

На правах рукописи

**Богданова Лилия Рустемовна**

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗ В  
МИКРОГЕТЕРОГЕННЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ  
АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

03.01.02 - биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань - 2012

Работа выполнена в лаборатории биофизической химии наносистем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН).

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор  
заведующий лабораторией  
КИББ КазНЦ РАН, г. Казань  
Юрий Федорович Зуев

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
ведущий научный сотрудник  
КИББ КазНЦ РАН, г. Казань  
Геннадий Алексеевич Великанов

кандидат химических наук, доцент  
КФУ, г. Казань  
Марат Ахмедович Зиганшин

Ведущая организация: Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, химический  
факультет, г. Москва

Защита состоится 13 ноября 2012 г. в 11<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан 4 октября 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Анастасия Анатольевна Пономарева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Постановка проблемы и ее актуальность.** Большую роль в ферментативных процессах играет расщепление сложноэфирных и пептидных связей, протекающее под действием эстераз и протеаз. Среди эстераз отдельно выделяют группу липаз – водорастворимых ферментов, которые катализируют гидролиз нерастворимых эфиров [Wong, 2002; Brockman, 2004]. Одна из наиболее интересных особенностей липолитических ферментов – уникальные физико-химические условия катализируемых ими реакций. Катализ происходит на поверхности раздела фаз, что существенно осложняет его исследование и в то же время позволяет использовать дополнительные факторы для регуляции активности фермента в микрогетерогенной системе. Стоит отметить, что не только липолиз, но и многие другие ферментативные реакции в живых системах протекают вблизи или на поверхности раздела фаз. *In vivo* ферменты адсорбированы на поверхности биологических мембран, встроены в мембрану или иммобилизованы внутри замкнутых мембранных структур [Martinek *et al.*, 1989; Seddon *et al.*, 2004; Antalis *et al.*, 2011]. Поэтому исследование липолиза включает в себя фундаментальные и практические задачи, связанные с механизмами действия ферментов в микрогетерогенных средах.

Необходимо отметить, что липазы функционируют и в гомогенной среде, однако в данном случае их активность, как правило, невелика. Особенностью липаз, выделяющей их среди других ферментов, работающих на поверхности раздела фаз, является поверхностная активация, т.е. резкое увеличение активности при концентрациях субстрата, превышающих предел его растворимости [Sarda, Desnuelle; 1958]. В системах *in vivo* субстраты липаз, как правило, находятся в составе сложных коллоидных структур. Во многом благодаря этому при моделировании и исследовании липолитических процессов в качестве эффекторов используют разнообразные амфифильные соединения. Характер их воздействия на каталитическую систему определяется целым комплексом свойств молекул поверхностно-активных веществ (ПАВ), таких как структура, заряд головной группы, агрегационные и солюбилизационные свойства. Проблеме функционирования липаз в растворах амфифильных соединений посвящено много исследований. В литературе рассматриваются две модели, с помощью которых делается попытка подвести молекулярную платформу к регуляции активности липаз: ферментативная и субстратная. Первая основана на изменении структуры фермента в области активного центра при взаимодействии с поверхностью жировой капли субстрата. Согласно субстратной модели регуляция липолитической активности осуществляется за счет изменения локальной концентрации субстрата и его доступности активному центру фермента. Обе предложенные модели имеют ряд существенных недостатков, и поэтому не могут с единых позиций объяснить накопленный эмпирический материал. Таким образом, несмотря на наличие достаточно большого количества данных по каталитической активности и строению липаз вопрос о механизмах регуляции их

активности и о влиянии свойств границы раздела фаз на этот процесс до сих пор до конца не изучен. Эта проблема представляет как фундаментальный интерес для понимания механизмов катализа липолитических реакций, так и может иметь важное прикладное значение при регуляции активности липаз в производственных процессах.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось исследование молекулярных механизмов регуляции активности липаз в микрогетерогенных системах на основе амфифильных соединений и поиск взаимосвязи между физико-химическими и каталитическими характеристиками систем.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. С применением комплекса физико-химических методов охарактеризовать агрегационные свойства амфифильных соединений различного строения: классических анионных и катионных поверхностно-активных веществ, геминальных ПАВ, солей желчных кислот с планарным распределением полярных и гидрофобных фрагментов и триблоксополимера.

