



УДК 577.153.2.02

ДЕЙСТВИЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ
НА *n*-НИТРОФЕНИЛОВЫЕ ЭФИРЫ АЛИФАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ*Нуцубидзе Н. Н., Дьяков В. Л., Ротанова Т. В.,
Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемлякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследована кинетика катализируемого панкреатической липазой гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров алифатических кислот $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ -*n* (*n* = 1, 3—7) в области концентраций субстратов, соответствующей истинным растворам (соединения с *n* = 1, 3—5), и в области мицеллярных растворов (соединения с *n* = 6, 7). Показано, что зависимость величины $k_{\text{кат}}/K_m (= k_2/K_s)$ от *n* для этих субстратов практически совпадает с зависимостью величины K_1 алкилборных кислот от длины алифатической цепи. Сделан вывод, что изменение длины алифатической цепи субстратов не влияет на константу скорости ацилирования (k_2). Константа скорости дезацилирования (k_3) липазы значительно увеличивается при переходе от водорастворимых субстратов к субстратам, нерастворимым в воде. Таким образом, активация фермента на границе раздела фаз, по-видимому, обусловлена изменением константы скорости дезацилирования фермента.

Специфическими субстратами панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3) являются триглицериды жирных кислот [1], гидролиз которых ферментом наиболее эффективно происходит в гетерогенной системе. Активность фермента в отношении этого типа субстратов в однофазной системе очень низка. Однако введение в систему гидрофобной поверхности раздела фаз (например, силикопозированных стеклянных шариков и т. п.) вызывает резкое увеличение активности фермента в отношении растворимых в воде субстратов [2, 3]. Проблема механизма активации липазы на поверхностях раздела фаз крайне важна и интересна, но для ее решения необходимо располагать данными о каталитических свойствах фермента как в гомогенном, так и в гетерогенном состоянии. Данные по гидролизу водорастворимых субстратов, катализируемому панкреатической липазой, в настоящее время очень немногочисленны [3, 4].

Целью настоящей работы было получить кинетические параметры катализируемого панкреатической липазой гидролиза серии водорастворимых субстратов. В качестве таковых выбраны *n*-нитрофениловые эфиры алифатических кислот, различающиеся длиной алифатического радикала $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ -*n*, где *n* = 1, 3, 4, 5, 6 и 7.

Этот выбор был обусловлен, во-первых, желанием сопоставить влияние размеров углеводородной цепи субстратов на кинетические параметры липазы с полученными нами ранее [5] данными по аналогичному влиянию размеров цепи в ингибиторах — алкилборных кислотах и, во-вторых,

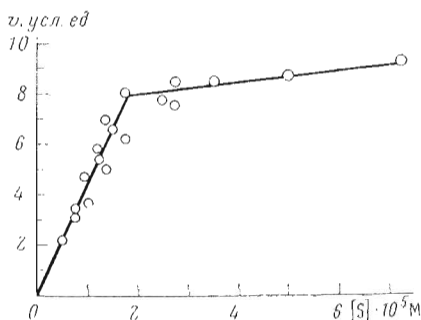


Рис. 1

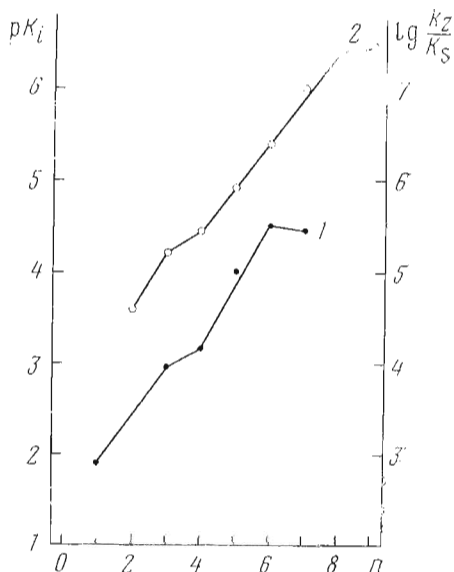


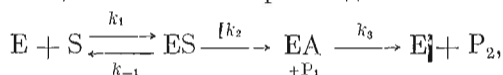
Рис. 2

Рис. 1. Зависимость скорости спонтанного гидролиза *n*-нитрофенилэнантоата от его концентрации

Рис. 2. Зависимость $\lg k_2/K_s$ катализируемого панкреатической липазой гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ (1) и величины pK_i для алкилборных кислот $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ (2) (взято из работы [5]) от длины углеводородной цепи (*n*)

возможностью в принципе определить для этих субстратов индивидуальные кинетические константы трехстадийного процесса ферментативного гидролиза.

