

Активность α -химотрипсина, иммобилизованного бислоями фосфолипидными мембранами

Ю. Е. Шапиро, А. В. Смирнова, И. Ф. Макаревич, А. В. Улесов

Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины
270080, Одесса, Черноморская дорога, 86

Государственный научный центр лекарственных средств
310085, Харьков, ул. Астрономическая, 33

*Иммобилизация α -химотрипсина бислоями фосфолипидными липосомами приводит к увеличению константы Михаэлиса в 2,3 раза и снижению во столько же раз максимальной скорости процесса (субстрат: *n*-нитрофенилацетат) из-за влияния диффузионных факторов.*

Введение. Переход от воды как среды ферментативной реакции к органическому растворителю или выход из оптимального диапазона pH и температуры в водной фазе сопровождаются либо денатурацией фермента, либо резким падением его каталитической активности с исчезновением субстратной специфичности [1].

Этого можно избежать, создавая водо- или органорастворимые биокаталитические системы, в качестве которых могут быть использованы обращенные мицеллы ПАВ [2], ламеллярные структуры [3] или липосомы [4]. При этом фермент оказывается защищенным от денатурирующего воздействия и его активность практически не снижается [5].

Следует отметить, что данные об организации биокаталитических ансамблей дополняют наши представления о строении и функционировании биологических мембран и расширяют возможности практического использования ферментативного катализа в биотехнологии, для химического анализа — определения с помощью ферментов как водорастворимых, так и нерастворимых в воде субстратов, для создания новых лекарственных форм на основе ферментов.

При иммобилизации фермента внутри фосфолипидных липосом в процессе ферментативной реакции молекулы субстрата диффундируют через

липидный бислой к месту локализации фермента, а продукты реакции — в обратном направлении. Поэтому диффузионные факторы должны оказывать существенное влияние на кинетику реакции. Их влияние на активность α -химотрипсина, иммобилизованного моноламеллярными бислоями липосомами, рассмотрено в настоящей работе.

Для математического описания гетерогенной каталитической системы в работе [6] приняты следующие допущения:

1) диффузия субстрата внутри матрицы может быть описана первым законом Фика с эффективным коэффициентом диффузии $D_{\text{эф}}$, не зависящим от концентрации и усредненным по всей биокаталитической частице, без учета того, что в ней могут быть поры и непроницаемые участки;

2) специфические взаимодействия между субстратом и фосфолипидной мембраной отсутствуют;

3) скорость V ферментативной реакции описывается уравнением

$$V = -\frac{dC}{dt} = V_{\text{max}} C / (K'_M + C), \quad (1)$$

где C — локальная концентрация субстрата в биокаталитической частице; V_{max} и K'_M — истинные кинетические параметры ферментативного процесса внутри носителя, которые предполагаются постоянными по всей частице.

В общем случае концентрация субстрата на заданной глубине x бислои мембраны описывается уравнением стационарности [7]:

$$D \frac{d^2C}{dx^2} = k'_{\text{кат}} [E]_{\text{имм}} l / (K'_M + C), \quad (2)$$

где $k'_{\text{кат}}$ — истинная каталитическая константа скорости ферментативной реакции внутри носителя; $[E]_{\text{имм}}$ — концентрация иммобилизованного липосомами фермента; l — толщина бислоя. Общее количество фермента в одной биокаталитической частице $[E] = [E]_{\text{имм}} Al$, где A — площадь внутренней (или наружной) поверхности мембраны.

Вклад диффузии субстрата предложено [6] охарактеризовать фактором F , названным фактором эффективности:

$$F = \frac{2}{\alpha l} \frac{\text{oh} \alpha l - 1}{\text{sh} \alpha l} = \frac{2 \text{th}(\alpha l / 2)}{\alpha l}, \quad (3)$$

где $\alpha = (k'_{\text{кат}} [E]_{\text{имм}} / K'_M D)^{1/2}$. При $C \approx K'_M$ и $\alpha l > 3$

$$F \approx 2 / \alpha l. \quad (4)$$

Для приближенной оценки удобно принять, что значения $k'_{\text{кат}}$ и K'_M , определяющие параметр α , мало отличаются от кинетических параметров реакции, протекющей в воде. Наблюдаемое значение константы Михаэлиса можно найти из простого соотношения: $K_M = K'_M / PF$, где P — коэффициент распределения [7]. При $\alpha l \leq 1$ фактор F отличается от единицы не более чем на 10 %, т. е. влиянием диффузии можно пренебречь. При $\alpha l > 1$ фактор F заметно меньше единицы, и диффузионные факторы вносят существенный вклад в кинетику процесса. Таким образом, отличие αl от единицы может служить критерием влияния диффузии на скорость реакции.

