glu(OCH ₃)-OCH ₃ | » | Z-Ala-Ala-Glu(OCH ₃)-Phe-pNA (13) | 85 | 20.2 | Ala 1.9(2), Phe 1.0(1), Glu 1.1(1) |
| Z-Gly-Gly-Tyr-OCH ₃ | » | Z-Gly-Gly-Tyr-Phe-pNA (14) | 60 | 22.7 | Gly 2.2(2), Phe 0.9(1), Tyr 0.9(1) |
| Abz-Ala-Ala-OCH ₃ | » | Abz-Ala-Ala-Phe-pNA (15) | 30 ^б | 19.3 | |
| Abz-Val-Ala-Phe-OCH ₃ | H-Leu-pNA | Abz-Val-Ala-Phe-Leu-pNA (16) | 80 | 25.5 | Ala 5.7(1), Leu 4.9(1), Phe 4.1(1), Val 4.7(1) |
| » | H-Ile-pNA | Abz-Val-Ala-Phe-Ile-pNA (17) | 44 | 26.3 | Ala 12.0(1), Ile 10.5(1), Phe 9.7(1), Val 10.4(1) |
| » | H-Val-pNA | Abz-Val-Ala-Phe-Val-pNA (18) | 75 | 23.1 | Ala 4.4(1), Phe 4.6(1), Val 9.7(2) |
| » | H-Ala-pNA | Abz-Val-Ala-Phe-Ala-pNA (19) | 45 ^б | 19.7 | Ala 9.5(2), Phe 3.9(1), Val 4.1(1) |
| » | H-Arg-pNA | Abz-Val-Ala-Phe-Arg-pNA (20) | 86 | 18.7 | Ala 4.6(1), Phe 3.9(1), Val 3.5(1), Arg 5.3(1) |
| » | H-Phe-Ded | Abz-Val-Ala-Phe-Phe-Ded (21) | 85 ^б | 24.7 | Ala 8.7(1), Phe 13.7(2), Val 8.0(1) |
| » | H-Phe-Ala-Ala-Ded | Abz-Val-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded (22) | 70 ^б | 24.7 | Ala 15.3(3), Phe 8.4(2), Val 5.1(1) |
| » | H-Phe-Nba | Abz-Val-Ala-Phe-Phe-Nba (23) | 80 ^б | 23.7 | Ala 5.6(1), Phe 9.6(2), Val 4.9(1) |

^а В скобках приведен препаративный выход пептида.

^б Время проведения реакции 24 ч.

^в В скобках приведено число аминокислотных остатков.

^г Пептид был синтезирован нами ранее [17].

12 ч при двойном избытке ацилирующего компонента [16].

С помощью комплекса SDS–субтилизин при соотношении $[S]/[E] = 3 \times 10^4 : 1$ мы провели также олигомеризацию метилового эфира трипептида $H\text{-Phe-Ala-Leu-OCH}_3$ в этаноле с выходом 63% три- и 37% тетраолигомеров (схема 2).

Таким образом, было показано, что субтилизин способен катализировать разнообразные реакции образования пептидной связи в среде безводных органических растворителей, находясь в виде суспензии или в растворенном состоянии в форме комплекса с SDS. С помощью субтилизина, суспендированного в ацетонитриле, ранее были синтезированы *n*-нитроанилиды тетрапептидов общей формулы $Z\text{-Ala-Ala-P}_1\text{-P}'_1\text{-pNA}$, где $P_1, P'_1 = \text{Leu}$ или Phe ($[S]/[E] = 10^5 : 1$) и *n*-нитроанилиды трипептидов $Z\text{-Ala}_2\text{-X}$, где $X = \text{Leu-pNA}, \text{Phe-pNA}$ или Phe-NH_2 ($[S]/[E] = 10^3 : 1$) [12]. Использование комплекса SDS–субтилизин как катализатора позволило значительно сократить время реакций, расширить круг и размер синтезируемых пептидов, включая пептиды с неприродными аминокислотами. Важно отметить, что субстратная специфичность субтилизина в комплексе с SDS не меняется, а реакции, катализируемые SDS–субтилизином, не сопровождаются образованием побочных продуктов. SDS–субтилизин представляется нам более перспективным катализатором, который может быть успешно использован в ферментативном пептидном синтезе в спиртах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы субтилизин, выделенный по методике [6, 18], этанол (ректификат, 95%), изопропанол квалификации ос.ч., ацетонитрил и тетрагидрофуран для ВЭЖХ ос.ч. (“Лекбиофарм”, Россия), этанол, диоксан, абсолютированные по методам, описанным в [19].