2. Количественно оценить солюбилизацию субстрата в растворах амфифильных соединений. Проанализировать характер воздействия амфифильных соединений на состояние коллоидной системы, образованной субстратом.

3. Провести анализ спектров триптофановой флуоресценции липазы *Candida rugosa* и установить механизмы влияния рассматриваемых амфифильных соединений на структуру фермента.

4. Исследовать каталитическую активность липазы *Candida rugosa* в микрогетерогенных системах на основе изученных амфифильных соединений. Определить кинетические параметры реакции ферментативного гидролиза п-нитрофениллаурата (ПНФЛ).

5. На основе сопоставительного анализа кинетических параметров реакции ферментативного гидролиза ПНФЛ, а также данных по солюбилизации субстрата и изменению структуры фермента в растворах амфифильных соединений определить факторы регуляции активности липазы *Candida rugosa*.

**Научная новизна работы.** Получены данные о влиянии широкого спектра амфифильных веществ различного строения на структуру и каталитическую активность липазы *Candida rugosa*. Впервые получены количественные параметры, характеризующие солюбилизирующую способность мицеллярных растворов исследованных амфифильных соединений по отношению к субстрату.

Определены кинетические параметры исследуемой реакции в растворах амфифильных соединений. Впервые показана возможность конкурентного ингибирования липазы в растворах исследованных катионных ПАВ. Впервые определены константы скорости и энергии активации элементарных стадий реакции гидролиза п-нитрофениллаурата липазой *Candida rugosa* в растворах дезоксихолата натрия. Показано, что регуляция активности липазы в растворах амфифильных

соединений осуществляется за счет изменения формы организации субстрата и его доступности к активному центру фермента.

**Научно-практическая значимость работы.** Изучение регуляции активности липаз в микрогетерогенных системах имеет большое значение для понимания принципов функционирования ферментов, а также для решения многих прикладных вопросов, связанных с применением ферментативного катализа. Результаты работы могут быть использованы для направленного воздействия на активность фермента, что имеет большое значение для технологий биокатализа.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях биологической, биотехнологической и физико-химической направленности, занимающихся современными проблемами энзимологии, исследованием взаимосвязи структуры и функции биомакромолекул, а также изучением влияния микроокружения на активность ферментов. Представленные материалы могут использоваться в учебном процессе при чтении курсов лекций по биофизике, биохимии и молекулярной биологии.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование.** Исследования проводились в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Межмолекулярные взаимодействия и молекулярная динамика как факторы регуляции функциональной активности белков» (номер госрегистрации №0120.0 803026) и частично поддержаны грантами РФФИ № 05-03-33110-а, № 09-03-00778-а, а также грантом Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология»). Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на международном симпозиуме «Липиды и оксилпипины растений» (Казань, 2008); на IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009); на Российской конференции «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010); на XVII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, 2010); на I Всероссийском симпозиуме по поверхностно-активным веществам «От коллоидных систем к нанохимии» (Казань, 2011); на V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011); на IV Съезде Биофизиков России (Нижний Новгород, 2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи (из них 3 в журналах из списка ВАК; 1 в сборнике) и 7 тезисов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 198 источников, из них 175 зарубежных. В работе представлено 8 таблиц и 45 рисунков.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**1.1. Материалы.** В работе использовали липазу *Candida rugosa* (КФ 3.1.1.3) производства Sigma (США); субстраты - п-нитрофениловые эфиры уксусной, пропионовой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой и пальмитиновой кислот производства MP Biomedicals LLC; амфифильные соединения: додецилсульфат натрия (ДСН), бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ), дезоксихолат натрия (ДХН), хенодезоксихолат натрия (ХДХН), холат натрия (ХН), триблоксополимер Плуороник F-127 и бета-казеин производства Sigma. Дибромид N,N'-бисгексадецил-N,N,N',N'-тетраметил-N,N'-гексилендиаммония (далее Гем) был предоставлен к.х.н. А. Б. Миргородской (ИОФХ им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН).

