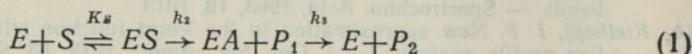


УДК 577.152.344.02

Т. КЕСВАТЕРА, Марика КОСК, А. ААВИКСААР

**ВЛИЯНИЕ pH НА СОЛЕВОЙ ЭФФЕКТ В АЦИЛИРОВАНИИ  
 α-ХИМОТРИПСИНА БУТИРИЛТИОХОЛИНОМ**

Из литературы известно [1], что влияние соли на бимолекулярную константу скорости ацилирования активного центра α-химотрипсина зависит от pH реакционной среды и приводит к искажению pH-зависимости константы  $k_2/K_m$ , измеренной в присутствии неорганических солей. В целях выяснения закономерностей в кинетическом проявлении взаимосвязи действия этих двух факторов среды на ацилирование химотрипсина в настоящей работе изучено влияние KCl на бимолекулярную константу скорости  $k_{II} \equiv k_2/K_S$  для реакции фермента с бутирилтиохолином при различных значениях pH. Для этого субстрата нетрудно определить и элементарные константы  $k_2$  и  $K_S$  [2] в трехстадийной реакции



и тем самым установить, на какой стадии процесса проявляется солевой эффект.

Полученные данные по влиянию концентрации KCl на бимолекулярную константу скорости (табл. 1) мы представили в виде зависимости  $\lg k_{II}$  от молярной концентрации KCl (рис. 1). Как видно, при всех изученных значениях pH влияние соли включает два эффекта. Наблюдаемую при  $C_{KCl} > 1$  М линейную зависимость  $\lg k_{II}$  от  $C_{KCl}$  можно рассматривать как проявление эффекта высаливания [3, 4]. Отклонения от этой линейной зависимости при  $C_{KCl} < 1$  М должны быть связаны с наличием

Таблица 1

**Влияние pH и концентрации KCl на константу скорости второго порядка α-химотрипсинового гидролиза бутирилтиохолина при 25 °C в 0,1 М фосфатном буфере**

$C_{KCl}$ , М	$k_{II}$ , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>				
	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5
0	4,365	9,931	15,38	14,79	14,12
0,05	4,227	9,484	14,45	—	—
0,10	3,573	8,204	13,20	14,26	14,29
0,15	—	8,912	14,22	—	—
0,20	3,428	7,907	13,55	13,96	14,29
0,40	2,812	7,516	12,10	13,84	13,68
0,60	2,891	7,211	12,56	13,74	13,68
0,90	2,570	6,855	12,70	13,87	15,42
1,40	2,541	7,014	14,39	16,40	17,54
1,90	2,234	7,311	15,63	19,50	23,01
2,40	2,254	7,586	17,78	24,72	28,77
2,90	2,104	8,017	20,89	28,31	33,81

Стандартное отклонение не превышает 5%.

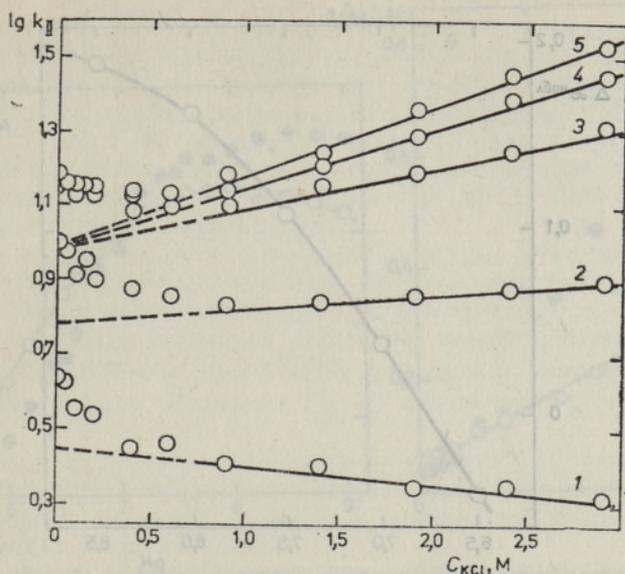


Рис. 1. Зависимость  $\lg k_{II}$  от  $C_{KCl}$  для химотрипсинового гидролиза бутирилтиохолина в 0,1 М фосфатном буфере при 25 °С и рН 6,5 (1), 7,0 (2), 7,5 (3), 8,0 (4), 8,5 (5).

