



УДК 577.15.02:035

СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ СУБТИЛИЗИНА

I. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУБТИЛИЗИНА, ШТ. 72, СО СТЕРЕОИЗОМЕРАМИ
N-ЦИННАМОИЛИМИДАЗОЛА

Гост О. А., Казанская Н. Ф.

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

Изучена реакция модификации субтилизина, шт. 72, с целью придания ему способности к регуляции ферментативной активности под действием света. Показано, что субтилизин реагирует со стереоизомерами циннамолимидазола в нейтральной среде (рН 6–8). *транс*-Циннамоилсубтилизин быстро дезацилируется в этих условиях ($t_{1/2\text{ дезац}}$ (рН 7,0) 22 с) с образованием активного фермента. *цис*-Производное субтилизина не способно к реактивации под действием нуклеофильных агентов и к фотоизомеризации. Проводя реакцию при рН < 5, можно выделить *транс*-циннамоилсубтилизин, который в этих условиях сравнительно стабилен (при рН 4,6 $t_{1/2\text{ дезац}}$ 46 мин) и под действием света (λ 313 нм) превращается в *цис*-циннамоилсубтилизин, способный к фотоизомеризации и реактивации под действием нуклеофильных агентов и в 80% диоксане. Одновременно *цис*-циннамоилсубтилизин инактивируется (при рН 4,5 $t_{1/2\text{ инак}}$ 105 мин) с образованием производного фермента, уже не способного к изомеризации и реактивации под действием нуклеофильных агентов. Предложен метод определения «потенциально активного» *цис*-циннамоилсубтилизина.

Проблема создания светочувствительных систем, которые можно применять для регулирования ферментативной активности, привлекает сейчас серьезное внимание, поскольку такие системы могут быть использованы как модельные для чисто исследовательских целей, а также для фиксации световых сигналов. В последнем случае важно иметь дешевый и неограниченный источник ферментов. Таким источником могут быть бактериальные культуры, а химическая модификация белка может придать ему свойство светочувствительности, что и сделано на ряде ферментов [1–4].

Для исследования был выбран отечественный препарат внеклеточной сериновой протеиназы, продуцируемой *Bacillus subtilis* (шт. 72, ВНИИ Биотехника). Фермент этого штамма, хотя и принадлежит к виду субтилизинов, несколько отличается от ферментов известных штаммов Novo и Carlsberg как по субстратной специфичности, так и по физико-химическим характеристикам [5, 6]. Было исследовано взаимодействие субтилизина, шт. 72, со стереоизомерами N-циннамолимидазола.

Субтилизин, шт. 72, так же как и субтилизины других штаммов, легко ацилируется *транс*-циннамолимидазолом. Реакция ацилирования протекает меньше чем за 1 мин в интервале рН 4–8, причем уменьшение оптической плотности раствора в начальный период времени (см. «Экспериментальную часть») всегда пропорционально взятой концентрации субтилизина, т. е. *транс*-циннамолимидазол служит таким же хорошим титрантом для субтилизина, шт. 72, как и для субтилизинов других штаммов [7].

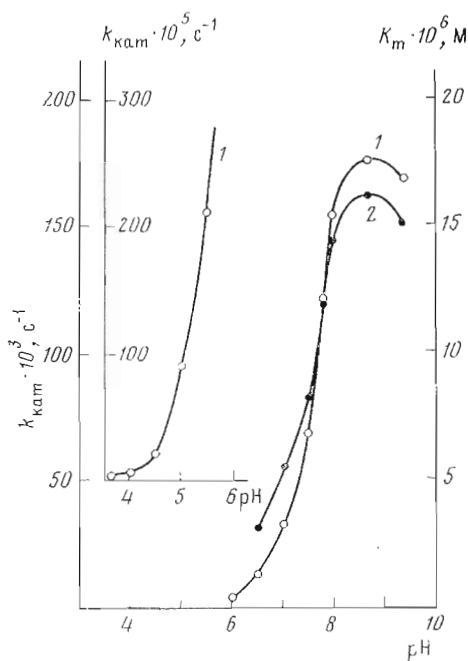


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость $k_{кат}$ (1) и K_m (каж) (2) реакции гидролиза субтилизином *транс*-циннамоилмидазола от pH