**1.2. Кинетические измерения.** Кинетические кривые регистрировали на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США) с термостатируемым кюветным отделением. Раствор инкубировали при заданной температуре в течение 10 минут. Реакцию инициировали введением субстрата. Если не указано иное, концентрация фермента в реакционной смеси составляла  $3.5 \times 10^{-8}$  М, концентрация субстрата –  $8 \times 10^{-5}$  М. В экспериментах по определению параметров уравнения Михаэлиса-Ментен концентрацию субстрата варьировали в диапазоне  $(1-8) \times 10^{-5}$  М. За скоростью гидролиза субстрата следили по изменению оптической плотности при 400 нм (поглощение анионной формы п-нитрофенола), определяя тангенс угла наклона касательной к прямолинейному начальному участку кинетической кривой. Максимальную скорость реакции и константу Михаэлиса определяли из зависимостей начальных скоростей реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка.

**1.3. Флуоресценция.** Для регистрации спектров флуоресценции триптофановых остатков в молекуле липазы использовали спектрофлуориметр Флюорат-02-Панорама (ЛЮМЕКС, Россия). Регистрацию проводили в диапазоне 310-400 нм (через 1 нм) при длине волны возбуждения 295 нм. Концентрация белка в образцах составила 0.1 мг/мл ( $1.8 \times 10^{-6}$  М). Перед измерением образцы в кварцевых кюветах (оптический путь 1 см) термостатировали при заданной температуре в течение 10 минут.

**1.4. Динамическое светорассеяние.** Эксперименты по динамическому светорассеянию проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Растворы предварительно отфильтровывали и термостатировали при заданной температуре в течение 10 минут.

**1.5. Микроскопия.** Эксперименты проводились на лазерном конфокальном сканирующем микроскопе LSM-510 Meta (Carl Zeiss, Германия) в световом режиме. Источник света: гелий-неоновый лазер, 543 нм.

**1.6. Определение коэффициентов самодиффузии.** Измерения коэффициентов самодиффузии (КСД) выполнены на спектрометре ЯМР AVANCE III (Bruker, Германия) с датчиком TXI 5мм, оснащенным градиентной катушкой. Для измерения

КСД использована импульсная последовательность “стимулированное эхо” с биполярными градиентами. Измерения КСД проведены на ядрах протонов  $^1\text{H}$  (600.13 МГц). Градиент магнитного поля в экспериментах изменяли в интервале от 0 до 0.5  $\text{Tл}\cdot\text{м}^{-1}$  при постоянном времени диффузии и длительности импульсов градиента магнитного поля.

**1.7. Исследование солюбилизационной емкости мицелл ПАВ.** В качестве зонда использовали п-нитрофениллаурат (ПНФЛ). К растворам ПАВ заданной концентрации объемом 4 мл добавляли 0.005 г ПНФЛ. Растворы выдерживали при 22°C в течение 5 часов при постоянном перемешивании. По истечении указанного времени растворы отфильтровывали для удаления нерастворившегося зонда. Для оценки количества солюбилизованного вещества проводили щелочной (pH=10) гидролиз ПНФЛ с последующим фотометрическим определением концентрации продукта (п-нитрофенол).

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1. Общая характеристика липазы *Candida rugosa*

Согласно данным литературы липазы гидролизуют субстраты со средней и длинной алкильной цепью, хотя многие научные группы используют короткоцепные субстраты, такие как, например, триацетин, п-нитрофенилбутират [Hernandez *et al.*, 2011; Farnet *et al.*, 2010]. Для того, чтобы определить зависимость активности липазы *Candida rugosa* от длины цепи субстрата были проведены эксперименты по ферментативному гидролизу п-нитрофениловых эфиров различных кислот: уксусной (С1, ПНФА), пропионовой (С2, ПНФПр), каприловой (С7, ПНФКл), каприновой (С9, ПНФК), лауриновой (С11, ПНФЛ), миристиновой (С13, ПНФМ) и пальмитиновой (С15, ПНФП), а также определены кинетические параметры этих реакций.