Материалы и методы. В работе использовали очищенный методом гель-фильтрации α -химотрипсин (ЕС 3.4.21.1) производства «Биохимреактив» (Олайне, Латвия). Концентрация α -химотрипсина в опытах составляла $(1,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$ М.

В качестве буферной системы использовали 0,1 М раствор трис-(оксиметил)-аминометана (трис) с добавлением 0,1 М раствора HCl до оптимального для химотрипсина значения pH $8,0 \pm 0,1$. Значения pH буферных растворов измеряли на иономере ЭВ-74.

n-Нитрофенилацетат синтезировали кипячением полуторного избытка уксусного ангидрида с *n*-нитрофенолятом натрия в течение 1 ч. Продукт перекристаллизовывали дважды из абсолютного этанола [8]. Температура плавления полученного вещества составляла $79,8$ °С, что соответствует справочным данным ($t_{\text{пл}} = 79$ °С). Хроматографическое определение и спектр ПМР показали, что синтезированное вещество достаточно чистое.

n-Нитрофенол, использованный для построе-

ния спектрофотометрической калибровочной прямой, был перекристаллизован трижды.

Исходный раствор субстрата готовили, растворяя навески *n*-нитрофенилацетата в 1 мл ацетонитрила, а затем разбавляя ацетонитрильный раствор буфером 0,1 М трис-HCl. Конечные растворы субстрата содержали 10 % (v/v) ацетонитрила.

Раствор свободной или липосомной формы фермента и раствор субстрата смешивали в соотношении 2:1. Концентрацию субстрата, используемую в параллельных опытах, варьировали от $3,4 \cdot 10^{-4}$ до $3,4 \cdot 10^{-3}$ М при одинаковой концентрации фермента.

Для приготовления липосом использовали суммарную смесь фосфолипидов соевых бобов: фосфатидилхолина, фосфатидилинозита и фосфатидной кислоты. Причем жирнокислотный состав фосфолипидов соевых бобов следующий [9]: 16:0, 14 %; 18:0, 4 %; 18:1, 12 %; 18:2, 65 %; 18:3, 5 %.

Иммобилизацию осуществляли при совместной обработке раствора фермента и водной (буферной) дисперсии мультиламеллярных липосом ультразвуком с помощью диспергатора УЗДН-1УЧ2. Время ультразвуковой обработки составляло 20 мин. Неиммобилизованный липосомами фермент отделяли от иммобилизованного геля-фильтрацией на сефадексе G-50 методом, описанным в работе [10].

Ферментативную активность измеряли спектрофотометрически по выделению продукта реакции *n*-нитрофенола (*n*-нитрофенолят-иона), имеющего максимум поглощения при 400 нм. Полоса поглощения *n*-нитрофенола не совпадает с таковой исходного субстрата (*n*-нитрофенилацетата) при 312 нм. Спектрофотометрическое определение проводили на спектрофотометре Perkin-Elmer Lambda-9. Возможности прибора позволяют делать измерения в УФ- и видимой областях с погрешностью: для длины волны — $\pm 0,2$ нм, для оптической плотности — $\pm 0,003$ А. Реакционную смесь помещали в кювету с длиной оптического пути 1 см. В качестве раствора сравнения использовали раствор трис-буфера. Сканирование осуществляли через промежутки времени, равные 30 с, в течение 15 мин прохождения ферментативного процесса.

Результаты и обсуждение. В водных средах *n*-нитрофенилацетат подвержен самопроизвольному гидролизу. Поэтому первоначально в «холостом» опыте определяли константу скорости неферментативного гидролиза, составившую $(5,92 \pm 0,25) \cdot 10^{-4}$ с⁻¹. Величина полученной константы почти на два порядка меньше таковой для ферментативного процесса в присутствии α -химотрипсина, которая составляет $(4,99 \pm 0,22) \cdot 10^{-2}$ с⁻¹. Поэтому можно утверждать, что самопроизвольный