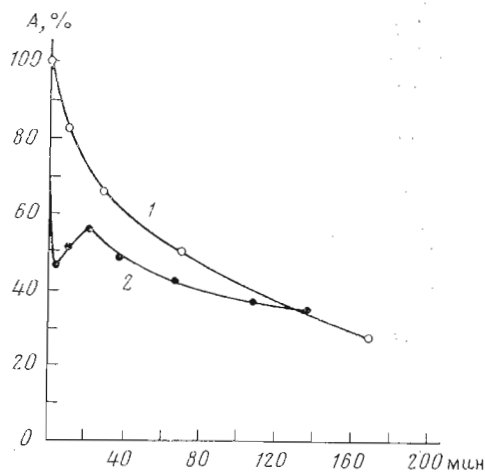


Рис. 2

Рис. 2. Изменение активности субтилизины при его взаимодействии с фотостационарной смесью циннамоилмидазолов; pH 7,0, $[C_{11}H_9N]$ 6,3%, $[E]$ $1,5 \cdot 10^{-6}$, $[S]$ $6,5 \cdot 10^{-4}$ М. Активность фермента измеряли по Ac-Tyr-OEt при pH 8,8 (1) и при pH 7,0 (2)

За реакцией дезацилирования *транс*-циннамоилсубтилизина следили спектрофотометрически по появлению в реакционной смеси *транс*-коричной кислоты. Зависимость константы скорости реакции от pH среды в интервале 3,6–9,34 представлена на рис. 1. При дальнейшем повышении pH сильно увеличивается скорость спонтанного гидролиза субстрата. Отметим, что $k_{дезац}$ при pH 7,0 равна $3,2 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, в то время как для субтилизина Ново константа дезацилирования, определенная в аналогичных условиях, составляла $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ [7].

Как и в случае химотрипсина [1], взаимодействие субтилизина с *цис*-циннамоилмидазолом изучали, обрабатывая раствор фермента фотостационарной смесью *транс*- и *цис*-изомеров циннамоилмидазола при pH 6–8, при этом следили за изменением активности фермента по этиловому эфиру ацетилтирозина (рис. 2). В рассматриваемых условиях нативный субтилизин очень стабилен и не инактивируется при инкубировании его растворов при 25° в течение по крайней мере нескольких часов. Присутствие ацетонитрила не влияет на стабильность фермента.

Обработанный фотостационарной смесью при pH 6–8 фермент отделяли от низкомолекулярных веществ либо диализом, либо гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Ферментативная активность при этом не восстанавливается. Полученный препарат субтилизина резко отличается своей инертностью от соответствующего препарата химотрипсина. Такие нуклеофильные агенты, как гидроксилламин (0,5–0,7 М, pH 8), ацетоксим (0,4–0,7 М, pH 8) и салицилальдоксим (0,05 М, pH 8), не регенерируют каталитическую активность фермента. Длительное (до 1,5 сут) инкубирование препарата в щелочной среде (pH 9,0) также не реактивирует фермент. В случае *цис*-циннамоилхимотрипсина облучение УФ-светом приво-

шло к *транс*-стереоизомеризации циннамольного остатка в активном центре фермента с последующим быстрым дезацилированием вновь образованного *транс*-циннамоилхмотрипсина и регенерацией каталитических свойств фермента [1]. Облучение же препарата субтилизина в течение 0,5–30 мин не вызывает возвращения каталитической активности фермента.

Подобное поведение субтилизина, шт. 72, по отношению к *цис*-циннамоилимидазолу, по-видимому, характерно для субтилизинов вообще, так как при работе с отечественным препаратом, шт. Ф., и субтилизином А (Serva) мы получили аналогичные результаты. *транс*-Циннамоилимидазол быстро гидролизуеться как субтилизином А, так и субтилизинном, шт. Ф. Оба фермента взаимодействуют с фотостационарной смесью *транс*- и *цис*-циннамоилимидазолов с потерей каталитической активности. Облучение УФ-светом реакционной смеси приводит к резкому падению активности, связанному фотоизомеризации *цис*-циннамоилимидазола в *транс*-циннамоилимидазол и быстрому ацилированию свободного субтилизина. Затем активность возвращается до прежнего уровня, что указывает на то, что *цис*-циннамоилсубтилизин не реактивирован облучением. Облучение отдиализованного от низкомолекулярных примесей препарата также не приводит к реактивации фермента (рис. 3).

цис-Циннамоилсубтилизин может быть получен также путем облучения реакционной смеси, состоящей из фермента и *транс*-циннамоилимидазола. Такой способ дает возможность получить 20–40% *цис*-циннамоилсубтилизина в смеси независимо от значения pH (рис. 4). Правая часть кривой падения активности фермента, представленной на рис. 4, соответствует инаktivации фермента под действием облучения. Левая часть кривой характеризует изменение активности фермента вследствие фото-стереоизомеризации *транс*-циннамоилсубтилизина в *цис*-циннамоилсубтилизин. Экстраполируя полученную нами зависимость логарифма активности от времени облучения к начальному моменту, высчитывали процентное содержание *цис*-циннамоилсубтилизина в смеси. Смесь достаточно облучать в течение 10 мин, инаktivацией фермента под действием облучения за этот промежуток времени можно пренебречь. В этом случае препарат, полученный при pH 6–7 и отделенный от низкомолекулярных примесей диализом, не регенерирует каталитическую активность при указанных выше условиях.

