



УДК 577.152.344.04

© 1991 г.

*Л. И. Кристаллик, Г. Е. Титова, В. В. Тополев***ВЛИЯНИЕ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАСТВОРИТЕЛЯ
НА СКОРОСТЬ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА***Институт электрохимии им. А. Н. Фрумкина АН СССР, Москва*

Рассмотрено влияние диэлектрических свойств растворителя на константу скорости ферментативных реакций. Два основных эффекта — влияние на энергию реакции и на энергию реорганизации — по-разному зависят от характеристик среды. В смесях вода — диметилсульфоксид ($\leq 50\%$ DMSO), где статическая диэлектрическая постоянная очень слабо зависит от концентрации DMSO, основной вклад вносит изменение энергии реорганизации среды. В этих смесях изучена кинетика катализируемого трипсинном гидролиза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-аргинина. Показано, что ускорение этой реакции на 35% в 30% DMSO по порядку величины согласуется с результатами теоретического расчета.

Влияние состава водно-органических растворителей на кинетику ферментативных реакций изучалось в различных аспектах. Мы сосредоточили внимание на эффектах, связанных с изменением константы скорости ферментативной реакции.

Увеличение доли органического растворителя приводит, как правило, к сильному (на порядки) возрастанию константы Михаэлиса и значительно меньшему изменению каталитической константы. Первый эффект обычно разумно объясняется конкурентным ингибированием молекулами органического растворителя, а также его влиянием на электростатические и гидрофобные взаимодействия. Константа скорости органическими растворителями обычно несколько снижается, но иногда и повышается [1—9]. Торможение объясняли слабым неконкурентным ингибированием, а ускорение — вытеснением воды, служащей ингибитором реакции. Спектральные методы не обнаруживали каких-либо изменений третичной структуры фермента при содержании органического растворителя, отвечающем относительно небольшим изменениям каталитической константы k_{cat} [2—4, 10, 11], хотя такие изменения наблюдаются, если концентрация растворителя столь велика, что скорость резко падает, но белок еще не денатурирует необратимо [10, 11].

Лейдлер [12, 13], исходя из теории абсолютных скоростей, рассмотрел частный случай — сближение или удаление в активированном состоянии двух зарядов, для которых энергия электростатического взаимодействия обратно пропорциональна расстоянию между ними и статической диэлектрической постоянной среды (ϵ_s). Позже в ряде работ подтверждена предсказанная им корреляция $\ln k_{cat}$ и $1/\epsilon_s$ [2, 12—15]. Обширный материал был получен Кастањеда-Агульо и дель Кастильо [16, 17], которые опирались на близкую по смыслу модель Амиса [18]. Надо, однако, отметить, что подобная корреляция существует далеко не всегда [5, 19—21].

Модели Лейдлера и Амиса неудовлетворительны по ряду причин: реагенты внутри активного центра белковой глобулы нельзя считать окруженными со всех сторон растворителем, не учитываются изменения энергии сольватации реагентов и активированного комплекса и, главное, сама теория переходного состояния в ее классической форме в существенной мере устарела. В рамках этой теории рассматривается лишь равновесная сольватация переходного состояния, т. е. не учитывается динамическая роль среды, изменение состояния которой само создает существенный активационный барьер.

Современная теория реакций переноса заряда в полярных средах (обзоры см., например, [22—25]) учитывает динамическую роль растворителя, которая находит отражение во влиянии свободной энергии реорганизации среды (см. ниже).

В наших предыдущих работах (обзоры см. [25, 26]) показано, что для микрогетерогенной системы (белок — окружающая среда) энергия реорганизации существенным образом зависит от свойств обоих компонентов. Если активный центр фермента расположен близко к поверхности глобулы, вклад реорганизации внешней среды оказывается большим, если не преобладающим. Поэтому изменение состава растворителя, изменение его диэлектрических свойств должно влиять на энергию активации в первую очередь через изменение энергии реорганизации.

Состав растворителя может также влиять на энергию активации, изменяя разность энергий исходных реагентов и продуктов стадии, определяющей скорость реакции. Поскольку эти реагенты (например, тетраэдрический интермедиат при гидролизе сериновыми протеиназами) заряжены, их энергия зависит от диэлектрических свойств окружения.

Важно подчеркнуть, что эти два эффекта зависят от разных свойств среды: энергия реакции — только от статической диэлектрической постоянной (ϵ_s), а энергия реорганизации — от статической (ϵ_s) и оптической (ϵ_0) диэлектрической постоянных. Это создает трудности при выборе растворителей для поиска корреляций, так что при таком поиске целесообразно исходить из определенных теоретических посылок. Мы выбрали для исследования смеси воды с диметилсульфоксидом (DMSO). В таких смесях вплоть до 50% (объемных) DMSO статическая диэлектрическая постоянная смеси почти неизменна, тогда как оптическая постоянная меняется сильно. Поэтому можно было ожидать, что в этом смешанном растворителе мы сможем изучить почти в чистом виде влияние состава смеси на энергию реорганизации. Далее будет показано, что количественный теоретический анализ подтвердил эти надежды.

