

УДК 577.157+542.98

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

К. МАРТИНЕК, Ю. Э. КИРШ, А. А. СТРОНГИНА, В. Н. ДОРОВСКА,
А. К. ЯЦИМИРСКИЙ, член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН,
член-корреспондент АН СССР В. А. КАБАНОВ

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГИДРОФОБНОГО
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ БОКОВОЙ ГРУППОЙ СУБСТРАТА
И АКТИВНОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ В РЕАКЦИЯХ С УЧАСТИЕМ
ФЕРМЕНТА (α -ХИМОТРИПСИН), СИНТЕТИЧЕСКОГО
ПОЛИМЕРНОГО КАТАЛИЗАТОРА И НУКЛЕОФИЛА,
СОРБИРОВАННОГО МИЦЕЛЛОЙ**

Гидрофобные взаимодействия между субстратом и активным центром вносят значительный вклад в эффективность катализа многими ферментами (¹). Особенно ярко проявляется роль этого взаимодействия в реакциях гидролиза сложных эфиров α -химотрипсином (ХТ) (²). Важным фактором ускорения той же реакции с участием аналогов гидролитических ферментов (^{3, 4}) служат гидрофобные взаимодействия (^{5, 6}).

В этом сообщении основное внимание направлено на выяснение роли боковой алифатической группы *n*-нитрофениловых эфиров алифатических карбоновых кислот в реакциях ацилирования следующих нуклеофилов: активный центр ХТ; пиридиновый остаток в частично алкилированном поли-4-винилпиридине; *m*-бромбензальдоксим, сорбированный мицеллой бромида цетилтриметиламмония.

Все эти реакции протекают, по-видимому, вблизи поверхности раздела водной и органической фаз (последней фазой является среда белка, полимера или мицеллы) и сопровождаются переносом (полным или частичным) молекулы субстрата из одной среды в другую. Степень этого переноса может быть различной на различных стадиях реакции. В основу анализа кинетических данных можно положить предпосылку об аддитивности инкрементов свободной энергии сорбции на «активной поверхности» катализатора различных фрагментов молекулы субстрата. Этот принцип выполняется, как правило, при экстракции органических веществ из воды органическим растворителем или при их сорбции на поверхности раздела фаз вода — масло (сводка литературы дана в (⁷)). Справедливость принципа аддитивности для процессов, протекающих в поверхностном слое глобулы белка, была доказана при изучении сорбции (⁸) и некоторых реакций (⁹) на активном центре ХТ. Задача настоящей работы — выявить общность такого термодинамического подхода к анализу кинетики аналогичных процессов, протекающих вблизи поверхности раздела фаз.

Степень чистоты фермента (¹⁰) и методика кинетических измерений (¹¹) были описаны ранее. Получение поли-4-винилпиридина описано в (²) (молекулярный вес фракции, определенный вискозиметрически, составил 62 000). Степень алкилирования поли-4-винилпиридина 4(5)-хлорметилимидазолом (солянокислым), определенная по содержанию хлора, равна 76%. Методика кинетических измерений в реакциях с участием полимерных катализаторов (ПК) приведена в (^{3, 12}). Данные по мицеллярной реакции приведены в (⁶). Методика синтеза субстратов описана в (^{6, 13}).

Можно полагать, что во всех трех системах реакция ацилирования нуклеофила *n*-нитрофениловыми эфирами протекает в две стадии. Первой ста-

дией является образование комплекса Михаэлиса в случае ХТ и ПК, или, соответственно, включение субстрата в мицеллу (солюбилизация). Этот процесс характеризуется константой диссоциации комплекса субстрата с активным центром K_s , равной $[E][S]/[ES]$ (см. ^(11, 12)), или соответственно константой распределения субстрата между мицеллярной и водной фазами $K \approx \bar{V}[S_m]/[S_w]$, где \bar{V} — мольный объем детергента (см. ^(4, 6)).

