



УДК 577.156 + 542.938

СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ ГИДРОЛИЗА РАЗЛИЧНЫХ
А МИДНЫХ СВЯЗЕЙ, ОБРАЗОВАННЫХ α -КАРБОКСИЛЬНЫМИ
ГРУППАМИ АЦИЛАМИНОКИСЛОТ

Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Определено положение равновесия при 25° в системах $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-X} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OH} + \text{HX}$, где X — $-\text{NH}_2$, $-\text{NHNH}_2$, $-\text{NHC}_6\text{H}_5$. Константы равновесия соответственно равны 32,1 (рН 7), 20,3 (рН 7) и 4,56 (рН 6). Положение равновесия найдено при достижении его как в направлении гидролиза, так и в направлении синтеза. В качестве катализатора использовали α -химотрипсин. Анализ полученных в работе и литературных данных свидетельствует о линейной зависимости величин свободной энергии гидролиза различных амидных (в том числе пептидных) связей, образуемых α -карбоксовой группой ациламино кислот, в расчете на неионизированные формы от pK_a'' ионизации аминогруппы аминокомпонента: $\Delta F_0 = 0,3 + 0,6 \text{ pK}_a''$.

Важной характеристикой субстратов гидролитических ферментов является величина свободной энергии их гидролиза [1]. К субстратам протеиназ наряду с белками относятся различные амиды и эфиры аминокислот. Величины свободной энергии гидролиза сложноэфирной связи в эфирах ациламино кислот, а также пептидной связи и амидной связи *n*-нитроанилидов ациламино кислот были определены нами ранее [2—4]. Долгое время считали, что свободная энергия гидролиза амидных связей в расчете на неионизированные формы (ΔF_0) совпадает для всех соединений этого типа. Так, Карпентер [5], обобщив имевшиеся данные, пришел к выводу, что ΔF_0 для пептидов равна $4,7 \pm 0,7$ ккал/моль. Однако мы показали [4], что ΔF_0 гидролиза *n*-нитроанилидов и пептидов резко различаются. Фершт и Реквена [6] определили константы равновесия образования различных алкиламидов муравьиной кислоты из неионизированных форм реагентов и нашли, что, за небольшим исключением, зависимость логарифма константы равновесия от pK_a'' амина подчиняется уравнению $\lg K_{\text{равн}} = 0,5 + 0,51 \text{ pK}_a''$.

К началу нашего исследования были определены величины свободной энергии гидролиза пептидной связи [3, 7, 8], гидроксамидной [9], *n*-нитроанилидной [4] и анилидной [10]. Последняя величина была определена в системе, в которой равновесие достигалось только в направлении синтеза. Полученное значение $\Delta F_0 = 0,56$ ккал/моль существенно отличалось от величины, полученной Ферштом и Реквена [6] для форманилида ($\Delta F_0 = 2,83$ ккал/моль), и поэтому нуждалось в проверке. Величины свобод-

Сокращения: Phe (NO₂) — *L*-*n*-нитрофенилаланин, в сокращениях производных Phe(NO₂) дефисом показана гидролизуемая связь.

ной энергии гидролиза амидов и гидразидов ациламинокислот не были известны.

В связи с этим целью данной работы являлось определение величин свободной энергии гидролиза амидов и анилидов ациламинокислот, а также установление зависимости ΔF_0 амидной связи от pK_a'' ионизации аминокислот.

Учитывая, что реакционная способность муравьиной кислоты по сравнению с другими кислотами (в том числе с аминокислотами) существенно выше, и сопоставив константы равновесия, предсказываемые предложенным уравнением, с известными из литературных данных [3, 7, 9], Фершт и Реквена [6] предложили для образования пептидной связи формулу $\lg K_{\text{равн}} = 0,3 + 0,51 pK_a''$, которая, по-видимому, может быть уточнена при использовании большего числа экспериментальных данных.