Мы изучали катализируемый трипсином гидролиз этилового эфира N-бензоиларгинина (BAEE). По литературным данным [27—29], константа Михаэлиса для этой реакции в воде низка, так что ее скорость обычно не зависит от концентрации субстрата. Наши измерения показали, что в интервале концентраций BAEE $5 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ М это справедливо и для смеси вода — DMSO, причем скорость реакции пропорциональна концентрации фермента.

В первую очередь необходимо было исключить влияние необратимой денатурации белка. Если раствор трипсина в 70% DMSO выдержать 1 ч, а затем разбавить водой до 35%, то активность фермента при гидролизе BAEE в 1,6 раза меньше, чем у трипсина, растворенного в 35% DMSO. Активность падает всего в 1,06 раза, если исходить из 60% DMSO, и полностью сохраняется в случае 50% DMSO. Об отсутствии денатурации при содержании DMSO $\leq 50\%$ свидетельствует также независимость активности от продолжительности предварительной инкубации растворов фермента. Сравнивая данные, полученные с различными смешанными растворителями, трудно строго сопоставить шкалы pH. В нашем случае, однако, скорость реакции независимо от состава среды изменялась не более чем на 2% при изменении pH в диапазоне 7,5—9 (обычно опыты проводились при $8,2 \leq \text{pH} \leq 8,5$), так что эта проблема не возникала.

На рис. 1 показана зависимость скорости реакции от состава растворителя. Для удобства сравнения данные разных серий, проведенных с одной пробой фермента, представлены в относительных единицах. Как видно, хорошо воспроизводится зависимость с максимумом, лежащим около 30% DMSO. Максимальная скорость превышает скорость в воде на 30—35%.

Несколько большее повышение скорости реакции в той же системе, но в присутствии трис-буфера, наблюдалось группой Дузу [9]. Однако определенная ими константа скорости гидролиза в воде более чем в 2 раза ниже, чем это следует из наших и многочисленных литературных [27—29] данных. Поэтому можно предположить, что результаты Дузу и сотрудников искажены значительным количеством примесей. Финк [4] не обна-

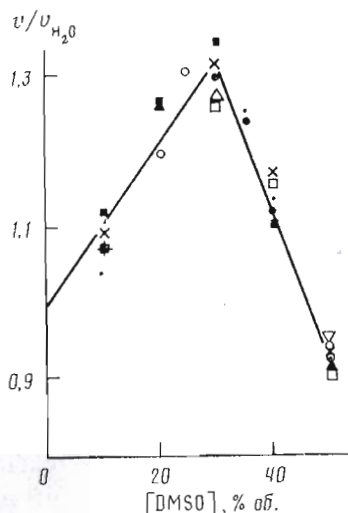


Рис. 1

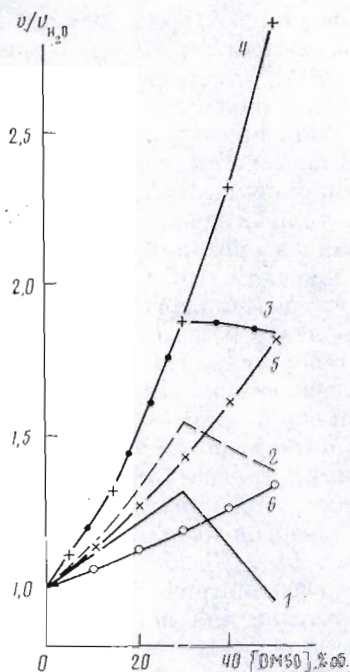


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость относительной скорости катализируемого трипсином гидролиза ВАЕЕ от состава растворителя. Данные, относящиеся к разным сериям опытов, обозначены разными значками

Рис. 2. Сравнение опытных и вычисленных данных: 1 — усредненная экспериментальная кривая (см. рис. 1); 2 — та же кривая, нормированная по активности воды; 3 — та же кривая, нормированная по объемной доле воды; 4 — 6 — теоретические зависимости при проведении граничной плоскости на расстояниях 14,3; 15 и 16 Å соответственно (подробнее см. текст)

ружил при трипсинолизе *n*-нитрофенилового эфира *N*-бензилоксикарбониллизина повышения константы скорости вплоть до 65% DMSO; эти опыты, однако, проводились при pH 4,7 и 6,5, так что сравнение результатов затруднительно.