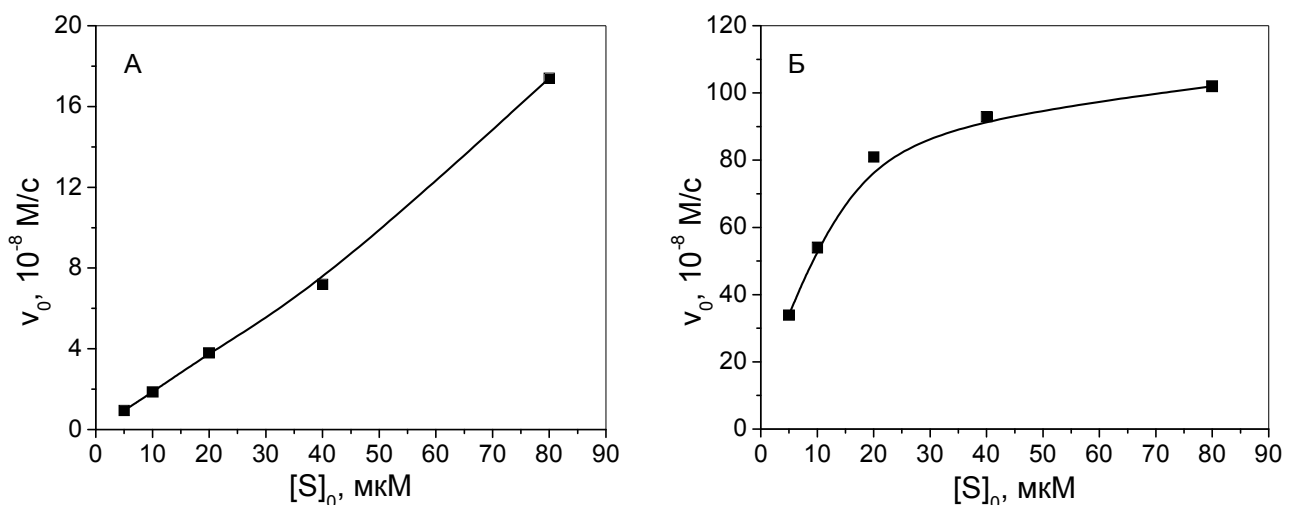


Рис. 1. Концентрационная зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза субстрата: А – ПНФПр, Б – ПНФМ (pH=7.2,  $[E]_0=35 \text{ нМ}$ , 23°C).

Для эфиров с длиной алкильного радикала 7-15 атомов углерода зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата имеет классический вид (кривая с насыщением), а для короткоцепных ПНФА и ПНФПр насыщения в

Таблица 1. Кинетические параметры реакции гидролиза п-нитрофениловых субстратов с разной длиной алкильной цепи (pH=7.2,  $[E]_0=35$  нМ, 23°C)

Субстрат	$n_c$	$V_{MAX},$ $10^{-8}$ М/с	$K_M,$ $10^{-5}$ М	$k_{cat}/K_M$ $10^5$ (с·М) $^{-1}$
ПНФА	1	3	28	0.03
ПНФПр	2	43	24	0.51
ПНФКл	7	78	4	5.57
ПНФК	9	107	1.5	20.38
ПНФЛ	11	144	1.8	22.86
ПНФМ	13	126	1.4	25.71
ПНФП	15	70	3	6.67

исследованном диапазоне концентраций не наблюдалось (рис.1).

Тот факт, что насыщение липазы субстратом со средней длиной цепи достигается при меньших концентрациях, позволяет заключить, что сродство фермента к таким субстратам выше, чем к низкомолекулярным. Об этом также свидетельствуют полученные значения кинетических параметров реакции гидролиза (таблица 1).

Таким образом, липаза *Candida rugosa*, как и большинство липаз [Farnet *et al.*, 2010], предпочтительнее гидролизует

субстраты со средней длиной алкильной цепи, которые, по-видимому, прочнее связываются с ферментом на начальном этапе каталитического процесса за счет множественных гидрофобных взаимодействий.

## 2.2. Влияние температуры на активность липазы *Candida rugosa*

Активность ферментов во многом определяется их конформацией, которая в свою очередь зависит от свойств окружающей среды, таких как концентрация