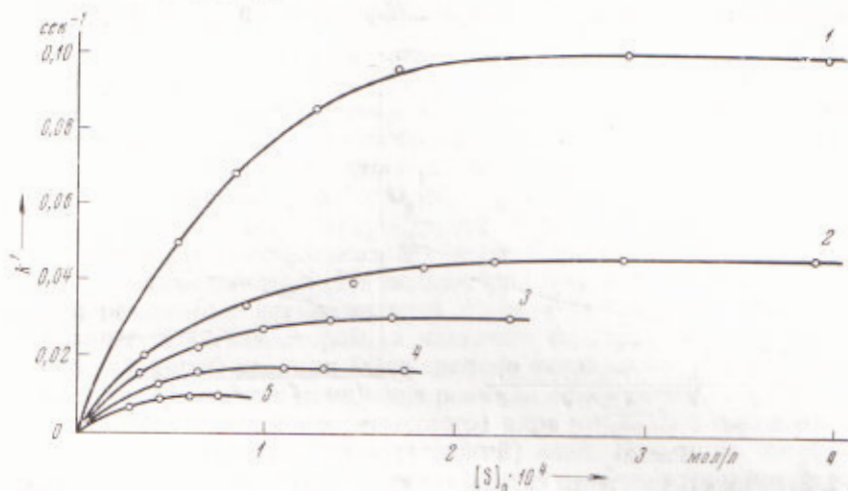


Рис. 1. Зависимость эффективной константы скорости $k' = k_2[S]_0 / (K_s + [S]_0)$ ацилирования ПК от концентрации *n*-нитрофениловых эфиров: уксусной (1), пропионовой (2), масляной (3), валериановой (4), капроновой (5) кислот. Условия реакции те же, что в табл. 1

Последующей реакцией является «внутримолекулярное» ацилирование ХТ, ПК или нуклеофилов, сорбированных мицеллами (НМ), под действием сорбированной молекулы субстрата. Этот процесс характеризуется константой скорости первого порядка k_2 ^(11, 12) или, соответственно, для мицеллярной реакции величиной \bar{k}_m , равной в этом случае k_m / \bar{V} , где k_m — константа скорости второго порядка для бимолекулярного взаимодействия субстрата с нуклеофилом в мицеллярной фазе ⁽⁴⁾.

Таблица 1

<i>n</i> -Нитрофенило- вые эфиры кислот	$k_2 \cdot 10^3$, сек ⁻¹	$K_s \cdot 10^3$, мол/л	$k_{II} (4-ЭП) \cdot 10^3$, л/моль·сек	$\frac{k_2}{K_s \cdot k_{II} (4-ЭП)} \cdot 10^{-4}$
Уксусной	100	6,0	1,60	10,0
Пропионовой	47	5,0	1,40	7,0
Масляной	30	3,5	1,02	8,4
Валериановой	16	2,5	1,09	6,0
Капроновой	10	1,8	0,80	6,9
Энантовой	4	0,8	0,93	5,5
Каприловой	3	0,2	1,00	—

Условия реакции: 25°; pH 8,0, трис-HCl; полная сила $2 \cdot 10^{-2}$ мол/л; [диметилсульфоксид] 2 ос.%; концентрации (мол/л): ПК — $1 \cdot 5 \cdot 10^{-4}$, 4-этилпиридина (4-ЭП) $1,8 \cdot 10^{-3}$.

На рис. 1 представлена зависимость эффективной константы скорости $k' = k_2[S]_0 / (K_s + [S]_0)$ реакции ацилирования ПК от концентрации субстрата (кривые Михаэлиса). На основании этих данных были найдены значения k_2 и K_s , которые сведены в табл. 1. Константы скорости k_2 / K_s для ацилирования ХТ были определены и рассчитаны до кинетическим

уравнениям второго порядка при $[S]_0 = [E]_0$. Для некоторых субстратов результаты, согласующиеся с нашими, были получены ранее (13). Данные для мицеллярной реакции приведены в (6), здесь они обсуждаются в свете концепции, рассмотренной выше.