Можно было бы предположить, что снижение скорости с ростом концентрации DMSO обусловлено обратимой денатурацией, искажающей активный центр фермента. Ранее нами было показано, что у сериновых протеиназ кинетический изотопный эффект практически целиком определяется вероятностью туннелирования протона (дейтерона) [29—31], которая весьма чувствительна к расстоянию переноса протона (экспоненциальная зависимость от квадрата расстояния) [22—25]. Поэтому любая деформация активного центра, подавляющая туннелирование и тем самым тормозящая реакцию, должна привести к заметному изменению изотопного эффекта (если вероятность туннелирования снижается в K раз, дейтериевый изотопный эффект возрастает в $K^{1/2-1}$ раз [24]). При увеличении содержания DMSO от 30 до 50% скорость гидролиза в наших опытах уменьшалась в 1,5 раза. Если бы этот эффект был обусловлен подавлением туннелирования, дейтериевый изотопный эффект возрос бы в 1,18 раза. Между тем наблюдаемые колебания изотопного эффекта нерегулярны, невелики и не соответствуют изменениям скорости реакции. Поэтому можно считать достаточно вероятным, что структура активного центра фермента в присутствии DMSO практически сохраняется неизменной. Вместе с тем вклад обратимой денатурации в снижение скорости нельзя полностью исключить, если предположить существование равновесия между нативной и неактивной формами. Поскольку скорость трипсинового гидролиза ВАЕЕ определяется дезацилизацией [27], т. е. стадией, на которой вода

является реагентом, можно было думать, что прохождение этой скорости через максимум с ростом содержания DMSO обусловлено непосредственно уменьшением содержания воды в среде. Однако рис. 2 показывает, что введение поправки на этот эффект максимума не устраняет, независимо от того, рассчитывается ли она исходя из активности воды [32] или ее объемной доли. Другие соображения о природе максимума будут изложены ниже.

При количественном анализе влияние различных факторов на кинетику реакции мы будем исходить из следующих общих формул [22—25]:

$$k = \frac{k_B T}{h} \kappa e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}, \quad (1)$$

$$\Delta G^\ddagger = W_i + \frac{(E_s + \Delta G_c - W_i + W_f)^2}{4E_s}. \quad (2)$$

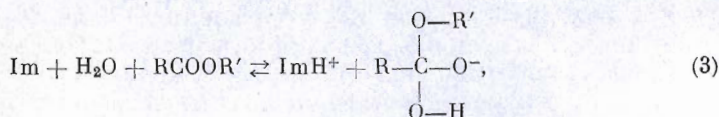
Здесь универсальные постоянные и температура обозначены как обычно, k — константа скорости псевдопервого порядка, κ — трансмиссионный коэффициент, $\Delta G^\ddagger$ — свободная энергия активации (точнее, конфигурационная свободная энергия — подробнее см. [33]), которая зависит от работ сближения исходных веществ и продуктов (W_i и W_f), конфигурационной свободной энергии элементарного акта реакции для разделенных реагентов (ΔG_c) и свободной энергии реорганизации среды (E_s).

Свободная энергия активации ($\Delta G^\ddagger$) близка, но из-за энтропийного вклада не тождественна арреннусовской энергии активации (47 кДж/моль [28, 29]); $\Delta G^\ddagger$ можно вычислить с помощью уравнения (1), исходя из экспериментального значения $k \simeq 10^2$ с⁻¹ и величины κ . По нашим данным, кинетический изотопный эффект близок к 2,7 (см. также [29]). Если отклонение κ от единицы целиком обусловлено пониженной вероятностью туннелирования, то, воспользовавшись выражением для κ , которое справедливо в приближении гармонического осциллятора, получаем отношение κ для легкого и тяжелого изотопов $\kappa_H/\kappa_D = \kappa_H^{1-1/2} = 2,7$, откуда $\kappa_H = 7 \cdot 10^{-2}$ и $\Delta G^\ddagger = 55$ кДж/моль.

Далее нам необходимо рассмотреть влияние растворителя на отдельные составляющие свободной энергии активации, поскольку величину κ мы можем достаточно обоснованно считать постоянной (постоянный изотопный кинетический эффект). Из величин, входящих в уравнение (2), от свойств растворителя должны непосредственно зависеть E_s и ΔG_c , тогда как работа сближения реагирующих групп (W) вряд ли существенно зависит от свойств не контактирующего с ними растворителя (мы увидим ниже, что свойства растворителя мало влияют и на ΔG_c). Прежде чем обсуждать влияние среды на E_s и ΔG_c и, следовательно, на $\Delta G^\ddagger$, целесообразно оценить величину всех членов уравнения 2 — это, как будет видно из дальнейшего, позволит его упростить.