заряда в молекуле субстрата, так как в случае незаряженного субстрата, п-нитрофенилтиоацетата, в промежутке ионной силы ( $\mu$ ) от 0,005 до 0,25 не было обнаружено влияния солей на  $k_{II}$  [5]. Таким образом, обозначая электростатический член в уравнении солевого эффекта [3, 4] через  $\Delta \lg k_{II}(\mu)$ , влияние соли на реакцию ацилирования  $\alpha$ -химотрипсина можно описать выражением

$$\lg k_{II} = \lg k_{II}^0 + \Delta \lg k_{II}(\mu) + \Delta \chi^{\text{набл}} C_{KCl}, \quad (2)$$

где  $\lg k_{II}^0$  — независимая от добавок соли часть в величине  $\lg k_{II}$ , соответствующая неэлектростатическому вкладу в свободную энергию активации,  $\Delta F^\ddagger = \Delta F_{\text{nonel}}^\ddagger + \Delta F_{\text{el}}^\ddagger(\mu) + 2,303 RT \Delta \chi C_{\text{соль}}$  [4] и  $\Delta \chi$  — разность коэффициентов высаливания реагентов в исходном и переходном состояниях, индексом отмечена возможная зависимость экспериментально определяемой  $\Delta \chi$  от свойств среды. Значения  $\Delta \chi^{\text{набл}}$  и  $\lg k_{II}^0$  можно найти экстраполяцией данных табл. 1 по уравнению (2) при  $\mu > 1$ , когда электростатический член в этом уравнении равен нулю [4].

Таблица 2

Влияние рН на значения параметров уравнения (2) для бимолекулярной реакции ацилирования  $\alpha$ -химотрипсина бутирилтиохолином при 25 °С в растворах КСl

рН	$\lg k_{II}^0$	$\Delta \chi^{\text{набл}}$
6,5	$0,457 \pm 0,018$	$-0,044 \pm 0,024$
7,0	$0,788 \pm 0,005$	$0,038 \pm 0,006$
7,5	$0,987 \pm 0,017$	$0,108 \pm 0,030$
8,0	$0,971 \pm 0,018$	$0,163 \pm 0,032$
8,5	$0,970 \pm 0,024$	$0,190 \pm 0,042$

Использованы данные табл. 1 при  $\mu > 1$  исходя из предположения, что в этих условиях  $\Delta \lg k_{II}(\mu)$  в уравнении (2) равна нулю.

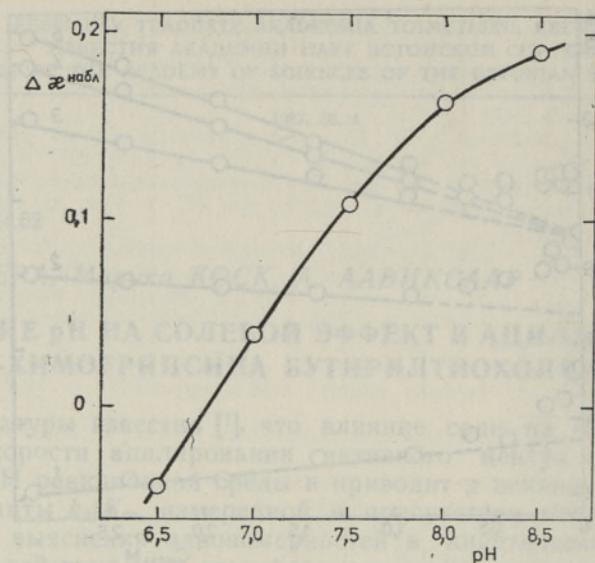


Рис. 2. Зависимость  $\Delta \varepsilon^{\text{набл}}$  от pH для реакции ацилирования химотрипсина бутирилтиохолином при 25 °С в растворах KCl.

Величины  $\Delta \varepsilon^{\text{набл}}$  и  $\lg k_{\text{II}}^0$  при различных значениях pH представлены в табл. 2. Из этой таблицы (а также из рис. 1) видно, что определяемый из зависимостей  $\lg k_{\text{II}}$  от  $C_{\text{KCl}}$  эффект высаливания в ацилировании активного центра  $\alpha$ -химотрипсина под действием бутирилтиохолина весьма существенно, вплоть до обращения знака коэффициента  $\Delta \varepsilon^{\text{набл}}$ , зависит от pH среды. При pH около 6,8  $\Delta \varepsilon^{\text{набл}}$  должна быть равна нулю (рис. 2).