Анализ пептидов осуществляли на жидкостном хроматографе Altex Model 100A (США) на колонке Диасорб 130_{с8}T (4 мм × 250 мм, Биохиммак, Москва). Элюцию проводили в линейном градиенте ацетонитрила в воде, содержащей 0.1% трифторуксусной кислоты, от 20 до 100%. Скорость элюции 1 мл/мин, время элюции 35 мин. Детекцию осуществляли при 220 и 280 нм. При расчете состава реакционной смеси не делали поправку на различие коэффициентов оптического поглощения компонентов. Аминокислотный анализ проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе Hitachi-835 (Япония) после кислотного гидролиза пептидов и белка 5.7 н. HCl при 105°C в течение 48 ч. Измерения оптического поглощения исследуемых растворов проводили на спектрофотометре Specord UV VIS (Герма-

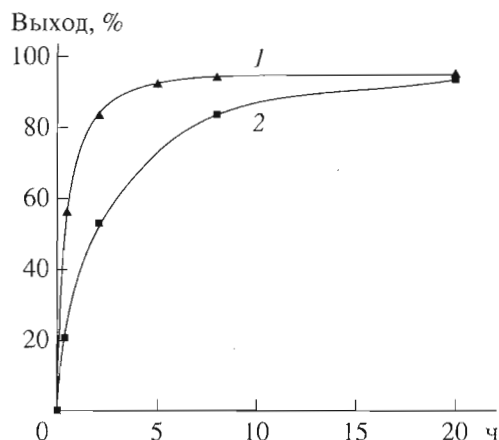


Рис. 5. Зависимость выхода продукта от времени при синтезе $Z\text{-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA}$, катализируемом SDS–субтилизином в этаноле (1) и изопропанол (2). Условия: $[S]/[E] = 5 \times 10^3 : 1$, 30% DMF.

ния). Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре МСБХ (Украина).

Синтез пептидов с помощью комплекса SDS–субтилизин

Комплекс SDS–субтилизин готовили по методу [12, 13]. Синтез пептидов (1)–(4), (6)–(11) описан в работе [17]. Синтез пептидов (2а), (5), (12)–(14) проводили аналогично.

Abz-Val-Ala-Phe-Leu-pNA (16). К раствору 2.3 мг $\text{Abz-Val-Ala-Phe-OCH}_3$ (5 мкмоль) и 1.2 мг H-Leu-pNA (5 мкмоль) в 75 мкл DMF добавляли 117 мкл раствора комплекса SDS–субтилизин в этаноле (0.33 мг/мл). Реакционную смесь перемешивали при 20°C и периодически отбирали 10 мкл пробы для ВЭЖХ. Фракцию с временем удерживания 25.5 мин собирали, упаривали и проводили аминокислотный анализ. Синтез пептидов (15), (17)–(19), (21)–(23) проводили аналогично.

Abz-Val-Ala-Phe-Arg-pNA (20). К раствору 1.6 мг хлоргидрата H-Arg-pNA (5 мкмоль) в 50 мкл DMSO добавляли 5 мкл 1 М триэтиламина в этаноле, центрифугировали и супернатант добавляли к 2.3 мг $\text{Abz-Val-Ala-Phe-OCH}_3$ (5 мкмоль). К полученному раствору добавляли 61 мкл этанола и 56 мкл раствора комплекса SDS–субтилизин в

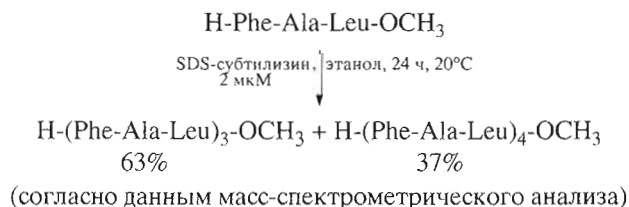


Схема 2.

этаноле (0.55 мг/мл). Реакционную смесь перемешивали при 20°C и периодически отбирали 10 мкл пробы для ВЭЖХ. Фракцию с временем удерживания 18.7 мин собирали, упаривали и проводили аминокислотный анализ.