С другой стороны, фермент, обработанный таким же способом при низком значении pH (5,35) и отделенный от низкомолекулярных веществ гель-фильтрацией при том же значении pH, может быть реактивирован облучением УФ-светом при pH 5,35 сразу после выделения. При этом увеличивается оптическая плотность раствора и наблюдается «красный» сдвиг УФ-спектра поглощения, характерный для спектральных изменений при изомеризации этиленовых производных от *цис*- к *транс*-форме. Однако препарат, переведенный в нейтральную или щелочную среду, утрачивает способность реактивироваться УФ-светом.

Было сделано заключение, что препарат *цис*-циннамоилсубтилизина теряет способность к изомеризации в *транс*-форму и, следовательно, к регенерации каталитической активности в нейтральной или щелочной среде.

цис-Циннамоилсубтилизин может быть получен и при облучении *транс*-изомера в кислой среде. Было специально показано, что в отсутствие ионов Ca^{2+} при $\text{pH} < 5$ фермент склонен к денатурации, скорость которой тем выше, чем выше степень очистки белка. Так, для исходного препарата субтилизина константа денатурации фермента в 0,1 М ацетатном буфере при pH 4,5 и температуре 25° составляла $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$. После однократной очистки фермента на колонке с молселектом G-5, уравновешенным тем же буфером, константа денатурации в тех же условиях составляла $1,2\text{--}1,4 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, т. е. была сравнима с константой дезацилирования *транс*-циннамоилсубтилизина (при pH 4,5 $k_{\text{дезац}}$ $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$). Однако в присутствии

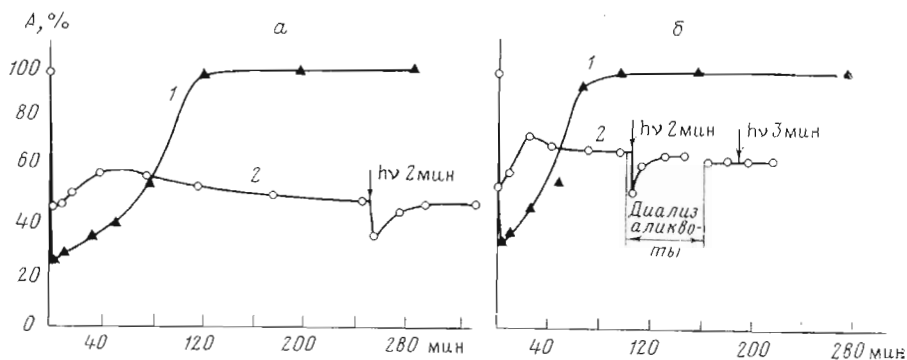


Рис. 3

Рис. 3. Изменение активности субтилизина, шт. Ф. (а) и субтилопептидазы А (б) при их взаимодействии с *транс*-циннамоилмидазолом (1) и фотостационарной смесью *транс*- и *цис*-циннамоилмидазолов (2). Условия: 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,0; $[CH_2CN]$ 5% (а), 3,3% (б); $[E]$, мкМ — 5,5 (а), 4,2 (б); $[S]$, мМ — 0,26 (а), 0,16 (б). Активность определяли по Ас-Тур-ОЕ₅ при рН 7,0

Рис. 4. Зависимость активности субтилизина (1) и логарифма активности (2) от времени облучения реакционной смеси фермента с *транс*-циннамоилмидазолом. Условия: рН 7, $[E]$ $1,5 \cdot 10^{-6}$, $[S]$ $4,7 \cdot 10^{-3}$ М, $[CH_2CN]$ 6,25%. Активность измеряли при рН 8,8

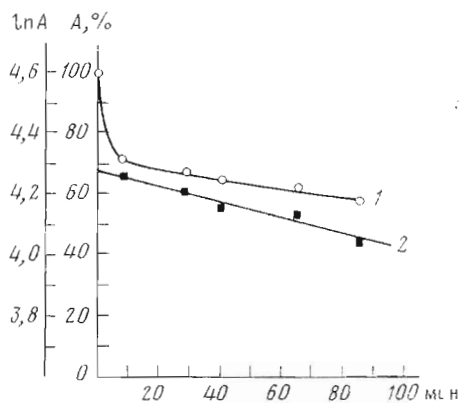


Рис. 4

0,05 М Ca^{2+} фермент стабилен по крайней мере в течение нескольких часов.