Эти эффекты, естественно, отражаются и в pH-зависимостях константы  $k_{\text{II}}$ . Если в 0,15 М фосфатном буфере влияние pH на активность фермента достаточно хорошо описывается известным уравнением [6]

$$k_{\text{II}} = \frac{k_{\text{II}, \text{lim}}}{1 + [\text{H}^+]/K_{a1} + K_{a2}/[\text{H}^+]} \quad (3)$$

(со значениями  $pK_{a1} = 7,04 \pm 0,04$ ,  $pK_{a2} = 9,15 \pm 0,10$  и  $k_{\text{II}, \text{lim}} = 20,6 \pm 1,0 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ), то в 2,9 М растворе калийхлористого pH-зависимость  $k_{\text{II}}$  сильно искажена (рис. 3, А). Более наглядно это видно в координатах  $1/k_{\text{II}}$  от  $[\text{H}^+]$  (рис. 3, Б), когда при  $C_{\text{KCl}} = 2,9 \text{ М}$  зависимость  $1/k_{\text{II}}$  от  $[\text{H}^+]$  оказывается нелинейной и определение значения  $pK_{a1}$  в этих условиях невозможно.

Механизм зависимости эффекта высаливания от pH остается пока неизвестным. Отметим только, что этот эффект в данной реакции, по всей вероятности при всех значениях pH, проявляется только на стадии связывания субстрата. Для pH 8,0 это было подтверждено следующими экспериментальными данными: разности логарифмов кинетических параметров, определенных в 3,0 и 1,0 М растворах KCl, составляли  $0,26 \pm 0,07$  для  $pK_S$  и  $0,06 \pm 0,11$  для  $\lg k_2$  (в 3,0 М растворе KCl  $K_S = 0,032 \pm 0,003 \text{ М}$  и  $k_2 = 0,9 \pm 0,1 \text{ с}^{-1}$ , а в 1,0 М растворе KCl —  $K_S = 0,059 \pm 0,003 \text{ М}$  и  $k_2 = 0,76 \pm 0,09 \text{ с}^{-1}$ ).

Подставляя значения  $\lg k_{\text{II}}^0$  и  $\Delta \varepsilon^{\text{набл}}$  (табл. 2) в уравнение (2), можно исходя из данных табл. 1 вычислить для каждого значения pH электростатический вклад  $\Delta \lg k_{\text{II}}(\mu)$  в логарифм константы скорости  $k_{\text{II}}$  как  $\lg k_{\text{II}} - (\lg k_{\text{II}}^0 + \Delta \varepsilon^{\text{набл}} C_{\text{KCl}})$  при данной концентрации соли,

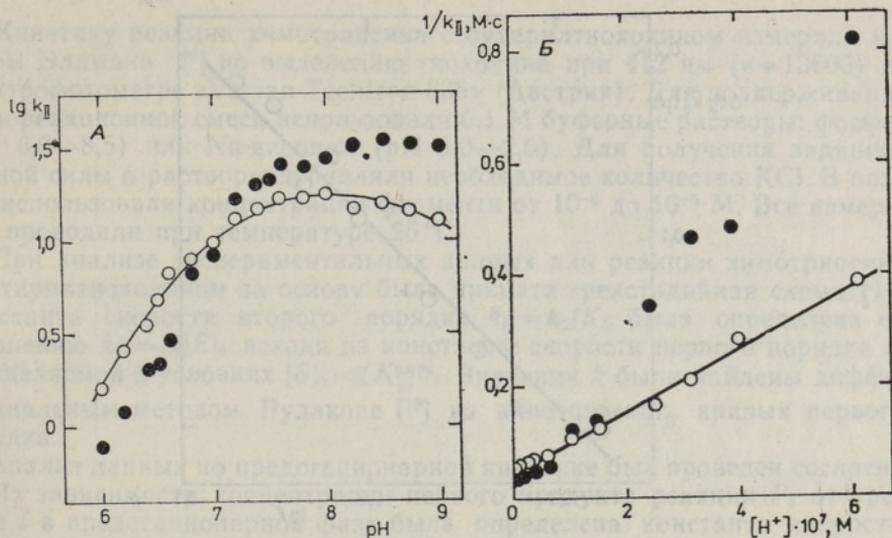


Рис. 3. Влияние pH на бимолекулярную константу скорости химотрипсинового гидролиза бутирилтиохолина при 25 °C в 0,15 М фосфатном буфере при  $C_{KCl} = 0$  (○) и 2,9 М (●).