Сопоставление результатов (рис. 2 и 3), полученных в этих трех системах, проводилось с целью выявить вклад, который вносит в реакцию взаимодействие с активной поверхностью алифатической боковой группы суб-

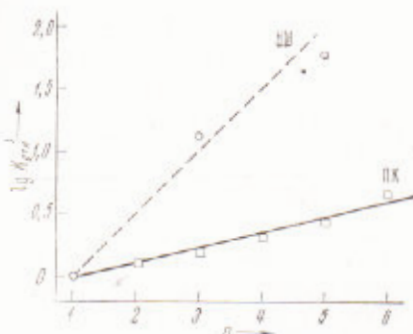


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость константы связывания субстрата $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ активным центром ПК или мицеллами (ММ) от числа метиленовых групп в кислотном остатке субстратной молекулы. Значение для *n*-нитрофенилацетата условно принято на единицу

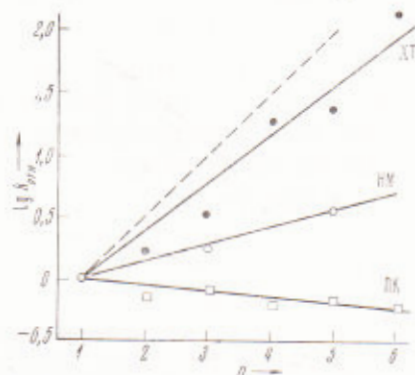


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость величины $k_{отн.}$, равной $(k_2/K_S)/k_{11}$, для реакции ацилирования ХТ и ПК или k_mK/k_{11} для ММ, от числа метиленовых групп в кислотном остатке субстрата $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$. Значение для *n*-нитрофенилацетата условно принято за единицу. Штриховая прямая соответствует выигрышу в свободной энергии активации $\Delta\Delta F^{\ddagger} = -700$ кал/моль на каждую CH_2 -группу

страта. Поэтому в каждом отдельном случае в качестве условной единицы приняты характеристики реакции, протекающей с участием *n*-нитрофенилацетата. Такая нормировка результатов является, по-видимому, достаточной для сравнения сорбционной способности субстратов (рис. 2). Однако при сравнении кинетических характеристик химической реакции необходимо дополнительно учесть стерическое и индукционное (электронное) влияние боковой группы субстрата на взаимодействие данного эфира с «низкомолекулярным» нуклеофилом. С этой целью на рис. 3 отложены отношения констант скоростей $k_{отн.}$, равные $(k_2/K_S)/k_{11}$, или для мицеллярной реакции k_mK/k_{11} . Величина k_{11} соответствует константе скорости второго порядка следующих процессов: щелочной гидролиз субстратов (14) при рассмотрении ферментативной реакции; гидролиз субстратов под действием 4-этилпиридина в случае ПК (табл. 1); реакция ацилирования субстратами *m*-бромбензальдоксима в отсутствие мицелл для мицеллярного процесса (6).

Из рис. 2 видно, что сорбция субстратов с увеличением алифатической группы становится термодинамически более выгодной для всех трех систем. Штриховая прямая описывает сорбцию алифатической группы на активном центре ХТ или также экстракцию ее органическим растворителем (*n*-октанол) (7). Инкремент свободной энергии, приходящейся на одну CH_2 -группу, составляет в обоих случаях $\Delta\Delta F \approx -700$ кал/моль. В работе (7) было показано, что эта величина представляет, по-видимому, максимальный выигрыш свободной энергии при переносе «жидкой» CH_2 -группы из воды в неводную среду или при сорбции ее на поверхности раздела фаз вода — органический растворитель. Как видно из рис. 2, включение боковой группы субстрата в мицеллу является столь же эффективным. В то

же время, при сорбции субстратов в «активной полости» ПК величина $\Delta\Delta F$ составляет лишь около -250 кал/моль. Это указывает на то, что углеводородные радикалы кислотных остатков субстрата ($n > 1$) при связывании его активным центром ПК в заметной степени сохраняют контакт с водой.