транс-Циннамоилсубтилизин был выделен нами с выходом 80–100% (см. «Экспериментальную часть»). Облучение УФ-светом полученного препарата, как и следовало ожидать, привело к потере ферментом каталитической активности (до 50%), измеряемой при рН 8,8. Наблюдающееся уменьшение оптической плотности и «голубой» сдвиг максимума в УФ-спектре облучаемого препарата (рис. 5) указывают, что при освещении происходит стереоизомеризация циннамоильного остатка в ацилферменте. Для дезацилирования оставшегося *транс*-циннамоилсубтилизина раствор подщелачивали до рН 6–8, а затем отделяли высокомолекулярную фракцию гель-фильтрацией. Полученный препарат инертен к действию нуклеофилов, к инкубации в щелочной среде и облучению. Существенно, что облучение не приводит также и к изменению УФ-спектров препарата, т. е., по-видимому, не происходит и обратной стереоизомеризации ацилфермента из *цис*- в *транс*-форму.

Вместе с тем *цис*-циннамоильный остаток сохраняется в белковой глобуле, что было нами доказано следующим способом:

Облучение водных растворов *транс*-коричной кислоты приводит к изменению ее УФ-спектра вследствие стереоизомеризации, происходящей при облучении, однако при 252 нм оптическая плотность не меняется (рис. 6). Таким образом, измеряя оптическую плотность раствора при 252 нм, можно определить общее количество кислоты в растворе.

Часть раствора *транс*-циннамоилсубтилизина облучали для получения фотостационарной смеси ацилфермента, другую часть оставляли интакт-

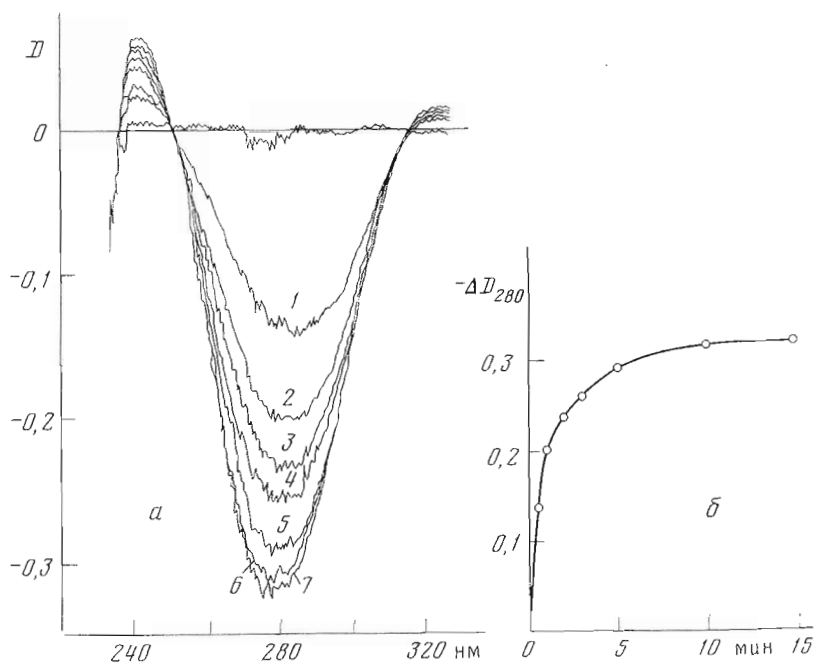


Рис. 5. *a* — разности спектры облученного раствора *транс*-циннамоилсубтилизина против необлученного, рН 4,5. Время облучения: 30 с (1), 1 мин (2), 2 (3), 3 (4), 5 (5), 10 (6), 15 мин (7); *б* — уменьшение D_{280} раствора *транс*-циннамоилсубтилизина при его облучении

ной, доводили рН обоих растворов до 9,5, а затем снова подкисляли до рН 8,0. УФ-спектры растворов до и после подщелачивания приведены на рис. 7. Видно, что в случае облученного препарата не происходит такого же возрастания оптической плотности при 252 нм, как для необлученного, т. е. не происходит дезацилирования *цис*-циннамоилсубтилизина. Сравнивая D_{252} всех растворов (рис. 7), процентное содержание *цис*-циннамоилсубтилизина в смеси стереоизомеров вычисляли по формуле

$$\frac{D_{252}(3) - D_{252}(1)}{D_{252}(4) - D_{252}(2)} \cdot 100\%.$$

В данном случае в смеси находится 24% *цис*-циннамоилсубтилизина.

