

Рис. 1

Рис. 1. Зависимость оптического поглощения смеси ЛК/буфер от концентрации ЛК без ПАВ (1) и в присутствии 0,02% луброла (2) (0,1 М натрий-фосфатный буферный раствор, рН 6,3; 25° С)

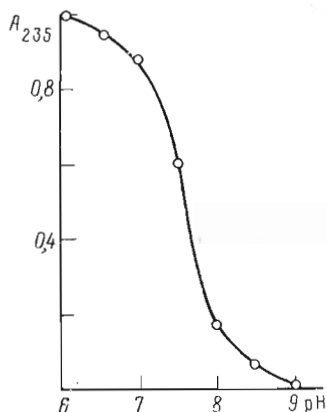


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость оптического поглощения смеси ЛК/вода от рН водной фазы. Концентрация ЛК 10^{-4} М; температура 25° С. Применяли 0,1 М натрий-фосфатный буферный раствор (рН 6—8) и 0,1 М натрий-боратный буферный раствор (рН 8—9)

билыны и стремятся максимально уменьшить поверхность контакта с водой. Стабилизировать их можно путем введения поверхностно-активных веществ или защелачиванием среды до рН 9 и выше, приводящим к ионизации карбоксильных групп и образованию мыл. В случае полностью ионизированной ЛК ККМ равна $2 \cdot 10^{-4}$ М, линоленовой — 10^{-3} М, а для арахидоновой кислоты точной ККМ определить не удалось [6].

Оптимальные значения рН действия различных липоксигеназ варьируют от 6,4 до 9,5 [2, 7, 8]. В таком широком диапазоне рН неизбежны изменения степени ионизации и, следовательно, агрегатного состояния ПНЖК от эмульсии до истинного раствора. Другими словами, можно предположить, что липоксигеназы, имеющие крайние значения рН-оптимума действия, приспособлены к различным агрегатным состояниям и степеням ионизации субстрата.

Предметом данной работы было изучение физико-химических условий протекания реакции окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой из клубней картофеля.

В качестве объектов исследования были выбраны 5-липоксигеназа из клубней картофеля и 15-липоксигеназа из соевых бобов. По литературным данным, рН-оптимум первой составляет 6,4, а второй — 9—10 [2, 7, 8]. Если при работе с 15-липоксигеназой не возникает трудностей, связанных с растворимостью субстрата в воде в диапазоне его концентраций от 10^{-5} до 10^{-4} М, то при нейтральных рН ЛК в воде практически не растворяется (рис. 1, 2). На основании этих данных может быть оценен верхний предел значения ККМ для ЛК при рН 6,3, равный $2 \cdot 10^{-6}$ М.

Рост мутности смеси буферного раствора и ЛК при увеличении концентрации последней или закислении среды — следствие образования крупных агрегатов ЛК. Контроль за процессом окисления ЛК по росту оптического поглощения смеси в результате накопления соединений с сопряженными двойными связями ($\epsilon_{235} 23\,000 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) затруднен из-за влияния продуктов ферментативной реакции на мутность начальной суспензии за счет возможной солубилизации ПНЖК.

Влияние подобных явлений можно уменьшить, добавляя в реакционную смесь с нейтральными или кислыми значениями рН неионное ПАВ — луброл РХ. Последний эффективно солубилизировал ЛК во всем исполь-

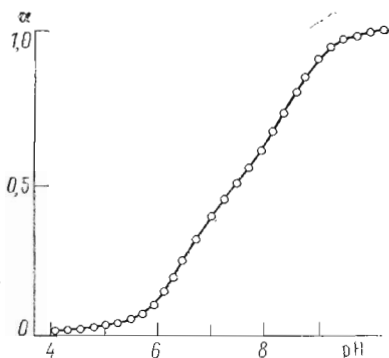


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость степени ионизации линолевой кислоты (α) от pH. Точки — экспериментальные значения; кривая рассчитана по уравнению (2). Результаты расчетов приведены в таблице

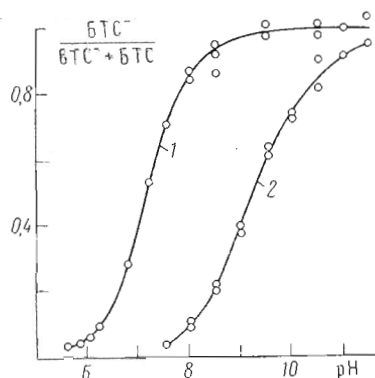


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость степени ионизации БТС от pH: 1 — водный раствор; 2 — мицеллярный раствор ПАВ