Как известно [3, 6, 7], гидролитическая реакция, катализируемая панкреатической липазой, описывается трехстадийной схемой



где ES — комплекс Михаэлиса, EA — ацил-фермент, P_1 и P_2 — продукты гидролиза.

Чтобы удостовериться в отсутствии изменений фазового состояния системы в ходе кинетических измерений, необходимо было определить критические концентрации мицеллообразования *n*-нитрофениловых эфиров алифатических кислот, поскольку известно [8], что в водном растворе эти соединения склонны к ассоциации. Критические концентрации были определены двумя методами: 1) методом, основанным на изменении спектра поглощения растворов иода при взаимодействии с мицеллами [4]; 2) из данных по зависимости скорости спонтанного гидролиза *n*-нитрофенилкарбоксилатов от их концентрации (рис. 1). Оба метода дали совпадающие значения: для *n*-нитрофениловых эфиров каприловой кислоты — 11 мкМ, энантовой кислоты — 17,5 мкМ и капроновой кислоты — 90 мкМ.

Оказалось, что для субстратов с $n = 1-5$ критическая концентрация мицеллообразования лежит в области концентраций, заметно превышающих концентрации, необходимые для кинетических измерений, тогда как в случае эфиров с $n = 6$ и 7 получить гомогенные растворы в области концентраций, близких к ожидаемым значениям K_m , невозможно.

Поскольку активность панкреатической липазы сильно зависит от многих факторов, в частности типа аппаратуры, используемой для кинетических измерений, наличия в растворах взвешенных частиц и т. п., необхо-

**Кинетические параметры катализируемого панкреатической липазой гидролиза
n-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$**

Эфир	<i>n</i>	[S] ₀ · 10 ⁵ , М	<i>k</i> _{кат} , мин ⁻¹	<i>K</i> _м , мМ	(<i>k</i> _{кат} / <i>K</i> _м) · 10 ⁴ , мин ⁻¹ · М ⁻¹
<i>n</i> -Нитрофенилацетат	1	31,2–390	3,1	4,47	0,690
<i>n</i> -Нитрофенилбутират	3	7,5–75	5,4	0,46	11,7
<i>n</i> -Нитрофенилвалерат	4	3,7–26	2,2	0,18	12,2
<i>n</i> -Нитрофенилкапронат	5	1,5–12,4	7,85	0,06	130
<i>n</i> -Нитрофенилэнантоат	6	0,9–9	23,9	0,03–0,08	300
<i>n</i> -Нитрофенилкаприлат	7	1,4–5,8	32	0,08	400

димо было убедиться в соблюдении в условиях эксперимента линейной зависимости скорости реакции от концентрации белка. Опыты с *n*-нитрофенилацетатом и *n*-нитрофенилкапронатом показали, что линейность соблюдается в интервале концентраций фермента 0,02–0,2 мкМ.

Кинетику катализируемого панкреатической липазой гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров алифатических кислот изучали спектрофотометрически (λ 400 нм) в кварцевых кюветах при рН 7,5 в присутствии CaCl₂ и 4% (об.) ацетонитрила.

Значения кинетических констант в области истинных растворов удалось получить лишь для эфиров с *n* = 1, 3, 4 и 5 (таблица). Для *n*-нитрофенилового эфира энантовой кислоты (*n* = 6) диапазон используемых концентраций субстрата соответствовал как водорастворимой области, так и области агрегации. В этом случае сходимость экспериментальных данных была низкой. Для *n*-нитрофенилового эфира каприловой кислоты (*n* = 7) кинетические параметры были получены лишь для агрегированного состояния. Таким образом, данные, представленные в таблице для этих двух субстратов, носят скорее полуколичественный характер.