Итак, при облучении растворов *транс*-циннамоилсубтилизина при рН 4,5 происходит стереоизомеризация циннамоильного остатка, приводящая к образованию *цис*-циннамоилсубтилизина. Однако полученный ацилфермент чувствителен к кислотности среды. Переход к более высоким значениям рН не вызывает дезацилирования *цис*-циннамоилсубтилизина, но приводит к образованию инертного продукта. Тот факт, что после подщелачивания растворов ацилфермента облучение не вызывает изменений в УФ-спектрах, говорит о том, что в *цис*-циннамоилсубтилизине, вероятно, прошла вторичная химическая реакция, затронувшая двойную связь остатка коричной кислоты. Возможно, в такую реакцию мог вступать гистидин активного центра фермента. Для проверки этого предположения был проведен аминокислотный анализ нативного субтилизина и препарата, полученного при облучении *транс*-циннамоилсубтилизина. Однако из-за большой ошибки эксперимента нам не удалось обнаружить достоверного уменьшения содержания гистидина при анализе.

Количественно охарактеризовать процесс „потенциально активный“ *цис*-циннамоилсубтилизин → неактивный *цис*-циннамоилсубтилизин“ мы смогли следующим образом.

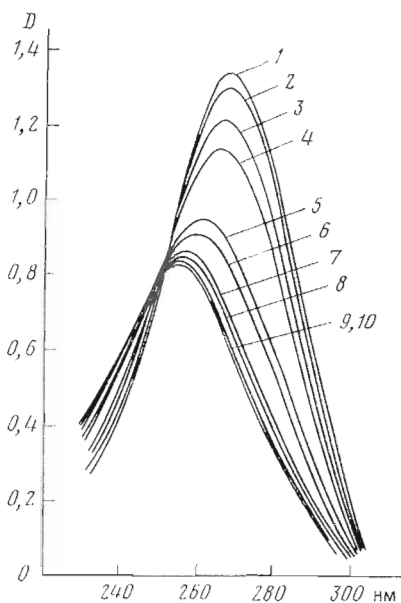


Рис. 6

Рис. 6. Изменение спектра коричной кислоты ($6,78 \cdot 10^{-5}$ M, 0,1 M фосфатный буфер, pH 8,0; 3,2% CH_3CN) при стереоизомеризации под действием облучения. Время облучения: спектр исходного раствора коричной кислоты 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4), 21 (5), 31 (6), 41 (7), 50 (8), 60 (9), 70 мин (10)

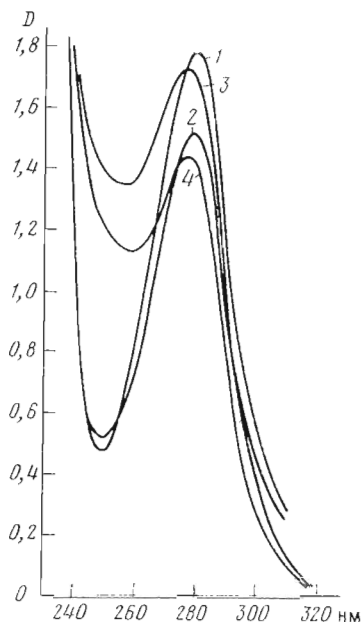


Рис. 7

Рис. 7. Спектры циннамоилсубтилизина при pH 4,5 *транс*- (1), *цис*- (2); при pH 8,0 *транс*- (фактически субтилизина и коричной кислоты) (3) и *цис*- (фактически субтилизина и стереоизомеров коричной кислоты) (4)

Оказалось, что можно добиться полной реактивации фермента, если растворы *цис*-циннамоилсубтилизина подщелачивать до pH 8–9 в присутствии нуклеофильных агентов, таких, как метиламин (0,1 M), диметиламин (0,1 M), формгидроксамовая кислота (0,4 M). В кислой среде эти нуклеофильные агенты не вытесняют *цис*-коричную кислоту из ацилфермента, но при подщелачивании вытеснение кислоты нуклеофилами успешно конкурировало с побочной реакцией инактивации. Предварительное подщелачивание растворов *цис*-циннамоилсубтилизина, равно как и длительное (до нескольких часов) стояние его растворов при pH 4,5 при комнатной температуре, приводили к потере способности реактивироваться под действием аминов.

Наличие «потенциально активного» *цис*-циннамоилсубтилизина было доказано также путем дезацилирования ацилфермента в 80% диоксане.