Мы исследовали равновесие при 25° в системах $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-X} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OH} + \text{HX}$, где X — $-\text{NH}_2$, $-\text{NHNH}_2$ и $-\text{NHC}_6\text{H}_5$. Равновесие достигалось в направлении как синтеза, так и гидролиза. В качестве аминокислоты использовали N-ацетил-L-n-нитрофенилаланин, поскольку за синтезом и гидролизом субстратов, содержащих эту аминокислоту, легко следить спектрофотометрически [11]. В табл. 1 приведены молярные экстинкции компонентов системы, в которых изучалось равновесие. В качестве катализатора использовали α -химотрипсин, для которого исследуемые вещества являются хорошими субстратами [11].

При выборе исходных концентраций веществ в системах определенные ограничения накладывали высокая оптическая плотность растворов $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OH}$, нежелательность использования высоких концентраций хлористого аммония и хлоргидрата гидразина (нежелательность высокой ионной силы растворов) и плохая растворимость анилина. Исследование равновесия гидролиза анилида при pH 6 было вызвано его недостаточно высокой равновесной концентрацией при pH 7. При pH 6 равновесная концентрация $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-NHC}_6\text{H}_5$ в 10 раз выше из-за большей доли неионизированной формы $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OH}$. При достижении равновесия в направлении синтеза исследовали кинетику уменьшения оптической плотности растворов, содержащих $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OH}$ и второй компонент исходной системы: NH_4Cl , $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ или $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_5$. При достижении равновесия в направлении гидролиза в систему вносили $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-NH}_2$, $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-NHNH}_2$ или $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-NHC}_6\text{H}_5$ в концентрациях, несколько превышающих ожидаемую равновесную, и фиксировали увеличение оптической плотности растворов в ходе гидролиза избытка субстрата. Константу равновесия реакции гидролиза K_r определяли по формуле

$$K_r = \frac{[\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OH}][\text{HX}]}{[\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-X}]},$$

где концентрации равны суммарным концентрациям всех ионных форм, а активность воды принята равной 1 М [2]. Равновесные концентрации компонентов систем приведены в табл. 2—4.

Средние величины K_r , приведенные в табл. 2—4, рассчитаны из средних значений констант при достижении равновесия в направлении синтеза и гидролиза.

Величину свободной энергии реакции гидролиза определяли по формуле [2]

$$\Delta F_r = -RT \ln K_r.$$

Для пересчета ΔF_r для других значений pH, а также для расчета ΔF_0 на неионизированные формы реагентов необходимо знать константы ионизации. pK_a ионизации $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OH}$, определенная спектрофотометрическим титрованием, оказалась равной 3,2. pK_a ионизации анилина, гидразина и аммония равны соответственно 4,58; 8,1 и 9,26 [12]. Величины ΔF_r для амида, гидразида и анилида при pH 7 равны $-2,05$; $-1,78$ и

Таблица 1

Молярные экстинкции компонентов равновесных систем при 310 нм (25°)

Вещество	pH	ϵ_{310}	Вещество	pH	ϵ_{310}
AcPhe(NO ₂)OH	7	5333	AcPhe(NO ₂)-NH ₂ C ₆ H ₅	6	3260
AcPhe(NO ₂)OH	6	7550	NH ₂ C ₆ H ₅	6	55
AcPhe(NO ₂)-NH ₂	7	3900	NH ₄ Cl	7	0
AcPhe(NO ₂)-NHNH ₂	7	3767	NH ₂ NH ₂ ·HCl	7	0

Таблица 2

Равновесные концентрации компонентов системы
 $\text{AcPhe(NO}_2\text{)-NH}_2 \rightleftharpoons \text{AcPhe(NO}_2\text{)OH} + \text{NH}_3$ и константы равновесия
 гидролиза (K_r) при 25° и pH 7