Олигомеризация Н-Phe-Ala-Leu-OCH₃. 4.4 мг хлоргидрата Н-Phe-Ala-Leu-OCH₃ (22 мкмоль) растворяли в 250 мкл этанола, прибавляли 20 мкл 1 М триэтиламина в этаноле, центрифугировали и к супернатанту добавляли 100 мкл раствора комплекса SDS-субтилизин в этаноле (0.22 мг/мл). Через 1 ч перемешивания наблюдали выпадение осадка. Реакционную смесь перемешивали в течение суток при 20°C, отделяли осадок от супернатанта, промывали его водой (400 мкл × 3), этанолом (400 мкл × 2), абс. эфиром (400 мкл × 1) и сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Осадок растворяли в 70 мкл безводной муравьиной кислоты и проводили масс-спектрометрический анализ осадка.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 97-03-33039а) и грантом № 03.0003Н-333 ГНТП "Новейшие методы биоинженерии".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moree W.J., Sears P., Kawashiro K., Witte K., Wong C.-H. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 3942–3947.
2. Terent'eva E.Yu., Voyushina T.L., Stepanov V.M. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995. V. 5. P. 2523–2526.
3. Юсупова М.П., Новгородова С.А., Степанов В.М. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 523–527.
4. Wescott C.R., Klibanov A.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1206. P. 1–9.
5. Sergeeva M.V., Paradkar V.M., Dordick J.S. // Enzyme Microb. Technol. 1997. V. 20. P. 623–628.
6. Акпаров В.Х., Белянова Л.П., Баратова Л.А., Степанов В.М. // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 886–890.
7. Paradkar V.M., Dordick J.S. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 5009–5010.
8. Sasaki T., Kise H. // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V. 58. P. 1050–1053.
9. Chatterjee S., Russel A.J. // Enzyme Microb. Technol. 1993. V. 15. P. 1022–1029.
10. Khmelniitsky Yu.L., Welch S.H., Clark D.S., Dordick J.S. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 2647–2648.
11. Kise H. // Bioorg. Chem. 1990. V. 18. P. 107–115.
12. Гетун И.В., Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Колобанова С.В., Оксенойт Е.С., Анисимова В.В., Степанов В.М. // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24. С. 306–312.
13. Meyer J.D., Kendrick B.S., Matsuura J.E., Ruth J.A., Bryan Ph.N., Manning M.C. // Int. J. Pept. Prot. Res. 1996. V. 47. P. 177–181.
14. Гладилин А.К., Левашов А.В. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 408–421.
15. Люблинская Л.А., Якушева Л.Д., Степанов В.М. // Биоорганич. химия. 1977. Т. 3. С. 273–279.
16. Воюшина Т.Л., Люблинская Л.А., Степанов В.М. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. С. 738–744.
17. Getun I.V., Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Anisimova V.V., Kolobanova S.V., Bacheva A.V., Stepanov V.M. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997. V. 7. P. 2691–2696.
18. Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М. // Биохимия. 1990. Т. 56. С. 33–40.
19. Гордон А., Форд Р. Спутник химика: Пер. с англ. М.: Мир, 1976.

Peptide Synthesis Catalyzed by Subtilisin-72 in Organic Solvents

I. V. Getun, I. Yu. Filippova[#], E. N. Lysogorskaya, A. V. Bacheva, and E. S. Oksenoit

Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

The solubility, stability, and activity of native subtilisin 72 and of its complex with SDS were comparatively studied in a number of polar organic solvents. Subtilisin was found to catalyze peptide bond formation when suspended in acetonitrile or solubilized as a complex with SDS in ethanol and isopropanol. Tripeptide Z-Ala-Ala-Leu-pNA, tetrapeptides A-Ala-Ala-P₁-P₁-B, where A = Z or Abz; P₁ = Leu, Phe, Met, Trp, Ile, Tyr, Phe(NO₂), or Glu(OMe), P₁' = Leu, Phe, Glu, Ala, Ile, Val, or Arg; B = NH₂, pNA, or 2-(2,4-dinitrophenyl)aminoethylamine residue (Ded); pentapeptides Z-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-pNA and Z-Ala-Ala-Leu-Ala-Phe-pNA; and hexapeptide Abz-Val-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded were synthesized using the SDS-subtilisin complex. The complex also efficiently catalyzed the oligomerization of tripeptide H-Phe-Ala-Leu-OCH₃ in ethanol, which resulted in a 63 : 37 mixture of trioligomer and tetraoligomer. It was demonstrated that SDS-subtilisin is a much more efficient catalyst than the suspension of native enzyme.

Key words: enzymic peptide synthesis, organic solvents, SDS-subtilisin, subtilisin

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 939-5529; fax: +7 (095) 932-8846; e-mail: filip@belsin.genebee.msu.su.