Диоксан ингибирует эстеразную активность субтилизина, и уже в присутствии 30% диоксана фермент полностью неактивен. Однако *транс*-изомер циннамоилсубтилизина в этих условиях дезацилируется и скорость дезацилирования растет с ростом концентрации диоксана. Была выбрана максимальная концентрация диоксана (80%), вызывающая достаточно быстрое дезацилирование *транс*-циннамоилсубтилизина, но не приводящая, однако, к опалесценции растворов фермента. Показано, что в таком растворе инактивация субтилизина полностью обратима даже при выдерживании смеси в течение нескольких суток. *цис*-Циннамоилсубтилизин дезацилируется в 80% диоксане с полной регенерацией каталитической активности фермента ($k_{\text{дезац.}} = 9,7 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$). Очевидно, подобное дезацилирование ацилфермента связано с нарушением структуры активного центра фермента при одновременном сдвиге pH в щелочную область в 80% диоксане [8]. Облучение растворов *цис*-ацилфермента в диоксане, приво-

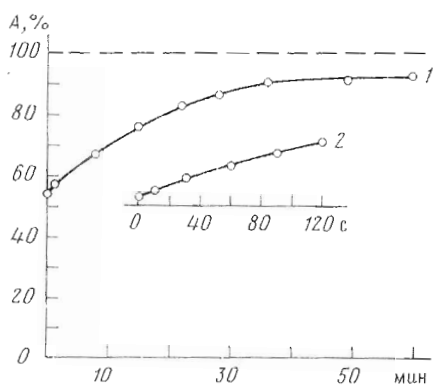
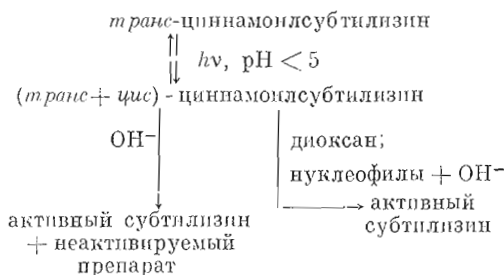


Рис. 8. Реактивация *цис*-циннамоилсубтилизина в 80% диоксане (1) и в диоксане при одновременном облучении (2)

Таким образом, исследованная система удовлетворяет следующей схеме превращений:



Полученные данные приводят к заключению, что имеется принципиальная возможность регуляции светом ферментативной активности субтилизина.

Экспериментальная часть

В работе был использован ряд ферментов.

Субтилизин из *B. subtilis*, шт. 72, предоставленный нам лабораторией Л. И. Орещенко (ВНИИ Биотехника), дополнительной очистке не подвергался. Процентное содержание активных молекул фермента, определенное титрованием *транс*-циннамоилимидазолом, колебалось в различных препаратах от 30 до 50%. Препараты содержали 25% (весовых) NaCl.

Субтилизин А (субтилопептидаза А, КФ 3.4.4.16) фирмы Serva (ФРГ) имел 70% активных молекул по результатам титрования *транс*-циннамоилимидазолом.

Субтилизин из *B. subtilis*, шт. Ф (препарат ферментного завода Вильнюса), очищенный в лаборатории ферментов Латвийского филиала ВНИИ «Иреа» (г. Олайне), имел 20% активных молекул.

Концентрацию растворов субтилизина определяли по навеске с учетом молекулярного веса, принимаемого равным 27 600.

N-транс-Циннамоилимидазол синтезирован в нашей лаборатории по методу [9], т. пл. 133,5°.

Этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина синтезирован в нашей лаборатории по методу [10]. Действительное содержание Ас-Тур-ОEt определяли путем титрования на рН-стате кислоты, образующейся при полном гидро-

дующее к образованию *транс*-циннамоилсубтилизина, в 6 раз увеличивает скорость реактивации (рис. 8).

Пользуясь способностью *цис*-циннамоилсубтилизина дезацилироваться в 80% диоксане и при подщелачивании в присутствии нуклеофилов, мы определили зависимость константы реакции необратимой инактивации *цис*-циннамоилсубтилизина от рН в интервале 4,5—5,35 (таблица). Реакция идет по первому порядку, а зависимость скорости реакции от рН соответствует общещелочному катализу. При переходе к более высоким значениям рН реакция становится слишком быстрой для того, чтобы следить за ней обычными методами.

**Константы инактивации
и *ис*-циннамоилсубтилизина**

рН	$k_{\text{инакт.}} \cdot 10^4, \text{ с}^{-1}$
4,5	1,0
4,7	2,1
5,35	5,8

лизе субстрата субтилизином при рН 7,0. Содержание основного вещества в разных препаратах составляло от 70 до 90%.

В работе использовали сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), молселект 72 Г-25 (Reanal, Венгрия) и трис (Shuchardt, ФРГ), дважды перекристаллизованный из спирта.

Ацетонитрил, перегнанный над P_2O_5 , хранили над молекулярными ситами 4 Å.

Определение эстеразной активности субтилизина по Ac-Tyr-OEt проводили на рН-стате (Radiometer, Дания) при требуемом значении рН и температуре 25°.