Относительные константы скорости (рис. 3) отражают состояние алифатической группы в активированном комплексе по сравнению с исходным состоянием реакции, когда субстрат растворен в воде. Из данных рис. 3 следует, что выигрыш свободной энергии активации $\Delta\Delta F^*$ (соответствующий переводу субстрата из воды в активированный комплекс реакции) составляет на каждую СН_2 -группу -550 кал/моль для ХТ и -200 кал/моль для мицеллярной реакции. В случае ПК взаимодействие алифатической группы субстрата с активным центром практически не оказывает влияния на валовую константу скорости ацилирования k_2/K_s или даже немного замедляет реакцию ($\Delta\Delta F^* \approx +70$ кал/моль). Видно, что во всех трех случаях образование активированного комплекса реакции сопровождается по сравнению с комплексом Михаэлиса потерей свободной энергии гидрофобного взаимодействия. Не исключено, что это связано с необходимостью перемещения алифатической субстратной группы, находящейся в комплексе с катализатором, в частично гидратированные области. В случае мицеллярной реакции было сделано заключение⁽⁸⁾, что при образовании активированного комплекса реакции алифатическая группа субстрата переносится из жирного (неводного) ядра мицеллы в гидратированный поверхностный (двойной электрический) слой. Как видно из результатов этой работы, такая же тенденция, хотя и слабая, прослеживается и на ферменте. И, наконец, в ПК при превращении комплекса Михаэлиса в N-аницилпроизводное алифатический радикал кислотного остатка ($n > 1$) полностью выходит в водную среду. Последнее подтверждается рассмотрением объемных моделей, иллюстрирующих взаимоотношение субстрата и активного центра ПК при указанных переходах.

На основании приведенных данных (рис. 2 и 3) можно сделать вывод, что все три реакции нуклеофильного замещения протекают с участием активной поверхности, взаимодействующей с боковой группой субстрата. Наблюдаемый при этом эффект катализа является аддитивным — увеличение алифатического радикала вносит на каждую СН_2 -группу постоянный вклад как в эффективность сорбции, так и в химическую реакцию. Анализ количественных различий в инкрементах свободной энергии гидрофобного взаимодействия на разных стадиях каждого процесса позволил прийти к выводу об изменениях в связывании субстрата на активном центре в ходе реакции.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
1 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. В. Березин, К. Мартинек, Журн. Всесоюз. хим. общ. им. Д. И. Менделеева, 16, № 4 (1974). ² И. В. Березин, К. Мартинек, Биохимия, 35, 1242 (1970). ³ Ю. Э. Кирш, С. К. Плужнов и др., Высокомолек. соед., 12A, 188 (1970). ⁴ А. К. Яцмирский, К. Мартинек, И. В. Березин, ДАН, 194, 843 (1970). ⁵ С. К. Плужнов, Ю. Э. Кирш и др., ДАН, 185, 843 (1969). ⁶ А. К. Yatsimirski, К. Martinek, I. V. Berezin, Tetrahedron, in press. ⁷ К. Мартинек, А. В. Левашов, И. В. Березин, Мол. биол., 4, 517 (1970). ⁸ I. V. Berezin, A. V. Levashov, K. Martinek, FEBS — Letters, 7, 20 (1970). ⁹ I. V. Berezin, K. Martinek, FEBS — Letters, 8, 216 (1970). ¹⁰ И. В. Березин, Х. Вилль, К. Мартинек, Мол. биол., 1, 719 (1967). ¹¹ И. В. Березин, Г. Я. Коломийцева и др., Мол. биол., 1, 67 (1967). ¹² Ю. Э. Кирш, В. А. Кабанов, ДАН, 195, 1109 (1970). ¹³ J. V. Milstien, T. H. Fife, Biochemistry, 8, 623 (1969). ¹⁴ O. P. Malhotra, G. Philip, Biochem. Zs., 346, 386 (1966).