При нуклеофильном присоединении аниона OH^- к $\text{C}=\text{O}$ -группе ацилфермента с образованием тетраэдрического интермедиата движение по координате сближения O и C превращается из классического в начальном состоянии в квантовое в конечном [34]. Для такого типа реакций $W_f = 0$ [35]. Оценка величины W_i , приведенная в работе [34] (~ 40 кДж/моль), была основана на данных об энергии активации щелочного гидролиза в водном растворе и на весьма заниженной оценке $\Delta G_c \simeq 0$ [36]. Более разумная оценка ΔG_c (см. ниже) приводит к существенно меньшим значениям W_i . Мы примем $W_i \simeq 20$ кДж/моль (большее значение W_i немного усилит зависимость $\Delta G^\ddagger$ от свойств среды, см. уравнение 6). Фастрез [37] оценил стандартные свободные энергии образования ряда тетраэдрических интермедиатов при щелочном гидролизе эфиров (для метилформиата $\Delta G^0 = +25$ кДж/моль). Мы выбрали в качестве опорной муравьиную кислоту, так как по своему pK (3,77) она близка к N-ациламинокислотам (у Ac-Gly-OH $pK = 3,60$ [38]). Учитывая значения pK аргинина и OH -группы серина, мы предполагаем, что в нашем случае ΔG^0 составляет $+20$ кДж/моль. Чтобы от щелочного гидролиза перейти к нуклеофильному присоедине-

нию, катализируемому имидазолом (Im), т. е. к реакции



к величине ΔG^0 необходимо прибавить $RT \cdot (pK_w - pK_{\text{ImH}^*}) = 40$ кДж/моль. Полученное значение (60 кДж/моль) равно конфигурационной свободной энергии ΔG_c , поскольку, хотя реакция 3 и проходит с уменьшением числа молекул, но для одного из реагентов слева (H_2O) принято стандартное состояние при мольной доле, равной единице (этому соответствует $pK = 14$), а для двух других слева и двух справа стандартные состояния одинаковы (1 М) [33].

При переходе от ΔG_c в водном растворе к ΔG_c в белке необходимо учесть ряд дополнительных эффектов. Во-первых, это изменение борновской энергии сольватации ионов при переносе из воды в белок, т. е. в среду с низкой диэлектрической проницаемостью ($\epsilon_p \ll \epsilon_w$). Поскольку глубина погружения зарядов в белок невелика, при этом остается заметным вклад взаимодействия зарядов с водой как диэлектриком. Кроме того, существенное значение приобретает энергия кулоновского взаимодействия зарядов (ImH^+ и $\text{C}-\text{O}^-$) с учетом водного окружения. Сумма этих вкладов может быть описана в приближении двух бесструктурных однородных диэлектриков (белок и вода), разделенных бесконечной плоской границей раздела. Более сложные модели (ср. [39]) дают практически тот же результат. Плоской границе раздела отвечает простая формула для электростатического вклада в ΔG_c , вычисленного в рамках континуальной модели:

$$\Delta G_c^{\text{el}} = \frac{e^2}{\epsilon_p} \left[\frac{1}{2a_1} + \frac{1}{2a_2} - \frac{1}{R_{12}} + \left(\frac{1}{4h_1} + \frac{1}{4h_2} - \frac{1}{\sqrt{4h_1h_2 + R_{12}^2}} \right) \frac{\epsilon_{sp} - \epsilon_{sw}}{\epsilon_{sp} + \epsilon_{sw}} \right]. \quad (4)$$

Здесь e — заряд электрона, a_1 и a_2 — радиусы ионов, h_1 и h_2 — их глубины погружения относительно границы раздела, R_{12} — расстояние между центрами зарядов, ϵ_{sp} и ϵ_{sw} — статические диэлектрические проницаемости белка и воды. В расчетах принято $a_{\text{ImH}^+} = 3,0$ Å (ср. [40]); $a_{\text{O}^-} = 3,0$ Å (учтена ближняя сфера сольватации, включающая водородные связи с ближайшими соседями [41]), $R_{12} = 6,1$ Å. Величины h_1 и h_2 определяются координатами соответствующих атомов и выбором положения граничной плоскости. Этот выбор несколько произволен [42], в нашем расчете h_1 менялось от 2,1 до 3,8 Å, а h_2 — от 3,9 до 5,6 Å (плоскость на расстоянии от 14,3 до 16 Å от центра глобулы [42]). При этом ΔG_c^{el} изменяется от +33 до +52 кДж/моль.

Второй фактор — это электрическое поле внутри глобулы белка, обусловленное дипольными группами, в основном пептидными. Ранее такое поле было рассчитано нами для α -химотрипсина [40–43]. Поскольку по своей структуре трипсин подобен химотрипсину, мы использовали результаты этих расчетов, тем более что нас интересовали лишь порядки величин.

Разность потенциалов, создаваемых диполями в центре Im H⁺ остатка His-57 и на атоме O⁻ тетраэдрического производного, зависит от выбора граничной плоскости и от величины дипольного момента пептидной группы, составляя 0,251 и 0,545 В (плоскость 14,3 Å, моменты 4 и 6 Д соответственно) и 0,123 и 0,336 В (плоскость 16 Å, 4 и 6 Д). Потенциал на O⁻ положительнее, чем на Im H⁺, т. е. эта разность потенциалов благоприятствует реакции*.