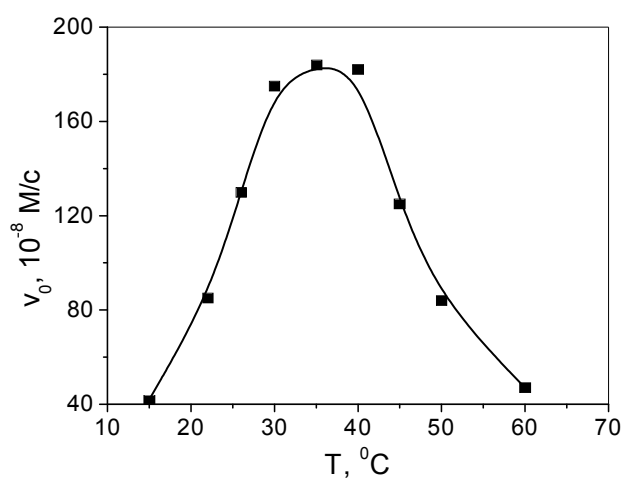


Рис. 2. Температурный профиль активности липазы *Candida rugosa* в реакции гидролиза ПНФЛ (pH=7.2,  $[E]_0=35$  нМ,  $[S]_0=80$  мкМ).

водородных ионов, температура, ионная сила. На рис. 2 представлен температурный профиль активности липазы *Candida rugosa* в реакции гидролиза ПНФЛ. Максимальная активность фермента наблюдается при температуре 35°C. При повышении температуры от 15° до 35°C увеличение скорости реакции достигается за счет классического механизма активации Аррениуса, характерного не только для ферментативных, но и для обычных химических реакций. При температуре



выше 35°C начинается денатурация фермента, т.е. изменение его конформации и ограничение его каталитических способностей.

### 2.3. Агрегационные свойства амфифильных соединений

Строение молекул ПАВ предопределяет особенности образованных ими супрамолекулярных агрегатов. Соединения, используемые в данной работе, можно разделить на 4 группы с учетом особенностей их строения.