Если результат такого расчета представить в виде зависимости  $\Delta \lg k_{II}(\mu)$  от  $\sqrt{\mu}$  (рис. 4), то можно видеть, что для  $\Delta \lg k_{II}(\mu)$  наблюдается независимая от pH зависимость от  $\sqrt{\mu}$ . При значениях  $\mu > 1$  электростатический эффект  $\Delta \lg k_{II}(\mu)$  равен нулю, а при  $\mu < 1$  он возрастает. Экстраполяция линейной части этой зависимости к  $\mu = 0$  дает максимальное значение  $\Delta \lg k_{II} = 0,29 \pm 0,02$ .

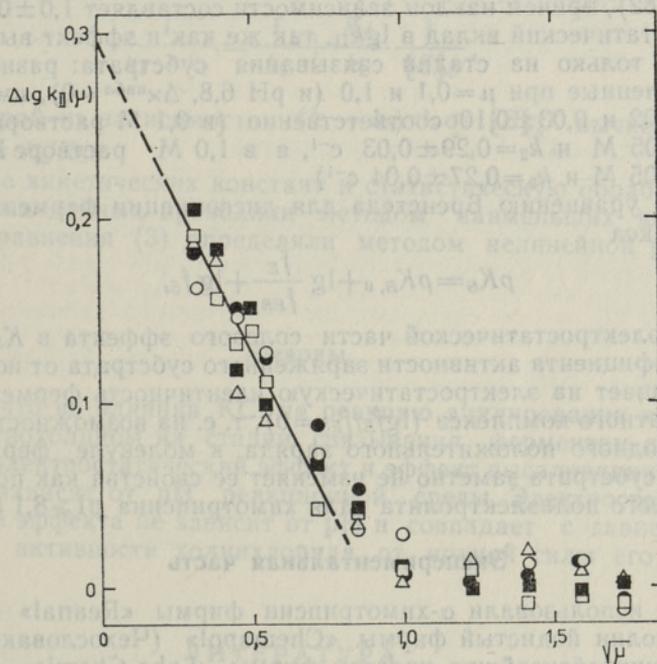


Рис. 4. Зависимость электростатического эффекта  $\Delta \lg k_{II}(\mu)$  от  $\sqrt{\mu}$  при 25 °C и значениях pH 8,5 (○), 8,0 (●), 7,5 (□), 7,0 (■), 6,5 (△).

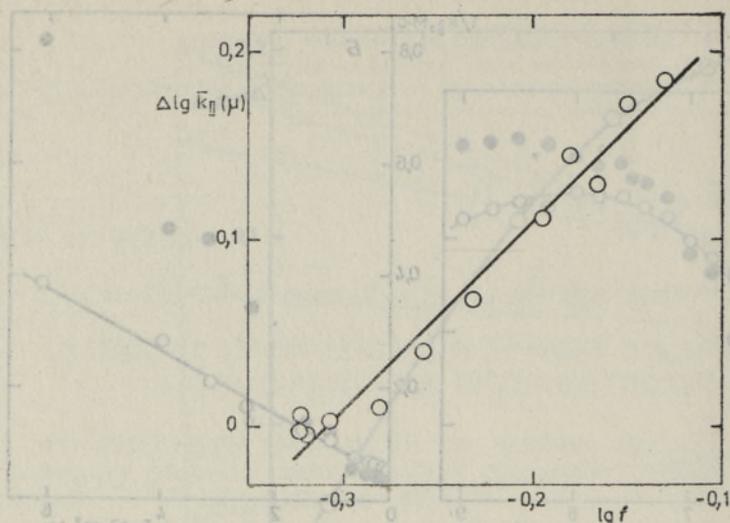


Рис. 5. Сопоставление электростатической части солевого эффекта в реакции ацилирования химотрипсина под действием бутирилтиохолина с логарифмом коэффициента активности холинхлорида [7] в водных растворах. На рисунке представлены независимые от рН в промежутке 6,5—8,5 средние для данной ионной силы значения  $\Delta \lg \bar{k}_{II}(\mu)$ .