* Надо отметить, что эти величины рассчитаны в приближении квазиметалла (т. е. $\epsilon_s = \infty$), что для интересующих нас в данный момент целей вполне достаточно. Приближение квазиметалла строго выполняется в предельном случае концентрированного раствора электролита. В 0,1 М KCl должно в принципе сказываться влияние диффузной части двойного слоя с более низкой эффективной диэлектрической постоянной. Этот эффект пропорционален $(\epsilon_{sp} - \epsilon_{sw})/(\epsilon_{sp} + \epsilon_{sw})$, где ϵ_{sp} и ϵ_{sw} — статические

Кроме потенциалов, создаваемых диполями, весьма существенную роль играет потенциал, создаваемый зарядом карбоксильной группы остатка Asp-102 (от $-0,375$ до $-0,541$ В для $1m\ H^+$ и от $-0,079$ до $-0,127$ В для O^-). Этот фактор существенно облегчает разделение заряда при образовании тетраэдрического интермедиата у сериновых протеиназ [26]. Влияние диполей и заряда Asp-102 снижает свободную энергию образования тетраэдрического производного на -53 или -81 кДж/моль (плоскость $14,3$ Å, момент 4 и 6 Д) или -52 и -72 кДж/моль (плоскость 16 Å). Таким образом, сумма континуального и структурного электростатических вкладов зависит от положения границы раздела (-20 и -48 кДж/моль — плоскость $14,3$ Å; 0 и -20 кДж/моль — плоскость 16 Å). Влияние внутрибелкового поля практически компенсирует невыгодность разделения зарядов в среде с низкой ϵ (ср. [40, 41]).

Третья группа факторов — это изменение разности энергий ближнего взаимодействия групп в начальном ($1m + H_2O + C=O$) и конечном ($1m\ H^+ + HO-\overset{|}{C}-O^-$) состояниях при переходе от воды к белку. Число

водородных связей с соседями у обеих реагирующих групп в ходе реакции сохраняется и одинаково в белке и водном растворе, однако их прочность различна. Молекулы H_2O , образующие водородные связи, могут легко занимать оптимальные положения, тогда как в белке атомы фиксированы. При превращении $C=O$ в CO^- , когда $C-O$ -связь удлинится на $0,2$ Å, атом кислорода должен сблизиться с NH -группами остатков Gly-193 и Ser-195, образующих с ним водородные связи. Суммарный выигрыш энергии при упрочнении этих связей можно оценить на основании приводимых в работе [44] квантово-химических расчетов величиной ~ 5 кДж/моль. Такого же порядка дополнительный выигрыш в энергии взаимодействия двух диполей $N-H$ с зарядом O^- .

Суммируя все вклады, получим для белка четыре варианта оценки ΔG_c : 30 и 2 кДж/моль (плоскость $14,3$ Å), 50 и 30 кДж/моль (плоскость 16 Å). Хотя эти значения носят ориентировочный характер, они представляются разумными, поскольку не превосходят приведенной выше оценки $\Delta G^\ddagger$ (по физическому смыслу $\Delta G^\ddagger \geq \Delta G_c$).

Рассмотрим теперь величину энергии реорганизации. Как было показано ранее [39, 45], для глобулы достаточно большого размера величина E_s практически такая же, как в модели двух полубесконечных диэлектриков. Для последнего случая, однако, формула приобретает особенно простой вид [39]:

$$E_s = e^2 \left(\frac{1}{\epsilon_{op}} - \frac{1}{\epsilon_{sp}} \right) \left(\frac{1}{2a_1} + \frac{1}{2a_2} - \frac{1}{R_{12}} \right) + e^2 \left(\frac{1}{2h_1} + \frac{1}{2h_2} - \frac{2}{\sqrt{4h_1h_2 + R_{12}^2}} \right) \times \\ \times \left[\left(\frac{1}{\epsilon_{op}} - \frac{1}{\epsilon_{sp}} \right) \frac{\epsilon_{sp}^2 - \epsilon_{sw}^2 - 2\epsilon_{sp}\epsilon_{sw}}{2(\epsilon_{sp} + \epsilon_{sw})^2} + \left(\frac{1}{\epsilon_{ow}} - \frac{1}{\epsilon_{sw}} \right) \left(\frac{\epsilon_{sw}}{\epsilon_{sw} + \epsilon_{sp}} \right)^2 \right]. \quad (5)$$