Сопоставление зависимости константы специфичности (*k*_{кат}/*K*_м) панкреатической липазы от размера углеводородного радикала, а также полученных нами ранее [5] данных по ингибированию липазы *n*-алкилборными кислотами (рис. 2) показывает хорошее соответствие этих данных вплоть до *n*-нитрофенилкапроната. Как в случае эфиров алифатических кислот, так и в случае алкилборных кислот каждая СН₂-группа вносит в свободную энергию связывания вклад, равный ~ 750 кал/моль, что характерно для гидрофобных взаимодействий.

Наличие корреляции между константами ингибирования и константами скорости второго порядка катализа свидетельствует о том, что величина константы скорости ацилирования фермента *n*-нитрофениловыми эфирами алифатических кислот (*k*₂) практически не зависит от длины цепи углеводородного радикала и что гидрофобное взаимодействие фермента с субстратом существенно главным образом на стадии образования комплекса Михаэлиса.

На основании имеющихся в литературе данных [3, 9] можно заключить, что в случае гидролиза нитрофениловых эфиров панкреатической липазой реализуется условие *k*₂ ≫ *k*₃. Поэтому измеряемая величина *k*_{кат} приблизительно равна *k*₃. Кривая зависимости *k*_{кат} (= *k*₃) от длины углеводородной цепи показывает (рис. 3), что для нерастворимых в воде субстратов (*n* = 6, 7) величина *k*₃ сильно увеличивается. Для водорастворимых субстратов наблюдается лишь некоторое падение этой константы для *n*-нитрофенилвалерата, что согласуется с данными по ингибированию алкилборными кислотами и результатами гидролиза эмульгированных *n*-хлорфенилкарбоксилатов [6]. Вероятно, это связано с наличием в активном центре некоторого изгиба гидрофобного связывающего участка, расположенного на удалении 3–4 метиленовых звеньев от каталитического центра (ср. [5]).

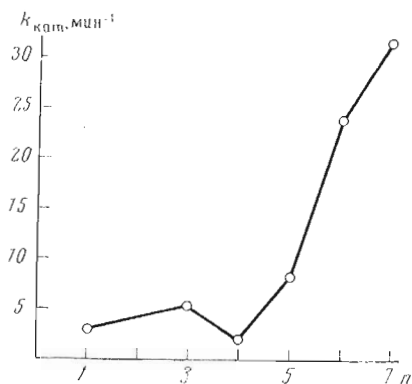


Рис. 3

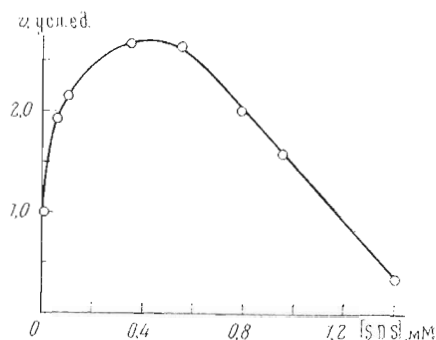


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость константы скорости катализируемого панкреатической липазой гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот ($k_{кат}$) от длины углеводородной цепи

Рис. 4. Гидролиз *n*-нитрофенилацетата панкреатической липазой в зависимости от концентрации додецилсульфата натрия

Таким образом, есть основания предполагать, что изменение агрегатного состояния субстратов приводит к активации фермента, проявляющейся главным образом в увеличении константы скорости дезацилирования. Поскольку для субстратов в эмульгированном состоянии величина K_s , согласно данным Брокерхоффа [6], практически не зависит от длины цепи субстратов, а в водорастворимой области, как показано выше, изменение этой величины обуславливает различия в скоростях гидролиза (при относительном постоянстве k_2 и k_3), различия в действии фермента на водорастворимые и водонерастворимые субстраты связаны с изменением каталитических, а не сорбционных свойств липазы на границе раздела фаз.