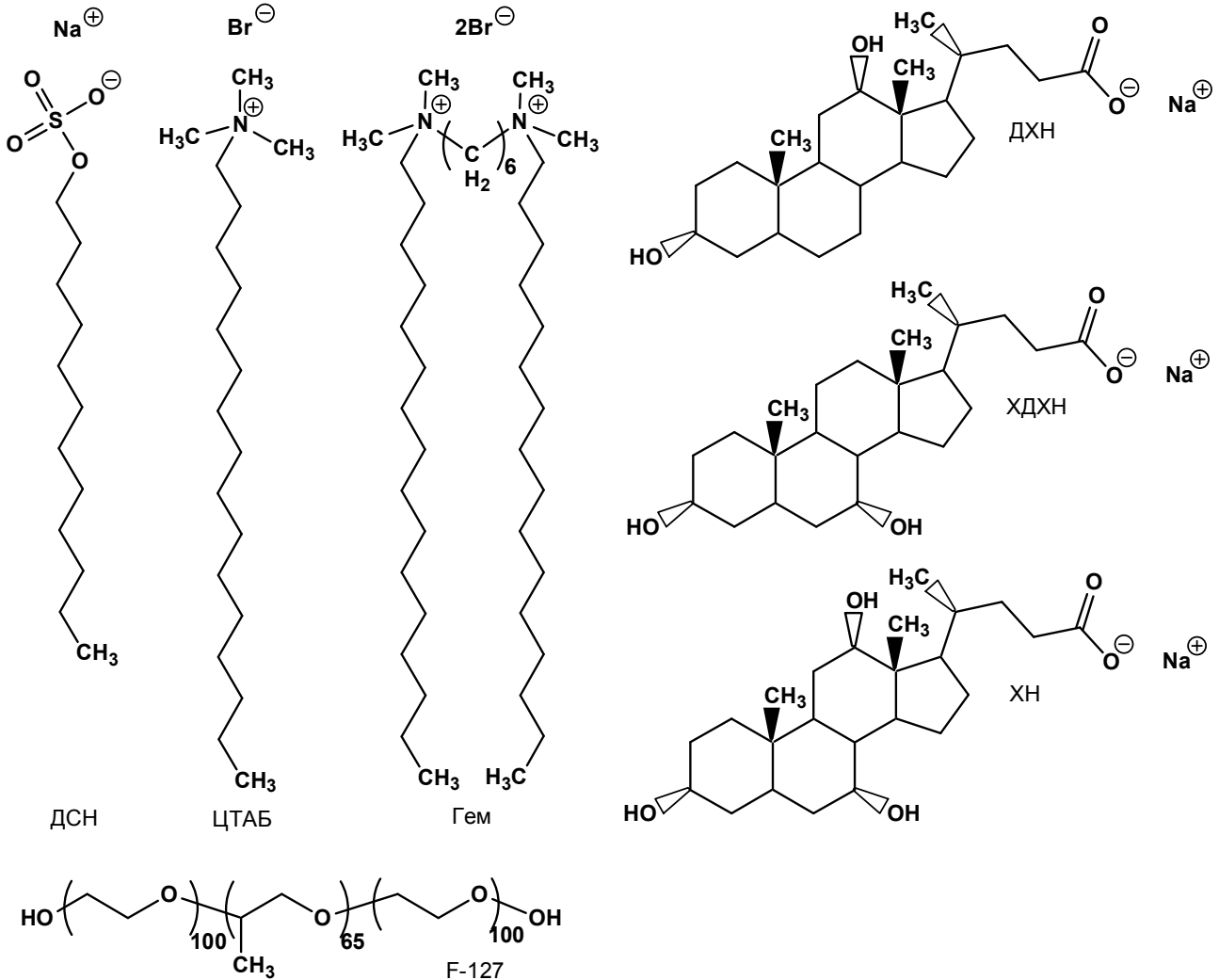


Рис. 3. Структуры амфифильных соединений.

1. Додecilсульфат натрия (ДСН) и бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ) имеют структуру, типичную для классических ПАВ (рис. 3), в которой можно четко выделить полярную головную группу и гидрофобный радикал. Их агрегационное поведение подробно изучено [Smith, 1979; Modaressi *et al.*, 2007; Зуев и др., 2007].

2. Соли желчных кислот (СЖК) характеризуются планарным распределением полярных и гидрофобных фрагментов. Основу этих молекул составляет жесткий стерановый остов с гидрофобными метильными и метиленовыми группами с одной стороны молекулы и полярными гидроксильными и карбоксильными группами с другой (рис. 3).

Таблица 2. Значения ККМ, коэффициентов самодиффузии и радиуса мономеров ( $D_m, R_m$ ) и мицелл ПАВ ( $D_M, R_M$ ) при 20°C

ПАВ	ККМ, мМ	$D_m,$ $10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$	$D_M,$ $10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$	$R_m,$ нм	$R_M,$ нм
ДСН	7.5	4.37	0.41	0.39	4.2
ЦТАБ	0.5	3.33	0.39	0.52	4.4
ДХН	2.8	3.68	*	0.47	*
ХДХН	3.7	3.64	*	0.47	*
ХН	9.7	3.61	*	0.48	*
Гем	0.007	3.30	0.54	0.52	3.2
F-127	представлен в виде мономеров в исследованном диапазоне концентраций (2-1600 мМ)				

\* - переменная величина, зависящая от концентрации ПАВ

зован из блоков двух типов: гидрофильного полиэтиленоксидного фрагмента и гидрофобных полипропиленоксидных.

Представленные в таблице 2 результаты исследования агрегации классических

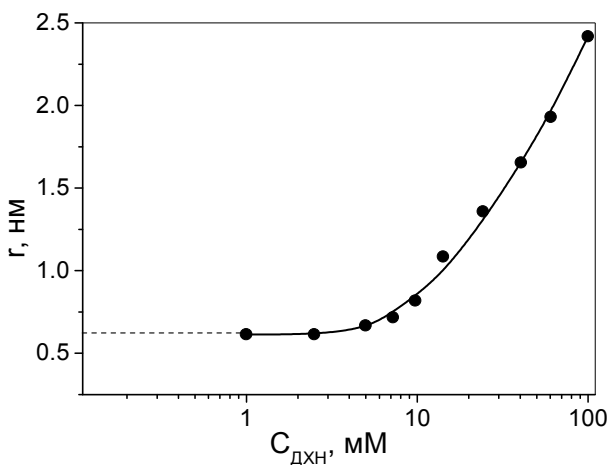


Рис. 4. Зависимость средних размеров мицелл от концентрации ДХН.

ПАВ (ДСН и ЦТАБ) хорошо согласуются с данными, приводимыми в литературе. В отличие от традиционных ПАВ, агрегация СЖК происходит ступенчато. Радиус мицелл СЖК монотонно увеличивается с концентрацией (рис. 4). Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) геминального ПАВ на три порядка ниже его мономерного аналога (ЦТАБ). Триблоксополимер в исследованном диапазоне концентраций при 20°C представлен в виде мономеров.