Здесь ϵ_{op} , ϵ_{sp} , ϵ_{ow} и ϵ_{sw} соответственно оптическая (o) и статическая (s) диэлектрические проницаемости белка (p) и водной фазы (w). Расчет по этой формуле дает величину E_s в водном растворе от 110 кДж/моль (ближняя граничная плоскость) до 59 кДж/моль (дальняя плоскость). Принимая полученные выше оценки E_s , ΔG_c и W_1 , вычисляем по уравнению 2 значения $\Delta G^\ddagger$ $52,8$ и $39,2$ кДж/моль (плоскость $14,3$ Å) и $53,6$ и $40,2$ кДж/моль (плоскость 16 Å). Как видно, конечный результат практически не зависит от выбора граничной плоскости, но более чувствителен (хотя и не чрезмерно) к принятой величине дипольного момента пептидной группы. Эти значения получены исходя из приближенных оценок, но по порядку величины они правильны, поскольку разумно согласуются с экспериментальной

диэлектрические постоянные белка и водной фазы. Этот фактор близок к $0,9$ и в изучаемых нами смесях варьирует только на единицу во втором знаке. Учитывая, что суммарный эффект экранировки внешней средой поля внутриглобулярных диполей оценивается величинами от единиц до нескольких десятков милливольт, его изменениями при переходе к смешанным растворителям можно пренебречь.

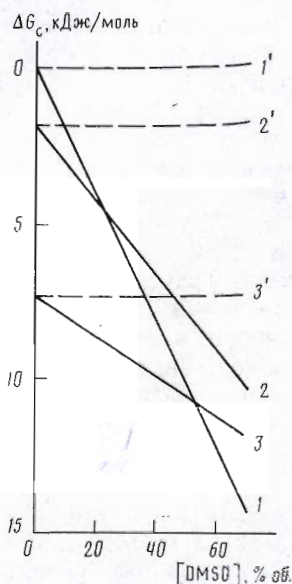


Рис. 3. Изменение E_s (1—3) и ΔG_c (1'—3') по сравнению со значениями для водных растворов. Начало координат для каждой пары кривых произвольно сдвинуто друг относительно друга. Парные кривые соответствуют расстоянию до граничной плоскости 14,3; 15, 16 Å соответственно (подробнее см. текст)

оценкой $\Delta G^\ddagger = 55$ кДж/моль. Это позволяет считать правильными по порядку величины отдельные компоненты уравнения 2, найденные нами при расчете влияния растворителя на кинетику реакции.

На рис. 3 показано, как состав смеси H_2O — DMSO сказывается на величине E_s и ΔG_c (значения ϵ_s см. [46], ϵ_0 см. [47]). Хотя сами значения ΔG_s и E_s довольно приближены, изменение с составом растворителя, описываемое последними членами уравнений 4 и 5, при заданном значении только одного параметра (положения плоскости раздела) рассчитывается достаточно точно. Как видно из рис. 3, изменение ΔG_c с составом раствора чрезвычайно мало: при переходе от воды к 50%-ной смеси оно не превышает 0,1 кДж/моль. Таким образом, в выбранной нами системе весь эффект действительно определяется практически одним фактором — изменением энергии реорганизации.

Поскольку изменения E_s (от ~ 3 до ~ 10 кДж/моль) невелики по сравнению с E_s ($\Delta E_s \ll E_s$) и вместе с тем малы изменения ΔG_c , можно существенно упростить уравнения. Вычтем друг из друга выражения 2 для разных составов растворителя:

$$\Delta G_1^\ddagger - \Delta G_2^\ddagger = \frac{E_{s(1)} - E_{s(2)}}{4} \left[1 - \left(\frac{\Delta G_c - W_i}{E_s} \right)^2 \right] - \frac{\Delta G_{c(1)} - \Delta G_{c(2)}}{2}. \quad (6)$$

Внутри квадратных скобок произведены упрощения, основанные на допущениях $\Delta G_{c(1)} \simeq \Delta G_{c(2)}$ и $E_{s(1)} \simeq E_{s(2)}$. Используя полученные выше оценки, находим, что поправочный коэффициент при ΔE_s составляет 0,992—0,974 (плоскость 14,3 Å) и 0,741—0,971 (плоскость 16 Å). С этими поправками, используя данные, приведенные на рис. 3, и уравнения 6 и 1, мы вычислили константы скорости при различном составе растворителя. Как видно из рис. 2, для плоскостей 14,3 и 15 Å расчетные значения достаточно близки к экспериментальным.

Из результатов расчета вытекает, что, как и следовало ожидать, чем ближе к поверхности глобулы трипсина расположены заряды, образующиеся в активном центре, тем сильнее влияние растворителя. Не исключено, что с другими ферментами удастся наблюдать большие эффекты.

Несмотря на расхождения теоретических оценок, связанные прежде всего с несовершенством модели (в частности, с трудностью учета свойств тонкого слоя у поверхности белка), и затруднения с введением поправок на изменившуюся концентрацию воды, можно констатировать, что расчет правильно предсказал порядок ускорения реакции. Вместе с тем не следует переоценивать степень его согласия с экспериментом. Экспериментальные данные были исправлены на изменение концентрации воды (являющейся не только средой, но и реагентом) в предположении, что нет

специфического связывания DMSO в районе активного центра. Если же это не так, то влияние растворителя на константу скорости сильнее, чем это показано на рис. 2.