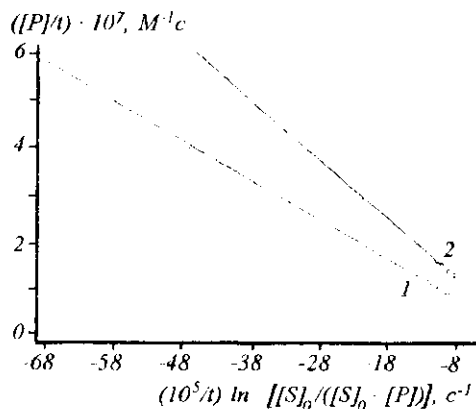


Рис. 1. Анаморфозы в координатах Фостера—Ниманна для определения кинетических параметров реакции гидролиза *p*-нитрофенилацетата, катализируемого α -химотрипсином, растворенным в водном буферном растворе (1) и находящимся в бислойных фосфолипидных липосомах (2) (рН 8,0, 20 °С)

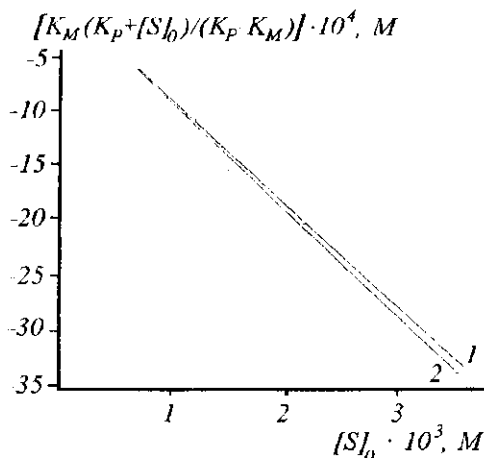


Рис. 2. Анаморфозы в координатах $S_0 - K_M(K_p + S_0)/(K_M - K_p)$, построенные для тех же каталитических систем, что и на рис. 1

гидролиз *p*-нитрофенилацетата не вносит существенных погрешностей при определении параметров активности α -химотрипсина.

Результаты спектрофотометрического определения параметров активности обрабатывали с использованием интегральной формы уравнения Михаэлиса — Ментен методом Фостера — Ниманна [11].

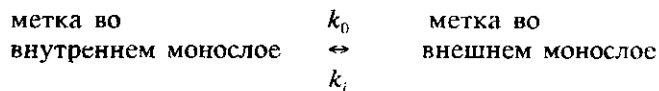
На рис. 1 и 2 приведены анаморфозы для раствора α -химотрипсина в трис-буфере и α -химотрипсина, иммобилизованного бислойными липосомами. Обработка результатов эксперимента позволила найти значения кинетических параметров реакции ферментативного гидролиза *p*-нитрофенилацетата. В растворе в трис-буфере значения $K_M =$

$= (6,24 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$ М и максимальной скорости $V_{\max} = (8,99 \pm 0,13) \cdot 10^{-7}$ М/с оказались близкими к литературным данным [12] ($K_M = 7 \cdot 10^{-4}$ М).

Измерения ферментативной активности показали, что иммобилизация α -химотрипсина в липосомах вносит изменения в кинетические параметры ферментативного процесса гидролиза. Основные причины этих изменений — влияние на процесс внутридиффузионных факторов. Поэтому для оценки внутридиффузионных ограничений необходимо найти коэффициенты диффузии молекул субстрата и продукта реакции.

Можно предположить, что диффузия достаточно липофильных молекул *p*-нитрофенилацетата и *p*-нитрофенола через фосфолипидный бислой происходит по схеме пассивного транспорта. При этом трансмембранный перенос молекул фосфолипида определяет скорость диффузии липофильных молекул.

Согласно данным МакКоннела [14], константы скоростей перехода спин-меченного фосфатидилхолина из внешнего монослоя везикулярной мембраны во внутренний (k_i) и из внутреннего во внешний (k_o) составляет 0,04 и 0,07 ч^{-1} при 30 °С соответственно. Для подобного обратимого процесса:



можно записать:

$$\frac{dN_i}{dt} = k_i N_o - k_o N_i, \quad (5)$$

где N_i и N_o — число спин-меченных молекул во внешнем и внутреннем монослоях. Учитывая равновесность процесса, получаем

$$k_i N_o^{\text{равн}} = k_o N_i^{\text{равн}}; \quad (6)$$

$$N_i + N_o = N_i^{\text{равн}} + N_o^{\text{равн}}. \quad (7)$$

Подставляя равенства (6) и (7) в уравнение (5), можно преобразовать его следующим образом:

$$\frac{d(N_i - N_i^{\text{равн}})}{dt} = -k(N_i - N_i^{\text{равн}}), \quad (8)$$

где $k = k_i + k_o$.