зуюмом диапазоне ее концентраций (рис. 1) при любых pH. К несомненным преимуществам данного детергента относится его слабое поглощение в УФ-области спектра. Количество луброла в смеси было постоянным и равнялось 0,02% (вес/объем). В этих условиях мутность реакционной смеси снижалась до минимума, а ее оптическое поглощение в области 235 нм лишь незначительно превышало поглощение буферного раствора с детергентом. Спектры поглощения реакционной смеси свидетельствуют об отсутствии заметного увеличения числа светорассеивающих частиц в ходе ферментативной реакции. Кинетические кривые, регистрируемые спектрально, при этом максимально соответствовали ее протеканию.

Значение ККМ луброла равно 0,1 мМ [9]. Поскольку в наших опытах концентрация детергента 0,34 мМ, можно утверждать, что значительная часть его (не менее 0,24 мМ) находится в виде мицелл. Число агрегации луброла в отсутствие иных амфифилов составляет 110 [9]. С учетом его молекулярной массы (582) средняя молекулярная масса мицеллы без гидратационной воды составляет 64 кДа, а расчетная концентрация мицелл — $2,2 \cdot 10^{-6}$ М. Солюбилизация ЛК лубролом заключается в образовании смешанных мицелл ЛК/ПАВ. Аналогичные системы достаточно хорошо охарактеризованы [10]. Локализация ЛК в мицелле (ядро, полиоксиэтиленовый слой или поверхность раздела) зависит от степени ионизации карбоксильной группы и в общем случае неизвестна. Представляло интерес охарактеризовать кислотно-основные свойства ЛК в подобных системах.

Натриевую соль ЛК, солюбилизованную в солевом растворе с помощью луброла, титровали соляной кислотой в инертной атмосфере аргона (рис. 3), непрерывно регистрируя pH реакционной смеси. Кривые титрования обрабатывали на ЭВМ, рассчитывая общее содержание ЛК в системе и ее pK_a . При расчетах применяли два подхода: 1) аппроксимацию экспериментальных данных кубическими сплайнами с последующим численным дифференцированием полученной кривой и определением координат точек перегиба путем нахождения максимумов на графике зависимости ($d\alpha/dpH$) и точек пересечения с осями на графике зависимости ($d^2\alpha/dpH^2$) (по определению, pK_a слабых кислот численно равно pH, соответствующему степени ионизации кислоты, равной 0,5; при этом pH буферная емкость смеси $d\alpha/dpH$ максимальна, а вторая производная равна нулю); 2) аппроксимацию экспериментальных данных методом нелинейной регрессии в соответствии с уравнением

$$\alpha = \sum_i a_i \cdot 10^{pH - pK_{ai}} / (1 + 10^{pH - pK_{ai}}), \quad (2)$$

**Определение протолитических свойств линолевой кислоты
в составе смешанных мицелл луброла РХ по уравнению (2)
и методом численного дифференцирования кривой
титрования**

Метод определения	Переменная	Значение переменной	Стандартная ошибка
Уравнение 2	pK_{a1}	3,802	1,181
	pK_{a2}	6,607	$3,331 \cdot 10^{-2}$
	pK_{a3}	8,449	$3,242 \cdot 10^{-2}$
	a_1	$1,265 \cdot 10^{-2}$	$5,413 \cdot 10^{-3}$
	a_2	0,485	$1,087 \cdot 10^{-2}$
	a_3	0,512	$1,083 \cdot 10^{-2}$
Численное дифференцирование	pK_{a1}	6,506	
	pK_{a2}	8,482	
	a_1	0,500	
	a_2	0,500	

где α — степень ионизации кислоты; i — число форм кислоты, различающихся значениями pK_{ai} ; a_i — мольная доля i -го компонента; a_i и α могут принимать значения от 0 до 1.

Максимальная ионизация ЛК наблюдается при $pH > 10$. При $pH < 4$ линолевая кислота практически не ионизирована; при $pH 6,3$ (стандартное значение для определения активности 5-липоксигеназы из клубней картофеля) степень ионизации не превышает 15%.