Путь достижения равновесия	[AcPhe(NO ₂)OH] · 10 ³ , М	[NH ₄ Cl], М	[AcPhe(NO ₂)-NH ₂] · 10 ³ , М	K_r
Синтез	8,33	0,962	2,38	33,2
	8,33	0,770	1,98	31,5
	8,33	0,962	2,20	35,6
Гидролиз	8,32	0,962	0,50	31,4
	8,33	0,962	2,66	30,2
	8,32	0,962	3,02	26,7
	7,88	0,925	2,40	30,4

 K_r (средн) 32,1

Таблица 3

Равновесные концентрации компонентов системы
 $\text{AcPhe(NO}_2\text{)-NHNH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{AcPhe(NO}_2\text{)OH} + \text{NH}_2\text{NH}_2$
 и константа равновесия гидролиза (K_r) при pH 7 и 25°

Путь достижения равновесия	[AcPhe(NO ₂)OH] · 10 ⁴ , М	[NH ₂ NH ₂ ·HCl], М	[AcPhe(NO ₂)-NHNH ₂] · 10 ⁴ , М	K_r
Синтез	2,61	0,75	10,0	18,8
	1,65	0,56	4,56	20,3
Гидролиз	1,28	0,375	2,37	20,3
	1,28	0,375	2,125	22,65
	0,839	0,28	1,062	22,43
	0,8378	0,28	1,213	19,26

 K_r (средн) 20,3

Таблица 4

Равновесные концентрации компонентов системы
 $\text{AcPhe(NO}_2\text{)-NH}_2\text{C}_6\text{H}_5 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{AcPhe(NO}_2\text{)OH} + \text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
 и константа равновесия гидролиза (K_r) при pH 6 и 25°

Путь достижения равновесия	[AcPhe(NO ₂)OH] · 10 ⁴ , М	[NH ₂ C ₆ H ₅] · 10 ³ , М	[AcPhe(NO ₂)-NH ₂ C ₆ H ₅] · 10 ⁴ , М	K_r
Синтез	1,99	25	1,04	4,78
	1,988	25	1,11	4,48
	1,99	25	1,185	4,20
	2,0	25	0,965	5,18
Гидролиз	2,011	25	1,15	4,37
	2,0	25	1,13	4,42
	1,84	25	1,03	4,47
	1,83	25	1,0	4,58

 K_r (средн) 4,56

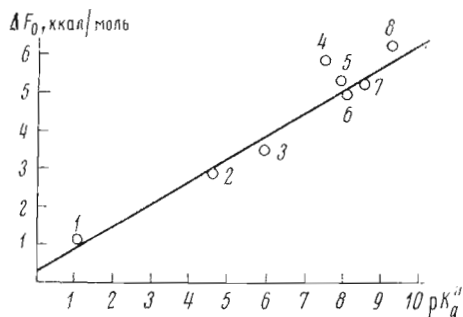


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость свободной энергии гидролиза амидов ациламино кислот в расчете на неионизированные формы (ΔF_0) от pK_a'' ионизации аминогруппы аминок компонента. Нумерация соответствует соединениям, приведенным под соответствующими номерами в табл. 5

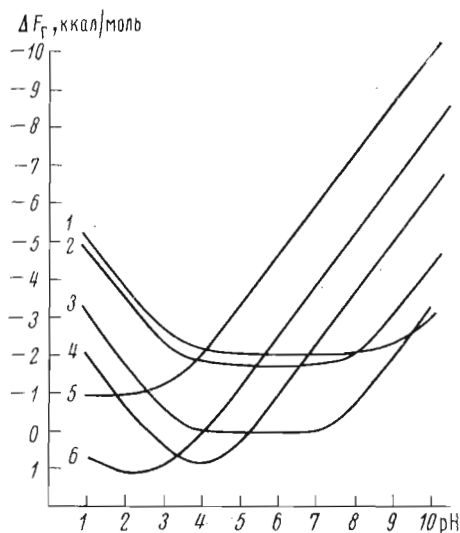


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость от pH величин свободной энергии гидролиза (ΔF_r) различных субстратов протеиназ: 1 — $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-NH}_2$; 2 — $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-NHNH}_2$; 3 — AcPhe-TyrOEt ; 4 — $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-NHC}_6\text{H}_5$; 5 — AcPhe-OMe ; 6 — $\text{AcPhe-NHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$