Спектральные измерения проводили с помощью спектрофотометров Unicam SP 1800 (Англия) и Beckman (США).

Для проведения аминокислотного анализа препараты субтилизина гидролизovali 6 н. HCl при 105° в течение 24 ч в вакуумированных ампулах. Гидролизаты исследовали на автоматическом аминокислотном анализаторе KLA-3 (Hitachi, Япония).

Источником УФ-света служила ртутная лампа ДРШ-250 со светофильтром УФС-2 (диапазон 290—360 нм). Для выделения монохроматического света (λ 313 нм) пользовались комбинацией светофильтров УФС-2 и ЖС-3.

Титрование активных центров субтилизина, шт. 72, *транс*-циннамоилмидазолом проводили следующим образом: в кварцевые кюветы (l 1 см) вносили по 3 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,05; добавляли по 0,1 мл раствора *транс*-циннамоилмидазола ($5 \cdot 10^{-3}$ М) в абсолютном ацетонитриле. В кювету сравнения вносили 0,1 мл буфера, использованного для приготовления раствора фермента. В рабочую кювету вносили 0,1 мл раствора субтилизина, раствор быстро перемешивали и записывали уменьшение оптической плотности при λ 335 нм во времени, экстраполируя результат к начальной точке времени. В отдельном опыте определяли поправку на оптическую плотность фермента при 335 нм. Из средней величины $\Delta \bar{D}_{335}$, полученной для нескольких титрований фермента, определяли концентрацию активных молекул субтилизина в растворе. При этом коэффициент молярной экстинкции *транс*-циннамоилмидазола принимали равным $\epsilon_{335} 9,37 \cdot 10^{-3} \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [7].

Кинетику образования циннамат-иона при гидролизе *транс*-циннамоилсубтилизина при рН 3,6—6,0 изучали при 250 нм*. Типичный эксперимент проводили следующим образом: в кювету с 3 мл 0,1 М трис-HCl-буфера, содержащего 0,5 М CaCl₂, добавляли 0,2 мл запасного раствора фермента ($1,1 \cdot 10^{-5}$ М в кювете), затем в реакционную смесь вводили 0,01 мл раствора *транс*-циннамоилмидазола ($6,7 \cdot 10^{-6}$ М в конечной концентрации) и после перемешивания начинали запись кривой дезацилирования согласно работе [11]. За кинетикой ацилирования субтилизина *транс*-циннамоилмидазолом следили при тех же условиях, но при 335 нм.

За кинетикой дезацилирования *транс*-циннамоилсубтилизина при рН 4,5—4,7 следили с помощью и другого метода, выделяя *транс*-циннамоилсубтилизин, как описано ниже, и записывая на спектрофотометре полную кинетическую кривую дезацилирования.

* Этот эксперимент выполнен О. В. Васеновой (МГУ).

Для определения константы дезацилирования *транс*-циннамоилсубтилизина при $\text{pH} \geq 6,0$ в кювету сравнения вносили 3 мл 0,025 М фосфатного буфера (0,1 М NaCl) соответствующего значения pH и 0,1 мл раствора *транс*-циннамоилимидазола в ацетонитриле ($2,4-3,3 \cdot 10^{-4}$ М в конечной концентрации). В рабочую кювету вносили 2,9 мл буфера, 0,1 мл раствора *транс*-циннамоилимидазола и 0,1 М раствор субтилизина в 0,1 М NaCl ($4,8 \cdot 10^{-7}-1,4 \cdot 10^{-5}$ М конечной концентрации). Записывали полную кинетическую кривую при λ 335 нм. Результаты обсчитывали по методу [12].

Фотостационарную смесь *транс*- и *цис*-циннамоилимидазолов получали при облучении в течение 4 ч раствора *транс*-циннамоилимидазола ($5 \cdot 10^{-3}$ М) в абсолютном ацетонитриле при 22°.

При взаимодействии субтилизина с фотостационарной смесью циннамоилимидазолов концентрация фермента составляла $1-6 \cdot 10^{-6}$ М, общая концентрация циннамоилимидазолов $1,5-3 \cdot 10^{-4}$ М, 4-10% CH_3CN . Реакцию вели в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6-8, либо в растворе 0,1 М KCl, 0,05 М CaCl_2 , поддерживая нужное значение pH с помощью pH-стата. Диализ обработанного фермента осуществляли при 5° против того же буфера, в котором вели реакцию, или против буфера с более низким значением pH. Гель-фильтрацию препарата проводили на колонке (2×25 см) с сефадексом G-25, уравновешенным тем же буфером или 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,5, при 3-5°.