Другой эффект подобного рода может стать причиной появления максимума на кривых «скорость — состав». Расчет энергии реорганизации основан на континуальной модели среды. Предполагается, что, меняя состав смеси, мы изменяем только диэлектрические свойства среды, но не ближние взаимодействия реагентов. Вполне вероятно, что при относительно небольшом содержании DMSO (например, до 30% объемных) молекула воды, служащая нуклеофильным реагентом в активном центре, связана водородной связью, как правило, с другой молекулой воды, и реорганизация ближней координационной сферы реагента остается практически постоянной. При большем содержании DMSO эта молекула воды скорее связана с DMSO; в результате этого изменяется характер перестройки ближней сферы (она более затруднена, так как водородная связь воды с DMSO прочнее), что выражается в некотором повышении энергии реорганизации, т. е. торможении реакции. Формально этот эффект можно рассматривать как некий аналог неконкурентного ингибирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали кристаллический трипсин (Spofa, ЧСФР), подвергнутый обессоливанию на колонке с сефадексом G-25 и последующей лиофилизации, BAEE (Reanal, Венгрия), $^2\text{H}_2\text{O}$ (99,8%) перегнанная, отечественного производства, KOH, ч. д. а. (Chemapol, ЧСФР), KCl, ос. ч., прокаленный (Союзреактив); DMSO, х. ч. (Союзреактив) очищали вымораживанием и обработкой свежeproкаленной CaO с последующей декантацией и перегонкой при пониженном давлении. Перед использованием DMSO 2—3 раза вымораживали.

Исходный раствор трипсина (2 мг/мл) готовили в день эксперимента в 10^{-3} M HCl или ^2HCl (раствор 10^{-3} M ^2HCl приготавливали, разбавляя 6 M HCl $^2\text{H}_2\text{O}$).

Рабочие растворы, содержащие $(5-15) \cdot 10^{-7}$ M трипсин и 0,1 M KCl, готовили следующим образом: сначала, избегая перегрева, смешивали воду и DMSO. Затем вводили субстрат в виде $5 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ M водного раствора и перед вводом трипсина термостатировали в токе азота при $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$. Далее вводили 0,1 мл раствора фермента. При определении концентрации DMSO учитывали объем добавок субстрата, фермента и титранта (KOH/KO ^2H).

Кинетические измерения проводили при pH 8,2—8,5 с помощью pH-стата (pH-метр 28, титратор 11, Radiometer, Дания). Реальную концентрацию субстрата оценивали по уровню полного гидролиза. Каталитическая константа скорости при активности трипсина $\sim 80\%$ равнялась 24 с^{-1} , что соответствует литературным данным [29]. В разных сериях активность трипсина различалась в пределах 5%, поэтому каждая серия опытов проводилась с одним исходным раствором трипсина, причем скорость гидролиза в растворе данного состава сопоставлялась со скоростью в «стандартном» водном растворе.

Ошибка, вызванная присутствием некоторого количества H_2O , вносимого с реактивами в $^2\text{H}_2\text{O}$, не превышала 1% [30].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clement G. E., Bender M. L. // Biochemistry. 1963. V. 2. № 4. P. 836—843.
2. Mares-Guia M., Figueiredo A. F. S. // Biochemistry. 1972. V. 11. № 11. P. 2091—2098.
3. Fink A. L. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 9. P. 1736—1742.
4. Fink A. L. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 16. P. 5027—5032.
5. Maurel P. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 5. P. 1677—1683.
6. Rammler D. // Dimethyl sulfoxide. V. 1. / Eds Jacob S., Rosenbaum E. E., Wood D. C. N. Y.: Marcel Dekker, 1971. P. 97.
7. Inagami T., Sturtevant J. M. // Biochim. et biophys. acta. 1960. V. 38. № 1. P. 64—79.