3. В молекулах геминальных ПАВ (рис. 3) две заряженные головные группы соединены углеводородным фрагментом. В этом случае на мицеллообразование может влиять изменение конформации спейсерного мостика.

4. Триблоксополимер (Плюроник F-127, рис. 3) обра-

## 2.4. Растворимость субстрата в воде и в растворах амфифильных соединений

Использованный субстрат (ПНФЛ) – гидрофобное соединение, трудно растворимое в воде. При концентрациях выше 10 мкМ происходит его самоассоциация с образованием мицеллярных агрегатов [Menger, 1979; Menger, Venkataram, 1986]. Наши данные по динамическому светорассеянию, ЯМР-самодиффузии и микроскопии подтверждают агрегационное состояние субстрата в растворе в рабочем диапазоне концентраций.

Солюбилизацию ПНФЛ растворами ПАВ оценивали при помощи молярной солюбилизационной емкости ( $\chi$ ) и коэффициента распределения вещества между мицеллой и водой ( $P$ ):

$$\chi = \frac{S_{\text{общ}} - S_w}{C_{\text{ПАВ}} - \text{ККМ}} \quad (1),$$

$$P = \frac{S_{\text{общ}} - S_w}{S_w} \quad (2),$$

где  $S_{\text{общ}}$  – общая растворимость солюбилизируемого вещества,  $S_w$  – его растворимость в воде,  $C_{\text{ПАВ}}$  – концентрация ПАВ,  $\text{ККМ}$  – критическая концентрация мицеллообразования.

С точки зрения термодинамики солюбилизация рассматривается как распределение вещества между мицеллярной и водной фазами, и стандартная свободная энергия солюбилизации ( $\Delta G_s^\circ$ ) может быть рассчитана по формуле:

$$\Delta G_s^\circ = -RT \ln P \quad (3),$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура,  $P$  –

коэффициент распределения вещества между мицеллярной и водной фазами.

В таблице 3 представлены результаты солюбилизации ПНФЛ в исследуемых системах. Раствор геминального ПАВ характеризуется самой высокой солюбилизационной емкостью, что, по-видимому, объясняется низким значением ККМ. Высокой солюбилизирующей способностью отличаются ДСН

Таблица 3. Солюбилизация ПНФЛ в водных растворах амфифильных соединений (22°C)

Система	$C_{\text{ПАВ}}$ , М	$S_{\text{общ}}/S_w$	$\chi$	$P$	$\Delta G_s^\circ$ , кДж/моль
вода	0	1			
Гем	0.1	1310	0.026	1309	-17.59
ЦТАБ	0.1	674	0.014	673	-15.96
ДСН	0.1	618	0.013	617	-15.75
ХДХН	0.1	430	0.009	429	-14.86
ДХН	0.1	360	0.007	359	-14.42
ХН	0.1	125	0.003	124	-11.82
F-127	0.1 <sup>[a]</sup>	3.5			
Бета-казеин	$2 \cdot 10^{-5}$	6			

<sup>[a]</sup> из расчета на мономерное звено

и ЦТАБ – ПАВ с классическим строением, сходным со строением гидрофобного субстрата. Вероятно, именно сходство структур ПНФЛ и ПАВ является причиной его высокой растворимости. Алкильные радикалы молекул ДСН и ЦТАБ сохраняют высокую подвижность и гибкость в составе мицелл. Это позволяет вытянутым гидрофобным молекулам ПНФЛ легко встраиваться в ядро мицелл.

В растворах СЖК растворимость ПНФЛ существенно ниже. Этот факт можно объяснить невысокими значениями чисел агрегации СЖК и стерическими препятствиями со стороны жесткого стеранового остова их молекул. В исследованном ряду СЖК растворимость ПНФЛ возрастает по мере увеличения их гидрофобности.

В растворах бета-казеина даже при концентрациях ниже ККМ растворимость субстрата в шесть раз выше, чем в воде. Как для молекул этого белка, так и для его мицелл характерна достаточно «рыхлая» структура, что, по-видимому, является причиной увеличения растворимости субстрата при концентрациях бета-казеина ниже ККМ [Farrel *et al.*, 2006; Horne, 2006]. Поскольку в исследованном диапазоне концентраций триблоксополимер представлен в виде мономеров, в его растворах солюбилизации ПНФЛ не наблюдалось.