Метод сплайн-аппроксимации позволяет определить из кривой титрования три точки перегиба, две из которых соответствуют значениям pK_a , равным 6,51 и 8,48, а третья соответствует значению 7,6, равному сумме двух pK_a . Мольные доли двух титрующихся компонентов оказались равными 0,5.

Результаты расчетов по уравнению (2) представлены в таблице. Обнаружено три титрующихся компонента. Содержание одного из них с наиболее низким значением pK_a не превышает $1,265 \pm 0,005\%$ от общего содержания и находится в пределах ошибки эксперимента. Хорошее согласие между результатами, полученными двумя независимыми математическими методами, а также малые значения стандартных ошибок при определении мольных долей и кислотностей тех или иных компонентов реакционной смеси делают обоснованным вывод о присутствии в системе двух основных форм ЛК с приблизительно одинаковыми мольными долями и не позволяют с уверенностью судить о присутствии в сколь угодно заметных количествах иных форм субстрата.

Оба значения pK_a отличаются от pK_a водорастворимых алифатических карбоновых кислот, равных 4,5—5,0 [11]. Аналогичное смещение pK_a линолевой кислоты, встроенной в мембрану из яичного фосфатидилхолина, было обнаружено независимым методом по изменению флуоресценции 1-анилинонафталин-8-сульфоната [12]. В цитируемой работе pK_a составил величину, равную 6,0—6,5 при мольном отношении ЛК/липид = 1/10, т. е. знак и абсолютная величина изменения совпали со значениями, определенными для нашей системы. Чем вызвано изменение протолитических свойств ЛК после ее встраивания в мембраноподобные структуры?

Это может быть следствием: а) скачка потенциала ϕ_s на поверхности мицеллы, образованной ПАВ, в том числе неионогенным; б) характерного для полиионов (к которым можно отнести ионогенные вещества в мицеллярной форме) влияния на ионизацию электростатического потенциального поля (фиксированных) ионов; в) димеризации ЖК в неполярных средах, например в ядре мицеллы. Рассмотрим эти случаи более подробно.

Скачок потенциала между поверхностью мембраны, мицеллы или мономолекулярного слоя и объемом раствора оказывает существенное воздействие на протекание химических реакций в приграничном слое [13].

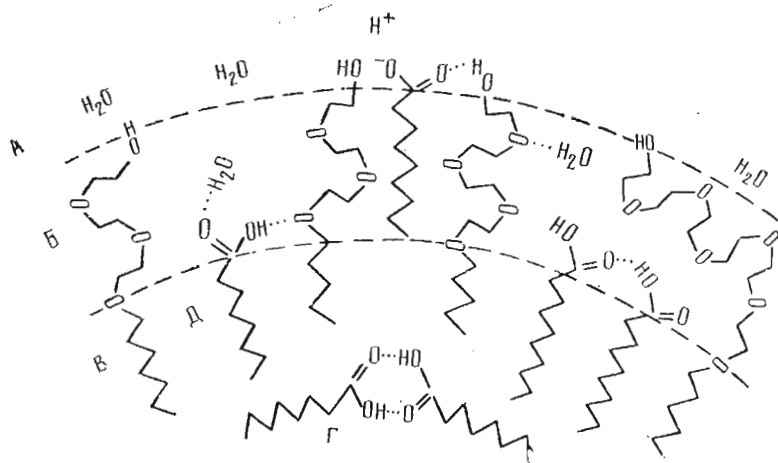


Рис. 5. Гипотетическая структура смешанной мицеллы ЛК/ПАВ: А — водная фаза, В — слой полиоксиэтиленовых остатков, В — углеводородное ядро, Г — димеры ЛК, Д — мономеры ЛК

Величина ϕ_s для различных ПАВ колеблется в пределах от нескольких десятков до 200 мВ и выше, а знак определяется природой детергента — катионные ПАВ придают положительный, а анионные и неионные ПАВ (например, спирты и эфиры) — отрицательный заряд [13—15], что вызывает перераспределение растворенных ионов в пограничном слое. Соответственно заряду мембраны меняется значение локального примембранного рН смеси. Таким образом, кривые титрования абсорбированных мицеллой ПНЖК и pK_a последних должны быть сдвинуты в более щелочную область пропорционально эффекту закисления пограничного слоя раствора. По-видимому, первое значение pK_a , равное $6,607 \pm 0,033$, может быть отнесено на счет описанного выше эффекта.

Для проверки данной гипотезы в качестве модельной реакции была изучена в водных растворах и мицеллярной системе ионизация весьма гидрофобного кислотно-основного индикатора БТС.