8. Kallen-Trummer V., Hofman W., Rottenberg M. // Biochemistry. 1970. V. 9. № 18. P. 9580—9584.
9. Maurel P., Hui Bon Hoa G., Douzou P. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 4. P. 1376—1382.
10. Mozhaev V. V., Khmelnitsky Yu. L., Belova A. B., Sergeeva M. V., Levashov A. V., Martinek K. // Chemical physics of enzyme catalysis. Abstracts of conference. Tallin 1987. P. 113.
11. Родионова М. В., Белова А. Б., Можжев В. В., Березин И. В. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 1. С. 69—72.
12. Barnard M. L., Laidler K. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V. 74. № 12. P. 6099—6101.
13. Laidler K. J. The chemical kinetics of enzyme action. N. Y.: Oxford Press, 1958. P. 205—209.
14. Laidler K. J., Ethier M. L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1953. V. 44. № 2. P. 338—345.
15. Gutfreund H., Hammond B. S. // Biochem. J. 1959. V. 73. № 3. P. 526—530.
16. Castañeda-Agullo M., del Castillo L. M. // J. Gen. Physiol. 1959. V. 42. № 7. P. 617—623.
17. del Castillo L. M., Bustamante Y., Castañeda-Agullo M. // Biochim. et biophys. acta. 1966. V. 128. № 3. P. 578—581.
18. Амиц Э. Влияние растворителя на скорость и механизм химических реакций. М.: Мир, 1968. С. 49—56.
19. Sturtevant J. M. // Discuss. Faraday Soc. 1955. V. 20. P. 254.
20. Lawrence D. J. R. // Discuss. Faraday Soc. 1955. V. 20. P. 255.
21. Bellemare F., Fragata M. // Biophys. Chem. 1982. V. 15. № 3. P. 254.
22. Дозонадзе Р. Р., Кузнецов А. М. // Итоги науки. Физическая химия. Кинетика. Т. 2. М.: ВИНТИ, 1973.
23. Ulstrup J. Charge transfer processes in condensed media. Lecture notes in chemistry. Berlin: Springer-Verlag, 1979.
24. Кришталик Л. И. Электродные реакции. Механизм элементарного акта. М.: Наука, 1979.
25. Krishtalik L. I. Charge transfer reactions in electrochemical and chemical processes. N. Y.: Plenum Press, 1986.
26. Кришталик Л. И. // Химическая физика. 1987. Т. 6. № 6. С. 836—845.
27. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука. 1983. С. 211—237.
28. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Ларионова Н. И. // Биохимия. 1970. Т. 35. № 5. С. 983—988.
29. Хоштария Д. Э. // Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1673—1677.
30. Хоштария Д. Э., Тополев В. В., Кришталик Л. И. // Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 10. С. 1341—1351.
31. Хоштария Д. Э., Тополев В. В., Кришталик Л. И., Рейзер И. Л., Торчин В. П. // Биоорганич. химия. 1979. Т. 5. № 8. С. 1243—1247.
32. Kenttamaa J., Lindberg J. J. // Suomen kem. 1960. B. 33. № 1. P. 98—100.
33. Кришталик Л. И., Кузнецов А. М. // Электрохимия. 1986. Т. 22. № 2. С. 246—248.
34. Хоштария Д. Э., Кришталик Л. И. // Изв. АН СССР. Сер. «Химия». 1984. № 8. С. 1727—1734.
35. Кузнецов А. М. // Электрохимия. 1969. Т. 5. № 4. С. 479—482.
36. Moffat A., Hunt H. // J. Amer. Chem. Soc. 1959. V. 81. № 9. P. 2082—2086.
37. Fastrez J. // J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. № 21. P. 7004—7013.
38. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. М.: Мир, 1983. С. 33.
39. Кришталик Л. И., Харкац Ю. И. // Биофизика. 1984. Т. 29. № 1. С. 19—22.
40. Кришталик Л. И., Тополев В. В. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 4. С. 892—900.
41. Кришталик Л. И., Тополев В. В. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 3. С. 712—718.
42. Тополев В. В., Кришталик Л. И. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. № 6. С. 1177—1184.
43. Кришталик Л. И., Тополев В. В. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. № 5. С. 1034—1041.
44. Булычев В. П., Соколов Н. Д. // Водородная связь / Ред. Соколов Н. Д. М.: Наука, 1981. С. 10—29.
45. Кришталик Л. И. // Молекуляр. биология. 1979. Т. 13. № 3. С. 577—581.
46. Lindberg J. J., Kenttamaa J. // Suomen kem. 1960. B. 33. № 1. P. 104—107.
47. Label R. G., Goring D. A. I. // J. Chem. Engin. Data. 1962. V. 7. № 1. P. 100—101.

Поступила в редакцию
29.III.1990

После доработки
2.VII.1990

**THE INFLUENCE OF THE SOLVENT DIELECTRIC PROPERTIES
ON THE TRYPTIC HYDROLYSIS**

A. N. Frumkin Institute of Electrochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The influence of the solvent dielectric properties on the rate constants of enzymatic reactions is discussed. Two principal effects, changes in the reaction energy and in the reorganization energy, depend differently upon dielectric parameters of the medium. In water-dimethylsulfoxide mixture, the static dielectric constant depends slightly on the organic solvent up to its 50% (by volume) concentration. Therefore, in these mixtures, the main effect is the change of the reorganization energy. The kinetics of trypsin-catalysed hydrolysis of N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (including the pH dependence and kinetic isotope effect) in these mixtures has been studied. The maximum acceleration, up to 35%, takes place at 30% concentration of dimethylsulfoxide. The increase in the reaction rate agrees with the effect theoretically calculated.