Интересно отметить, что между электростатическим эффектом в реакции химотрипсина с бутирилтиохолином и зависимостью коэффициента активности холинхлорида от ионной силы имеет место хорошее соответствие. При сопоставлении средней для изученных рН величины  $\Delta \lg \bar{k}_{II}(\mu)$  с логарифмом коэффициента активности холинхлорида (данные при  $\mu$  от 0,1 до 3,0 [7]) наблюдается статистически значимая корреляция ( $r$  0,982), причем наклон зависимости составляет  $1,0 \pm 0,1$  (рис. 5).

Электростатический вклад в  $\lg k_{II}$ , так же как и эффект высаливания, проявляется только на стадии связывания субстрата: разности  $pK_s$  и  $\lg k_2$ , определенные при  $\mu=0,1$  и 1,0 (и рН 6,8,  $\Delta \chi^{набл}=0$ ), имели значения  $0,26 \pm 0,02$  и  $0,03 \pm 0,10$  соответственно (в 0,1 М растворе КСl  $K_s=0,040 \pm 0,005$  М и  $k_2=0,29 \pm 0,03$  с<sup>-1</sup>, а в 1,0 М растворе КСl —  $K_s=0,072 \pm 0,005$  М и  $k_2=0,27 \pm 0,04$  с<sup>-1</sup>).

Согласно уравнению Бренстеда для диссоциации фермент-субстратного комплекса

$$pK_s = pK_{s,0} + \lg \frac{f_E}{f_{ES}} + \lg f_s, \quad (4)$$

совпадение электростатической части солевого эффекта в  $K_s$  с зависимостью коэффициента активности заряженного субстрата от ионной среды указывает на электростатическую идентичность фермента и фермент-субстратного комплекса ( $\lg f_E/f_{ES}=0$ ), т. е. на возможность того, что добавление одного положительного заряда к молекуле фермента при связывании субстрата заметно не изменяет ее свойства как положительно заряженного полиэлектролита (для химотрипсина  $pI \geq 8,1$  [8]).

### Экспериментальная часть

В работе использовали  $\alpha$ -химотрипсин фирмы «Reanal» (Венгрия), бутирилтиохолин йодистый фирмы «Chemapol» (Чехословакия) и 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойную кислоту фирмы «Loba-Chemie» (Австрия). Раствор химотрипсина (150 мг/мл) готовили в  $5 \cdot 10^{-5}$  М НСl. Концентрацию активных центров фермента определяли с помощью бутирилтиохолина [2].

Кинетику реакции химотрипсина с бутирилтиохолином измеряли методом Элмана [9] по выделению тиохолина при 412 нм ( $\epsilon=13600$ ) на спектрофотометре «Varian-Techtron 635» (Австрия). Для поддержания рН в реакционной смеси использовали 0,1 М буферные растворы: фосфат (рН 6,0—8,5) или Na-веронал (рН 8,0—9,0). Для получения заданной ионной силы в растворы добавляли необходимое количество KCl. В опытах использовали концентрации фермента от  $10^{-6}$  до  $10^{-5}$  М. Все измерения проводили при температуре 25 °С.

При анализе экспериментальных данных для реакции химотрипсина с бутирилтиохолином за основу была принята трехстадийная схема (1). Константа скорости второго порядка  $k_{11}=k_2/K_S$  была определена по уравнению  $k_{11}=k/[E]_0$  исходя из константы скорости первого порядка  $k$ , определяемой в условиях  $[S]_0 \ll K_m^{\text{каж}}$ . Значения  $k$  были найдены дифференциальным методом Рудакова [10] из кинетических кривых первого порядка.

Анализ данных по предстационарной кинетике был проведен согласно [6]. Из зависимости концентрации первого продукта реакции  $P_1$  от времени  $t$  в предстационарной фазе была определена константа скорости первого порядка  $k_1$  по уравнению

$$\ln\left(1 - \frac{[P_1] - A \cdot t}{B}\right) = -k_1 \cdot t, \quad (5)$$

где  $A$  — скорость реакции в стационарном режиме и  $B$  — величина начального выброса продукта  $P_1$ . Из зависимости  $k_1$  от  $[S]_0$  было найдено значение  $k_3$  по уравнению

$$k_1 = k_3 + \frac{k_2[S]_0}{K_S + [S]_0}. \quad (6)$$

Для определения  $k_2$  использовали трансформацию уравнения (6)

$$\frac{1}{k_1 - k_3} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_S}{k_2} \cdot \frac{1}{[S]_0}, \quad (7)$$

согласно которой из зависимости  $(k_1 - k_3)^{-1}$  от  $[S]_0^{-1}$  вычисляли значения  $k_2$ ,  $K_S$  и  $k_2/K_S$ .