Ионизация индикатора в системе с лубролом протекает иначе, чем в бездетергентной среде (рис. 4), причем сдвиг кривой титрования в щелочную область достигает 2 единиц рН. Влиянием индикатора на свойства мицелл и изменением приповерхностного рН, вызванного сорбцией БТС на мицелле, можно пренебречь, поскольку используемая концентрация БТС ($1,6 \cdot 10^{-6}$ М) меньше рассчитанной формально концентрации мицелл. Среднестатистически на одну мицеллу ПАВ приходится менее одной молекулы БТС, а весовое содержание индикатора в мицелле меньше 1%. В силу того что БТС не экстрагируется из водных растворов соединениями типа гептана и диэтилового эфира, можно предположить, что индикатор локализован не в гидрофобном ядре мицеллы, а в более полярной области полиоксиэтиленовых остатков и (или) на границе раздела фаз вода/мицелла. Величина и знак наблюдаемого эффекта оказались одинаковыми для БТС и ЛК. Таким образом, изменение степени ионизации БТС и ЛК отражает особенности кислотно-основных свойств микроокружения исследуемых веществ в приповерхностном слое мицеллы, а именно закисление последнего.

Адсорбция ионогенных амфифильных веществ на границе раздела фаз вода/твердое тело, вода/жидкость и вода/газ приводит к существенному изменению поверхностного электростатического потенциала мицеллы, мембраны или пленки и, следовательно, к сдвигу рН в прилегающем водном слое [13—15]. Это неизбежно происходит и в случае мицелл ПАВ, абсорбирующих жирные кислоты. Очевидно, что величина ϕ_s , а также разница в рН между поверхностным слоем и объемом раствора будут тем больше, чем выше степень заполнения поверхности мицеллы карбоксильными группами.

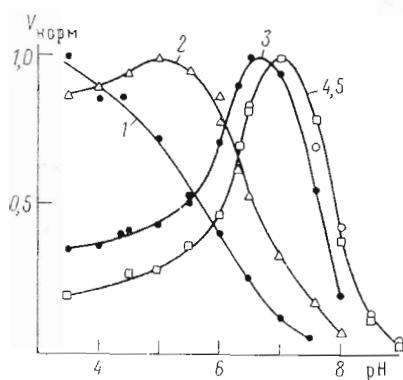


Рис. 6. Зависимость активности 5-липоксигеназы от pH среды для разных концентраций ЛК в присутствии луброла. $V_{\text{норм}}$ — нормированное значение скорости реакции, равное отношению скорости реакции при данном pH к скорости реакции при оптимальном pH. Концентрации ЛК (мМ): 1 — 0,025; 2 — 0,05; 3 — 0,1; 4 — 0,2; 5 — 0,3

Второе значение pK_a (8,48) мы относим к титрованию димеров ЛК (открытых или циклических), локализованных внутри гидрофобного углеводородного ядра мицеллы. Столь высокое значение pK_a связано с тем, что димеризация жирных кислот в неполярных средах энергетически выгодна ($\Delta G_d = -6 \div -18$ ккал/моль димера [4]). Следовательно, для ионизации димера ЖК необходимо совершить дополнительную работу по разрыву одной или двух водородных связей.

Особый интерес представляет вопрос о соотношении растворимой и мицеллярной форм линолевой кислоты в исследуемом растворе. Из литературных данных известно, что в щелочной среде ККМ линолеата равна 150—200 мкМ [16]. Как следует из наших данных, в среде с pH 6,3 по результатам турбидиметрии ККМ меньше 2 мкМ, а содержание наиболее кислого компонента с pK_a 3,80 (которое наиболее соответствует кислотности водорастворимых ЖК) слишком мало для его достоверного определения методом потенциометрического титрования (таблица). При добавлении к суспензии ЛК луброла РХ в мицеллообразующей концентрации содержание водорастворимой формы линолевой кислоты снизится за счет абсорбции ее из раствора мицеллами детергента. В пользу последнего утверждения говорит весьма высокая липофильность молекул ЛК (рассчитанная константа гидрофобности Ганша для ЛК равна 5,7, что соответствует константе распределения ЛК между неполярным растворителем и водой $P \cdot 10^5$). Другими словами, доля водорастворимой формы ЛК при нейтральных и кислых значениях pH в системе, содержащей мицеллы ПАВ, весьма мала по сравнению с мембраносвязанной.