Из уравнения (8) число молекул можно выразить через количество молей вещества:

$$\frac{d(n_i - n_i^{\text{равн}})}{dt} = -k(n_i - n_i^{\text{равн}}) \quad (9)$$

Если процесс диффузии описывается уравнением Фика, то

$$\frac{1}{A} \frac{dn}{dt} = -D \frac{dc}{dx}, \quad (10)$$

где $A = \pi d^2$ — площадь поверхности мембраны; d — наружный диаметр везикулы; D — коэффициент трансмембранной диффузии; dn/dt — число молей, переносимых через поверхность A .

При условии стационарности транспорта через мембрану в уравнении (10) переходим к конечным разностям:

$$\frac{1}{\pi d^2} \frac{dn}{dt} = -D \frac{(c_i - c_i^{равн})}{l}, \quad (11)$$

где l — толщина бислоевой мембраны.

Подставляя в уравнение (11) соотношение (9), получаем уравнение

$$\frac{k(n_i - n_i^{равн})}{\pi d^2} = D \frac{(c_i - c_i^{равн})}{l}, \quad (12)$$

из которого, учитывая, что $C = n/V$, где $V = \pi l (d^2 - 2dl + 4/3l^2)$ — объем фосфолипидного бислоя, можно найти коэффициент диффузии D :

$$D = \frac{k l V}{\pi d^2} = k l^2 (d^2 - 2dl + 4/3l^2) / d^2. \quad (13)$$

Значения коэффициента диффузии D и фактора эффективности F рассчитаны с использованием полученных экспериментальных данных о каталитической активности ($k'_{кат}$, K'_M) и геометрических размеров везикул из фосфатидилхолина и фосфатидилинозита, определенных [14] методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Как видно из табл. 1, коэффициенты диффузии довольно малы, поэтому фактор эффективности $F < 1$. Отсюда следует, что диффузионные ограничения, накладываемые на доступность активного центра фер-

Таблица 1
Значения геометрических параметров фосфолипидных везикул из фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилинозита (ФИ), расчетных величин коэффициента диффузии и фактора эффективности

Параметр	ФХ	ФИ
Наружный диаметр везикулы, нм	23	19
Толщина бислоя, нм	3,5	3,5
Коэффициент трансмембранной диффузии, м ² /с	$2,72 \cdot 10^{-22}$	$2,53 \cdot 10^{-22}$
al	1,27	1,31
Фактор эффективности	0,884	0,878

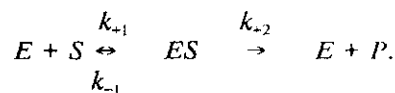
Таблица 2
Кинетические параметры ферментативного гидролиза *n*-нитрофенилацетата неиммобилизованным и иммобилизованным в фосфолипидных липосомах α -химотрипсином

Каталитическая система	K_M , М	$K_M^{эф}$, М	V_{max} , М/с
α -Химотрипсин			
неиммобилизованный	$(6,24 \pm \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$	—	$(8,99 \pm \pm 0,13) \cdot 10^{-8}$
иммобилизованный в липосомах	$(1,46 \pm \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$1,42 \cdot 10^{-3}$	$(3,99 \pm \pm 0,04) \cdot 10^{-8}$

мента, иммобилизованного в липосомах, действительно сказываются на значениях кинетических параметров процесса.

Известно, что диффузионные ограничения, накладываемые на доступ субстрата к активному центру иммобилизованного фермента, неизменно приводят к тому, что величина константы Михаэлиса оказывается больше значения, полученного для свободного фермента, а величина V_{max} — меньше или равной исходной [15]. Как видно из табл. 2, расчетное значение $K_M^{эф}$, полученное делением K_M , найденного для неиммобилизованного фермента, на величину $F = 0,88$ при значении коэффициента распределения $P = 0,5$, оказалось практически совпадающим с величиной K_M , определенной для α -химотрипсина, иммобилизованного фосфолипидными везикулами. Это свидетельствует о том, что учет диффузионных факторов при иммобилизации α -химотрипсина выполнен, в общем, правильно.

Из табл. 2 видно, что иммобилизация α -химотрипсина фосфолипидными липосомами способствует увеличению константы Михаэлиса в 2,34 раза и понижению V_{max} в 2,25 раза. Можно предположить, что эти изменения обусловлены либо неконкурентным ингибированием фермента молекулами фосфолипидов, приводящим к падению скорости образования продукта реакции, либо уменьшением константы скорости k_{-1} образования фермент-субстратного комплекса по известной схеме ($K_M = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$):



Полученные результаты качественно согласуются с выводами, сделанными ранее [16] для

ферментативного катализа в пленках из нитрата целлюлозы разной толщины.