Вычисление кинетических констант и статистическую обработку экспериментальных данных проводили методом наименьших квадратов. Параметры уравнения (3) определяли методом нелинейной регрессии [11].

### Выводы

Показано, что во влиянии KCl на реакцию ацилирования химотрипсина бутирилтиохолином на стадии связывания ферментом субстрата проявляются электростатический эффект и эффект высаливания. Эффект высаливания зависит от рН реакционной среды. Электростатическая часть солевого эффекта не зависит от рН и совпадает с зависимостью коэффициента активности холинхлорида от ионной силы его водного раствора.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bender, M. L., Schonbaum, G. R., Zerner, B. The pH dependence of some  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis. — J. Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 2562—2570.
2. Кесватера Т., Коск М., Аавиксаар А. Тиохолиновые эфиры как субстраты химотрипсина. — Изв. АН ЭССР. Хим., 1987, 36, № 2, 151—153.

3. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., 1966, 766.
4. Ярв Я. Л., Кесватера Т. А., Аавиксаар А. А. Высаливание в межонных реакциях. — Уч. зап. Тартуск. ун-та, 384. Тр. по химии (химический анализ), X(2). Тарту, 1976, 104—117.
5. Frankfater, A., Kezdy, F. J. Kinetics of hydrolysis of p-nitrophenyl thioacetate by chymotrypsin. — J. Amer. Chem. Soc., 1971, 93, 4039—4043.
6. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М., 1977, часть II.
7. Macaskill, J. B., Mohan, M. S., Bates, R. G. Activity coefficients and osmotic coefficients in aqueous solutions of choline chloride. — Anal. Biochem., 1977, 49, 209—212.
8. Anderson, E. A., Alberty, R. A. Homogeneity and the electrophoretic behavior of some proteins. II. Reversible spreading and steady-state boundary criteria. — J. Phys. Colloid Chem., 1948, 52, 1345—1364.
9. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. — Biochem. Pharmacol., 1961, 7, N 1, 88—95.
10. Рудаков Е. С. Дифференциальные методы расчета констант скоростей неосложненных химических реакций. — Кинетика и катализ, 1960, 1, 177—187.
11. Wilkinson, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. — Biochem. J., 1961, 80, 324—332.

Институт химической и биологической физики  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
23/III 1987

T. KESVATERA, Marika KOSK, A. AAVIKSAAR

#### KESKKONNA pH MÕJU SOOLAEFEKTILE $\alpha$ -KÜMOTRÜPSIINI ATSÜLEERIMISREAKTSIOONIS BUTÜRÜÜLTIOKOLIINIGA

Töös on uuritud KCl ( $\mu=0,1-3,0$ ) ja pH (6,0—9,0) mõju  $\alpha$ -kümotrüpsiini reaktsioonile butürüültkoliiniga temperatuuril 25 °C. On näidatud, et atsüleerimisreaktsioonis avalduv soolaefekt koosneb elektrostaatilisest osast ja soolamiseftist, kusjuures mõlemad mõjud esinevad ainult reaktsiooni sidumisstaadiumis. Soolamiseft sõltub tugevasti keskkonna pH-st. Soolaefti elektrostaatiline osa ei sõltu pH-st ning langeb kokku koliinkloriidi aktiivsuskoeffitsiendi sõltuvusega tema vesilahuse ioonest jõust.

T. KESVATERA, Marika KOSK, A. AAVIKSAAR

#### INFLUENCE OF pH ON SALT EFFECT IN CHYMOTRYPSIN ACYLATION WITH BUTYRYLTHIOCHOLINE

The influence of KCl ( $\mu=0.1-3.0$ ) and pH (6.0—9.0) on the kinetics of  $\alpha$ -chymotrypsin acylation with butyrylthiocholine at 25 °C has been studied. It is shown that the influence of KCl includes electrostatic and salting-out effects, both in the binding step only. The salting-out effect strongly depends on pH. The electrostatic part of the salt effect does not depend upon pH and coincides with the dependence of the choline chloride activity coefficient upon ionic strength.