—2,26 ккал/моль. В табл. 5 приведены значения свободной энергии гидролиза различных амидов, образованных ациламино кислотами, включающие литературные и полученные нами данные. Анализ данных гидролиза амидов ациламино кислот позволяет сделать вывод о линейной зависимости ΔF_0 от pK_a аминогруппы (рис. 1). Линейную зависимость можно выразить эмпирическим уравнением

$$\Delta F_0 = 0,3 + 0,6 pK_a''$$

или для констант равновесия в расчете на неионизированные формы $K_{\text{равн}}$:

$$\lg K_{\text{равн}} = 0,2 + 0,44 pK_a'',$$

где pK_a'' — константа ионизации аминок компонента.

Это выражение несколько отличается от уравнения, предложенного Ферштом и Реквена [6]. Значение pK_a ионизации аминок компонента и карбоксильного компонента позволяет определить величину свободной энергии гидролиза образуемой ими связи при любом pH по следующей формуле:

$$\Delta F_r = 0,3 + 0,6 pK_a'' - RT \ln(1 + 10^{pH - pK_a'} + 10^{pK_a'' - pH} + 10^{pK_a'' - pK_a'}).$$

В табл. 5 приведены величины $\Delta F_{r, \text{pH}}$, рассчитанные по этой формуле. Следует отметить, что расчет не всегда хорошо согласуется с экспериментом (наибольшее различие наблюдается в случае этилового эфира N-ацетилфенилаланилтирозина [3]).

В заключение на рис. 2 приводится pH-зависимость величин ΔF_r субстратов протеиназ, рассчитанных на основании данных, полученных

Свободная энергия гидролиза различных амидов N-ациламинокислот

№ п.п.	Соединение	pK_a	pK_a''	ΔF_0 , ккал/моль	ΔF_T , pH 7, ккал/моль		Литература
					эксперимент	расчет	
1	AcPhe-NHC ₆ H ₄ NO ₂	3,3	1,02	1,11	-3,94	-4,14	[4]
2	AcPhe(NO ₂)-NHC ₆ H ₅	3,2	4,58	2,92	-2,26	-2,14	Данная работа
3	AcTyr-NHOH	3,1	5,97	3,49	-1,87	-1,49	[9]
4	AcPhe-TyrOEt	3,3	7,5	5,84	-0,05	-1,09	[3]
5	BzTyr-GlyNH ₂	3,7	7,93	5,35	-0,49	-0,78	[7]
6	AcPhe(NO ₂)-NHNH ₂	3,2	8,10	4,95	-1,78	-1,57	Данная работа
7	BzTyr-GlyNHC ₆ H ₅	3,7	8,52	5,21	-1,37	-1,18	[8]
8	AcPhe(NO ₂)-NH ₂	3,2	9,26	6,21	-2,05	-2,41	Данная работа

Таблица 6

Исходные концентрации компонентов

Путь достижения равновесия	[AcPhe(NO ₂)OH]·10 ⁵ , М	[NH ₂ Cl], М	[AcPhe(NO ₂)-NH ₂]·10 ⁶ , М
Синтез	8,35	0,962	0
	8,35	0,77	0
Гидролиз	8,35	0,962	0
	8,35	0,962	2,5
	8,35	0,962	5,0
	8,35	0,962	5,0
	7,90	0,925	6,1
	[AcPhe(NO ₂)OH]·10 ⁵ , М	[NH ₂ NH ₂ · ·HCl], М	[AcPhe(NO ₂) ₆ -NHNH ₂]·10 ⁶ , М
Синтез	17,0	0,56	0
	26,0	0,75	0
Гидролиз	12,55	0,375	5,0
	12,55	0,375	5,0
	8,3	0,28	2,28
	8,3	0,28	2,28
		[AcPhe(NO ₂)OH]·10 ⁵ , М	[NH ₂ C ₆ H ₅]· ·10 ³ , М
Синтез	20	25	0
	20	25	0
	20	25	0
	20	25	0
Гидролиз	20	25	2,24
	20	25	1,13
	18,3	25	2,0
	18,3	25	1,0

в этой и предыдущих наших работах [2—4]. Как следует из анализа этих зависимостей, соотношение энергетического содержания связей в субстратах существенно изменяется при изменении pH.