Таким образом, для определения истинных значений каталитических параметров ферментативного процесса при иммобилизации фермента липосомами необходим учет диффузионных факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госкомитета Украины по науке и технологиям (грант 1.01.02.02/018-93).

Ю. С. Шапиро, А. В. Смирнова, І. Ф. Макаревич, А. В. Улесов

Активність α -хімотрипсину, іммобілізованого бішаровими фосфоліпідними мембранами

Резюме

Кінетичні параметри ферментативного гідролізу класичного субстрату, *p*-нітрофенілацетату, у присутності α -хімотрипсину, іммобілізованого чи не іммобілізованого фосфоліпідними бішаровими ліпосомами, суттєво відрізняються. Іммобілізація α -хімотрипсину спричинює збільшення константи Міхаеліса і зниження максимальної швидкості процесу в 2,3 рази. Ці відмінності обумовлені дифузійними факторами, виникаючими при іммобілізації ферменту. Дійсно, величина ефективного коефіцієнта дифузії компонентів реакційної системи, практично збігається з експериментально знайденою для α -хімотрипсину, іммобілізованого ліпосомами.

Yu. E. Shapiro, A. V. Smirnova, I. F. Makarevich, A. V. Ulesov

An activity of α -chymotrypsin immobilized by bilayer phospholipid membranes

Summary

The kinetic parameters for enzymatic hydrolysis of classic substrate, *p*-nitrophenyl acetate, in presence of α -chymotrypsin immobilized and nonimmobilized by phospholipid bilayer liposomes are essentially different. The immobilization of α -chymotrypsin tends to increase of the value of Michaelis constant and to decrease of the value of maximum rate by a factor of 2.3. These distinctions are conditioned by diffusional factors arised with immobilization of enzyme. Indeed, the value of appropriate Michaelis constant calculated according to the diffusion coefficient for components of reaction medium is practically in agreement with experimental constant for α -chymotrypsin immobilized by phospholipid vesicles.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мартинек К. Успехи биоорганического катализа / Под.

ред. И. В. Березина, К. Мартинек.—М.: Изд-во МГУ, 1979.—105 с.

2. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. Катализ водорастворимыми ферментами в органических растворителях // Докл. АН СССР.—1977.—236, № 4.—С. 920—923.
3. Шапиро Ю. Е., Пыхтеева Е. Г., Левашов А. В., Клячко Н. Л. Морфология обращенных фибриллярных мицелл и лиотропных фаз Бридж-96 в циклогексане, инкапсулирующих альбумин // Биол. мембраны.—1993.—10, № 4.—С. 397—408.
4. Липосомы в биологических системах / Под ред. Г. Грегориадаса, А. Аллисона.—М.: Медицина, 1983.—156 с.
5. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. Микрогетерогенная среда для химических (ферментативных) реакций на основе коллоидного раствора воды в органическом растворителе // Успехи химии.—1984.—53, № 4.—С. 545—565.
6. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика.—М.: Наука, 1979.—127 с.
7. Березин И. В., Клибанов А. М., Мартинек К. Кинетико-термодинамические аспекты катализа иммобилизованными ферментами // Успехи химии.—1975.—44, № 1.—С. 17—47.
8. Chattaway F. D. Acetylation in aqueous alkaline solutions // J. Chem. Soc.—1931.—N 9.—P. 2495—2499.
9. Drouot X. Accumulation of sulphite by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* as affected by phospholipid fatty-acyl unsaturation and chain length // Brit. Haematol.—1989.—73.—P. 143—149.
10. Krauth W., Werner D. Analysis of the most tightly bound proteins in eukaryotic DNA // Biochim. et biophys. acta.—1979.—564.—P. 390—401.
11. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа.—М.: Высш. шк, 1977.—250 с.
12. Wahlby S. Rate of acetylation of α -chymotrypsin by *p*-nitrophenyl[14 C] acetate studied by isolation of [14 C]-acetyl enzyme // Acta Chim. Scand.—1970.—24.—P. 2429—2434.
13. Kornberg R. D., McConnell H. Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes // Biochemistry.—1971.—10, N 7.—P. 111—1120.
14. Cain J., Sautillan G., Blaisie J. K. Membrane Research.—New York: Acad. press, 1978.—
15. Трувен М7 Иммобилизованные ферменты.—М.: Мир, 1983.—68 с.
16. Goldman R., Kedem O., Katchalski E. Papain collogion membranes II. Analysis of the kinetics behaviour of enzymes immobilized in artificial membrancs // Biochemistry.—1968.—7.—P. 4518—4520.

УДК 661.185.1+547.96+541.128.135

Поступила в редакцию 02.07.96