Таким образом, ЛК, встроенная в мембрану или мицеллу ПАВ, локализуется частично на границе раздела фаз липид (или ПАВ)/вода, а частично внутри гидрофобного ядра (рис. 5).

Описанные эффекты должны влиять на протекание ферментативного окисления ЛК, встроенной в мицеллы луброла РХ. Полученные экспериментально зависимости активности от pH для разных концентраций ЛК представлены на рис. 6. Значение pH-оптимума действия фермента, таким образом, оказывается величиной эффективной, увеличивающейся с возрастанием начальной концентрации субстрата, что согласуется с предположением о закислении приповерхностного слоя мицеллы. Вероятно, именно поверхностная плотность кислотных групп и связанные с ней изменения ψ_s и pH определяют аллостерическую активацию 5-липоксигеназы субстратом [17] и некоторыми алифатическими кислотами и их солями [18, 19].

При изучении фермента из соевых бобов ферментативные реакции проводят в щелочной среде с pH 9—10. Используемые концентрации ЛК обычно не превышают 10^{-4} М, что ниже значения ККМ. Если учесть, что указанная концентрация ЛК достаточна для почти полного насыщения фермента субстратом (известно, что K_m 15-липоксигеназы по линолевой кислоте лежит в пределах $10^{-5} - 2 \cdot 10^{-5}$ М [20—23]), то представляется обоснованным вывод об эволюционной приспособленности данного типа липоксигеназы к окислению водорастворимых форм субстрата и соответствующей организации активного центра фермента.

Таким образом, при двухфазном окислении ЛК под действием 5-липоксигеназы наиболее существенными факторами являются агрегатное и ионизационное состояние субстрата, наличие скачка потенциала φ_s на границе раздела вода/мицелла и, как следствие, сдвиг рН в прилегающем к мицелле слое жидкости. Авторы надеются, что описанные особенности и их возможная интерпретация окажутся полезными при дальнейшем изучении реакций липоксигеназного окисления ПНЖК.

Экспериментальная часть

Применяли следующие реактивы: 15-липоксигеназу из соевых бобов (Fluka, Швейцария); 5-липоксигеназу из клубней картофеля, выделенную по модифицированному нами методу Шимизу [7, 24]; линолевую кислоту и луброл РХ (Sigma, США); неорганические кислоты, щелочи и соли марки х.ч. или ос.ч.; бромтимоловый синий, ч.д.а.

Регистрацию спектров реакционной смеси проводили на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss, Jena, ГДР). Скорость ферментативного окисления линолевой кислоты определяли на спектрофотометрах Specord M40 или Ultrospec-11 (ЛКВ, Швеция) при $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ по возрастанию оптической плотности реакционной смеси в области 235 нм. Объем смеси составлял 2,5 мл [22, 23].

Титрование ЛК (0,1 ммоль, 27 мг) проводили в 50 мл 0,1 М раствора NaCl и 0,02% (вес.) раствора луброла РХ на автоматическом титраторе ОР-930/1 (Radelkis, ВНР), подключенном к универсальному иономеру ЭВ-74 (СССР). Температуру смеси поддерживали в пределах $25,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Титрование вели в атмосфере аргона. Результирующий рН смеси регистрировали с помощью компенсационного самописца TZ 4620 (Laboratorni pristroje, Praha, ЧСФР). Результаты титрования обрабатывали на ЭВМ, рассчитывая регрессионные кривые симплексным методом Нелдера — Мида. Контрольное титрование проводили в аналогичных условиях в отсутствие ЛК.