Полученные нами значения $k_{кат}/K_m$ близки величинам для *n*-нитрофенилацетата и *n*-нитрофенилбутирата в работе Дэньюелля и сотр. [9]. Однако приведенные ими значения $k_{кат}$ (0,12 мин⁻¹) и K_m (0,24 мМ) для *n*-нитрофенилацетата отличаются от наших. Эти различия отражают разницу в величинах k_3 , так как для нитрофенилацетата $K_m = K_s k_3 / k_2$, а величины K_s / k_2 в обоих экспериментах совпадают. Условия эксперимента в работе [9] отличались тем, что там не использовалась добавка $CaCl_2$, а концентрация фермента была выше, чем в нашем случае, примерно в 15 раз.

В специальном опыте нами было показано, что отсутствие добавки $CaCl_2$ практически не сказывается на величинах каталитических констант. Различие в концентрации, однако, может приводить к различному содержанию «активированной» формы липазы за счет активации поверхностью кюветы и, возможно, посторонними примесями (частицы пыли и т.п.). Это должно отражаться именно на величине k_3 . Чтобы проверить это предположение, мы исследовали влияние концентрации мицеллообразующего реагента (додецилсульфат натрия) на активность панкреатической липазы при двух концентрациях фермента (рис. 4). Оказалось, что увеличение концентрации додецилсульфата при $|E|_0 = 0,5$ мкМ приводит сначала к увеличению активности, а затем, при больших концентрациях детергента, — к ее уменьшению. При низкой концентрации фермента (0,05 мкМ) додецилсульфат не активирует фермент, а сразу происходит инактивация. Следовательно, для активации фермента на границе раздела фаз необходим некоторый критический размер поверхности, зависящий от концентрации фермента.

Экспериментальная часть

Препарат панкреатической липазы (смесь изоферментов L_A и L_B , не различающихся по каталитическим свойствам) получили по методике Дэньюелля и сотр. [10]. Активность препарата на стадии делипидизации, вычисленная из скорости ферментативного гидролиза трибутирина, соответствовала активности, приведенной в работе [10] для аналогичного препарата. На последней стадии очистки препарат липазы, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, практически гомогенен. При этом было достигнуто увеличение удельной активности фермента в 30 раз по сравнению с активностью препарата на стадии делипидизации. Исходный раствор фермента (рН 8,0; 0,1 М Трис-НСl-буфер, 3,3 мМ $CaCl_2$, 0,4 М NaCl) хранили в холодильнике при -15° . Концентрацию фермента вычисляли, исходя из молекулярного веса липазы, равного 48 000, и $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 13,3$ при 280 нм. Исходный раствор липазы имел концентрацию $2 \cdot 10^{-5}$ М.

Реактивы: Трис (ч.), препарат Олайнского завода химреактивов, дважды перекристаллизовывали из смеси этанол — вода (в присутствии активированного угля). Ацетонитрил очищали по методике [11].

Субстраты: трибутирин $C_{15}H_{26}O_6$ (ч.), препарат Ереванского завода химреактивов, очищали перегонкой в вакууме, т. кип. $190^\circ/15$ мм рт. ст. [12]. *n*-Нитрофенилацетат синтезировали по методике [13], т. пл. $80-81^\circ$. *n*-Нитрофениловые эфиры масляной, валериановой, капроновой, энантовой и каприловой кислот, синтезированные из соответствующих хлорангидридов по методу [14], получены с кафедры биохимии МГУ. Характеристики *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот представлены в работе [15]. Чистоту использованных субстратов контролировали по количеству *n*-нитрофенола, образующегося при полном щелочном гидролизе.

Определение критических концентраций мицеллообразования для *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот проводили двумя методами: 1) методом, основанным на спектральном сдвиге поглощения иода при взаимодействии с мицеллами [4]. Условия эксперимента: 60 мг/л иода, 0,1 М ацетатный буфер (рН 5), 4 об. % ацетонитрила, 3,3 мМ $CaCl_2$; 2) из графика зависимости скорости спонтанного гидролиза *n*-нитрофенилкарбоксилатов от их концентрации при рН 7,5. На рис. 1 приведен типичный график такой зависимости для случая *n*-нитрофенилового эфира энантовой кислоты. Критической концентрации соответствует точка перегиба на этом графике.