При облучении УФ-светом реакционной смеси субтилизина с *транс*-циннамоилимидазолом концентрация фермента составляла $5 \cdot 10^{-7}-3 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация *транс*-циннамоилимидазола $5 \cdot 10^{-4}-1 \cdot 10^{-3}$ М. Реакцию вели в 0,1 М ацетатном или 0,1 М фосфатном буфере, 10% CH_3CN . Для последующей гель-фильтрации использовали колонку (2×7 см) с сефадексом G-25.

Выделение *транс*-циннамоилсубтилизина проводили при помощи гель-фильтрации на колонке (2×7 см) с молеселектом G-25, уравновешенным 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,5, реакционной смеси фермента ($3 \cdot 10^{-4}$ М) с *транс*-циннамоилимидазолом ($5 \cdot 10^{-3}$ М). Контролирование количества выделившегося *транс*-циннамоилсубтилизина проводили путем измерения соотношения активностей выделенного препарата и нативного субтилизина при pH 4,5, когда ацилфермент достаточно стабилен, и при pH 8,8, когда ацилфермент мгновенно дезацилирует.

Для дезацилирования *цис*-циннамоилсубтилизина в диоксане ацилфермент в 0,1 М ацетатном буфере, pH 4,5, разбавляли диоксаном в соотношении 1:4. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре, отбирали пробы по 0,2 мл и разводили их в 2 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,5. Измеряли активность полученных разведенных растворов по стандартной методике при pH 8,5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Martinek K., Varfolomeyev S. D., Berezin I. V. (1971) Eur. J. Biochem., **15**, 242-249.
2. Айсина Р. Б., Васильева Т. Е., Казанская Н. Ф., Тиходеева А. С., Березин И. В. (1973) Вдохимия, **38**, 601-607.
3. Montagnoli G., Monti S., Nannicini L., Giovannitti M. P., Ristori M. G. (1978) Photochem. Photobiol., **27**, 43-49.
4. Aizawa M., Namba K., Suzuki S. (1977) Arch. Biochem. and Biophys., **180**, 41-48.
5. Нестеренко Е. А., Орещенко Л. И., Мотренко В. И. (1975) Тезисы Всес. совещания по кристаллическим ферментам, с. 112, Вильнюс.
6. Васенева О. В., Кост О. А., Казанская Н. Ф. (1979) Вестн. Моск. ун-та, № 3.
7. Bender M. L., Begué-Cantón M. L., Blakeley R. L., Brubacher L. J., Feder J., Ginter C. R., Kézdy F. J., Killheffer J. V., Jr., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. K. (1966) J. Amer. Chem. Soc., **5890-5913**.
8. Рехоб Д. (1971) Канд. дис. «Исследование кинетики механизма гидролиза сложных эфиров карбоновых кислот в смесях воды с органическими растворителями», МГУ.
9. Schonbaum C. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., **236**, 2930-2935.

10. Vigneared V., Weyer E. (1932) J. Biol. Chem., 98, 295-308.
11. Bender M. L., Kaiser E. T. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 2556-2561.
12. Клесов А. А., Березин И. В. (1972) Биохимия, 37, 170-183.

Поступила в редакцию
12.XII.1978

LIGHT-SENSITIVE DERIVATIVES OF SUBTILISIN. I. REACTION OF ST.72 SUBTILISIN WITH THE N-CINNAMOYLIMIDAZOLE STEREOISOMERS

KOST O. A., KAZANSKAYA N. F.

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

Modification of subtilisin st. 72 was studied in order that its enzymic activity could be regulated under the action of light. Subtilisin was found to react with the cinnamoylimidazole stereoisomers in neutral media (pH 6-8). Under these conditions *trans*-cinnamoylsubtilisin was rapidly deacylated ($\tau_{1/2\text{deac}}=22$ s at pH 7.0) forming the active enzyme, whereas the *cis*-derivative could not be reactivated by nucleophiles and failed to photoisomerize. Carrying out the reaction at pH<5 allowed to isolate fairly stable *trans*-cinnamoylimidazole ($\tau_{1/2\text{deac}}=46$ min at pH 4.6) which on light exposure ($\lambda 313$ nm) was converted into *cis*-cinnamoylsubtilisin. The latter was capable of photoisomerization or reactivation promoted by nucleophilic agents or in 80% dioxane. Simultaneously the inactivation of *cis*-cinnamoylsubtilisin took place ($\tau_{1/2\text{inact}}=105$ min at pH 4.5) giving rise to the enzyme derivative with potency neither for isomerization, nor for nucleophile-assisted reactivation. A method was proposed for determining the «potentially active» *cis*-cinnamoylsubtilisin.