Зависимость степени ионизации БТС от рН исследуемой смеси определяли при концентрации индикатора $1,6 \cdot 10^{-6}$ М, луброла — 0,34 мМ (0,02%) в 0,1 М буферных растворах следующих составов: N-морфолиноэтансульфокислота — NaOH (рН 5,6 — 6,2); H_3PO_4 — NaOH (рН 6,5 — 8,0); трис-HCl (рН 8,0 — 9,0); борная кислота — NaOH (рН 9,0 — 10,0); глицин — NaOH (рН 10,5 — 11). Температура смеси равнялась $25,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Измерения проводили в области 620 нм, соответствующей максимуму поглощения ионизированного индикатора. Положение максимума 620 нм не изменялось при добавлении к смеси луброла в мицеллообразующих концентрациях.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М.: Мир, 1986. С. 166—230.
2. Holman R. T., Bergström F. // The Enzymes. V. 2 / Ed. Sumner B. 1954. Part. 1. P. 559—580.
3. Stereochemistry of Organic and Bioorganic Transformation // Eds Bartmann W., Sharpless K. B. Weinheim — New York: VCH, 1987. P. 1—12.
4. Миттел Дж., Мак-Клеллан О. Водородная связь. М.: Мир, 1964. 462 с.
5. Общая органическая химия. Т. 4 / Ред. Бартон Д., Оллис У. Д. М.: Химия, 1983. С. 42—43.
6. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии / Ред. Миттел К. М.: Мир, 1980. С. 327—353.
7. Shimizu T., Rüdmark O., Samuelsson B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 3. P. 689—693.
8. Sekiya J., Aoshima H., Kajiwara T., Togo T., Hatanaka A. // Agric. Biol. Chem. 1977. V. 41. № 5. P. 827—832.
9. Hjelmeland L. M., Chrambach A. // Meth. Enzymol. 1984. V. 104. P. 305.
10. Шенфельд Н. Поверхностно-активные вещества на основе оксида этилена. М.: Химия, 1982. С. 77—159.
11. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Госхимиздат, 1962. С. 186—188.
12. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Мир, 1980. С. 115.

13. Хэвинга Э. // Мономолекулярные слои / Ред. Сobotка Г. М.: ИЛ, 1956. С. 222—235.
14. Адамсон А. Физическая химия поверхностей. М.: Мир, 1979. С. 87—199.
15. Гимашев С. В. Физикохимия мембранных процессов. М.: Химия, 1988. С. 112—113.
16. Vliegenthart J. F. G., Veldink G. A. // Free Radicals in Biology. V. 5 / Ed. Pryor W. A. New York — London: Acad. Press, 1982. P. 29—64.
17. Бутович И. А., Кухарь В. П. // Укр. биохим. журн. 1989. Т. 61. № 2. С. 106—108.
18. Бутович И. А., Цысь Е. В., Солошонок В. А., Солоденко В. А., Кухарь В. П. // Тез. докл. IV Всесоюз. конф. Минск: Ин-т биоорг. химии АН БССР, 1989. С. 111.
19. Бутович И. А., Солошонок В. А., Солоденко В. А., Кухарь В. П. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 270—271.
20. Бутович И. А., Могилевич Т. В., Кухарь В. П. // Укр. биохим. журн. 1989. Т. 61. № 2. С. 54—59.
21. Лотоцкая Л. С., Найденова И. Ю., Ильяшева Л. М., Пода Г. И., Корнилов А. М., Сорочинский А. Е., Галушко С. В., Липкан Г. Н., Луйк А. И., Кухарь В. П. // Фармакология и токсикология. 1989. Т. 52. № 2. С. 59—62.
22. Бутович И. А., Кухарь В. П., Бридня В. П., Радченко О. А., Котлинская А. Н. // Докл. АН УССР. Сер. Б. 1989. № 5. С. 55—58.
23. Бутович И. А., Бридня В. П., Кухарь В. П. // Биохимия. 1990. Т. 55. Вып. 7. С. 1216—1221.
24. Бутович И. А., Бабенко В. М., Ливарчук Л. В., Могилевич Т. В., Кухарь В. П. // Биохимия. 1991. Т. 56. Вып. 6. С. 1077—1081.

Поступила в редакцию
28.V.1990

После доработки
11.III.1991

I. A. BUTOVICH, E. V. TSYS, T. V. MOGILEVICH, V. P. KUKHAR'

EFFECTS OF THE PHYSICO-CHEMICAL FACTORS ON THE LIPOXYGENASE OXIDATION OF LINOLEIC ACID

Institute of Bioorganic and Oil Chemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Oxidation of linoleic acid by 5-lipoxygenase from potato tubers was studied at different pH-values in the presence of the non-ionic surfactant Lubrol PX, which facilitates UV-monitoring of the process. It is shown that linoleic acid and Lubrol PX form mixed micelles, containing linoleic acid in two major forms with $pK_{a1} = 6.5$ (monomeric form localized in the surface layer) and $pK_{a2} = 8.5$ (dimers localized inside hydrophobic core of the micelle). It explains the rise of pH-optimum of the linoleic acid lipoxygenation upon increase of the initial substrate concentration.