Кинетические измерения. Измерения начальных скоростей ферментативного гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот осуществляли спектрофотометрированием реакционных растворов при 400 нм с помощью регистрирующего спектрофотометра «Gilford» 2400-2 (США) на шкале 0,1 опт. ед. В условиях опыта (80 мМ Трис-НСl-буфер; рН 7,5; 2,7 мМ $CaCl_2$, 4 об. % CH_3CN) молярный коэффициент экстинкции *n*-нитрофенолят иона (при 400 нм) равен 12 000. Типичный опыт ставили следующим образом: в четыре кварцевые кюветы (l 1 см) вносили по 1,9 мл буферного раствора. После 5—10 мин инкубации, необходимой для достижения температурного равновесия (25°), прибавляли по 0,08 мл исходного раствора субстрата в ацетонитриле, затем вносили в первую кювету (контрольный раствор) 0,02 мл буферного раствора, в котором хранили препарат липазы, а в остальные — по 0,02 мл раствора липазы. Спонтанный гидролиз (контрольный раствор) автоматическим вычитался из общей скорости гидролиза, наблюдаемой в трех остальных кюветах. Для каждой отдельной концентрации субстрата ставили как минимум 3 отдельных опыта, а чаще не менее 6; из этих опытов рассчитывали среднеарифметическое значение скорости гидролиза, которое далее использовали для вычисления V и K_m . Кинетические параметры гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров определяли по методу наименьших квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benzonana G., Desnuelle P. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **105**, 121—136.
2. Brockman H. L., Law J. H., Kezdy F. J. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 4965—4970.
3. Semeriva M., Chapus C., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **58**, 808—813.
4. Entressangles B., Desnuelle P. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **159**, 285—295.
5. Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 837—845.
6. Brockerhoff H. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **212**, 92—101.
7. Desnuelle P., Semeriva M., Dufour C. (1974) *Biochemistry*, **10**, 2143—2149.
8. Guthrie J. P. (1973) *Can. J. Chem.*, **51**, 3494—3498.
9. Chapus C., Semeriva M., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4980—4987.
10. Verger R., de Haas G. H., Sarda L., Desnuelle P. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **188**, 272—282.
11. Lewis H. F., Smyth C. P. (1939) *J. Chem. Phys.*, **7**, 1085—1087.
12. Weatherby L. S., Ilvaine Mc. L., Matlin D. (1925) *J. Amer. Chem. Soc.*, **47**, 2250—2252.
13. Kaufmann A. (1909) *Ber.*, **42**, 3480—3483.
14. Fife T. H. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 4597—4600.
15. Мартинек К., Доровска В. Н., Варфоломеев С. Д. (1972) *Биохимия*, **37**, 1245—1250.

Поступила в редакцию
14.VII.1977

PANCREATIC LIPASE ACTION ON THE ALIPHATIC ACID *p*-NITROPHENYL ESTERS

NUZUBIDZE N. N., DYAKOV V. L., ROTANOVA T. V.,
ANTONOV V. K.

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

The kinetics of the pancreatic lipase catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters of aliphatic acids $H(CH_2)_nCOOC_3H_7NO_2$ ($n = 1, 3-7$) have been studied over the concentration ranges corresponding to the homogeneous (for compounds with $n = 1, 3-5$) and micellar ($n = 6, 7$) solutions. It was found for these substrates that the k_{cat}/K_m ($= k_2/K_s$) dependence on the lengths of the aliphatic chain (n) is practically the same as that of K_i for the alkylboronic acids. It was concluded that the alteration of the substrate aliphatic chain fails to affect the acylation rate constant (k_2) for lipase. The deacylation rate constant (k_3) increases on passing from water-soluble substrates to insoluble ones. The enzyme activation on the interface was suggested to be associated with the change in the deacylation rate constant.