Экспериментальная часть

α -Химотрипсин — высокоочищенный препарат Олайнского завода химических реактивов; содержание активного фермента, определенное титрованием N-транс-циннамоилмидазолом [13], равно 75%.

N-Ацетил-L-n-нитрофенилаланин, его амид, гидразид и анирид получали, как описано ранее [11].

Измерения гидролиза и синтеза в изучаемых системах проводили с помощью однолучевого регистрирующего спектрофотометра собственной конструкции с чувствительностью 0,01 единицы оптической плотности на ширину диаграммной ленты самописца (25 см), в кварцевой герметической кювете (толщина слоя 1 см, объем 3 мл) при 310 нм. Концентрации компонентов системы приведены в табл. 6. Концентрацию α -химотрипсина (2—3 мг/мл) подбирали с расчетом, чтобы положение равновесия достиглось через 15—60 мин. Опыты проводили при 25° в 0,2 М фосфатном буфере, рН 7 или 6, содержащем 3% (по объему) диметилформамида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kozlov L. V., Antonov V. K., Djachenko E. D. (1974) Abstracts 7th Meeting FEBS, Varna 1974, N 181, p. 110.
2. Козлов Л. В., Гинюдман Л. М. (1965) Биохимия, 30, 1051—1054.
3. Козлов Л. В., Гинюдман Л. М., Орехович В. П., Валуева Т. А. (1966) Биохимия, 31, 315—321.
4. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1971) Биохимия, 36, 981—984.
5. Carpenter F. H. (1960) J. Amer. Chem. Soc., 82, 1111—1122.
6. Fersht A. R., Requena Y. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 3499—3504.
7. Dobry A., Fruton J. S., Sturtevant J. M. (1952) J. Biol. Chem., 195, 149—155.
8. Gawron O., Glaid A. J., Boyle R. E., Odstrechel G. (1961) Arch. Biochem. and Biophys., 95, 203—210.
9. Jencks W. P., Caplow M., Gilchrist M., Kallen R. G. (1963) Biochemistry, 2, 1313—1320.
10. Carty R. P., Kirschenbaum D. M. (1965) Biochim. et biophys. acta, 110, 399—413.
11. Дьяченко Е. Д., Волкова Л. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1976) Биоорганическая химия, 2, 1665—1671.
12. Справочник химика (1964) 2-е изд., т. III, с. 81, 98, «Химия», М.—Л.
13. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930—2935.

Поступила в редакцию
2.V.1976

FREE ENERGY OF HYDROLYSIS OF VARIOUS AMIDE BONDS FORMED BY α -CARBOXY GROUPS OF ACYLAMINOACIDS

DJACHENKO E. D., KOZLOV L. V., ANTONOV V. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The position of equilibrium has been determined at 25° for the systems: $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-X} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OH} + \text{HX}$, where $\text{X} = \text{-NH}_2$, -NHNH_2 and $\text{-NHC}_6\text{H}_5$. The equilibrium constants were found to be 32.1 (pH 7.0), 20,3 (pH 7.0) and 4.56 (pH 6.0), respectively. The equilibrium was reached both from the hydrolysis and synthesis pathways using α -chymotrypsin as a catalyst. The data obtained and those taken from literature show that a linear correlation exists between the values of free energy for different amide (including peptide) bonds hydrolysis (calculated on unionized form) and pK_a of the amino moiety which can be expressed as: $\Delta F_0 = 0.3 + 0.6 \text{ pK}_a$