Таблица 4. Влияние концентрации ДХН на коэффициент самодиффузии и радиус ассоциатов ПНФЛ

$C_{\text{ДХН}}$ , мМ	$D_{\text{ДХН}}$ , $10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$	$D_{\text{ПНФЛ}}$ , $10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$	$R_{\text{ПНФЛ}}$ , нм
0		0.09	20
0.1	4.29	0.037	48
2.5	4.28	0.06	30
5	4.08	0.23	7.8
7	4.00	0.63	2.9
10	3.24	0.70	2.5
19	2.40	1.50	1.2
30	1.90	1.25	1.4

Метод ЯМР-самодиффузии на примере ДХН позволил проанализировать изменение структуры коллоидной системы, образованной субстратом, при варьировании концентрации ПАВ (таблица 4). Характер изменения радиуса частиц свидетельствует о взаимодействии ПНФЛ с ДХН и образовании смешанных агрегатов. Ниже ККМ молекулы ДХН встраиваются в агрегаты, образованные водонерастворимым субстратом. По достижении ККМ образующиеся мицеллы «растворяют» ПНФЛ за счет его солюбилизации. При высоких концентрациях ДХН размер смешанных агрегатов не отличается от размера мицелл ДХН.

Таким образом, можно заключить, что форма организации микрогетерогенной системы меняется с концентрацией ПАВ. В мицеллярных растворах исследованных соединений происходит концентрирование субстрата вследствие его солюбилизации.

## 2.5. Изменение структуры липазы *Candida rugosa* в растворах амфифильных соединений

При анализе влияния амфифильных веществ на структуру липазы *Candida rugosa*, использовалась модель дискретных классов триптофанов в белках [Abornev, Burstein 1992; Burstein *et al.*, 2001; Reshetnyak, Burstein 2001]. На рисунке 5 представлен суммарный спектр триптофановой флуоресценции 5 остатков триптофана с номерами 119, 161, 188, 221, 489 липазы *Candida rugosa* [Grouchulski *et al.*, 1993] в буферном растворе. Разложение спектра на логнормальные компоненты по известному алгоритму [Burstein *et al.*, 2001], позволяет выделить две компоненты с максимумами 329 и 357 нм. Анализ поверхности, доступной растворителю, выполненный при помощи программы MOLMOL, показал, что аминокислотный остаток Trp188 наиболее экспонирован в растворитель (около 8.8% поверхности остатка доступно для воды). Остатки Trp 119, 161, 221 и 489 находятся в глубине белковой глобулы и их поверхность, доступная растворителю, крайне мала (не более 3.5%). Этот расчет позволил предположить, что длинноволновая компонента с максимумом 357 нм определяется флуоресценцией Trp 188, в то время как коротковолновая (329 нм) – флуоресценцией Trp 161 и Trp 489. Для Trp 119 и Trp 221 существует возможность тушения их флуоресценции за счет взаимодействия с соседними аминокислотными остатками.

В таблице 5 представлены значения максимумов флуоресценции липазы в растворах амфифильных веществ, а также результаты разложения суммарных

Таблица 5. Положение максимумов суммарной флуоресценции ( $\lambda_{\max}(\text{ср})$ ) остатков триптофана липазы *Candida rugosa* и положения максимумов компонент ( $\lambda_{\max}^I$  и  $\lambda_{\max}^{II}$ ) в буфере и в растворах амфифильных веществ ( $C_{\text{ПАВ}} = 1 \text{ мМ}$ ,  $\text{pH}=7.2$ ,  $25^\circ\text{C}$ )

система	$\lambda_{\max}(\text{ср})$ , нм	$\lambda_{\max}^I$ , нм	$\lambda_{\max}^{II}$ , нм
буфер	346.0	328.6	356.6
Гем	336.0	327.0	362.3
ЦТАБ	345.2	331.0	358.6
ДСН	348.2	329.1	359.9
ДХН	349.2	332.6	360.8
ХДХН	345.5	329.0	357.3
ХН	345.2	328.5	357.3
F-127	345.0	329.2	357.0

спектров на компоненты. Влияние исследованных ПАВ на структуру липазы различно. В растворах ЦТАБ, ДХН и ДСН наблюдается красный сдвиг флуорес-

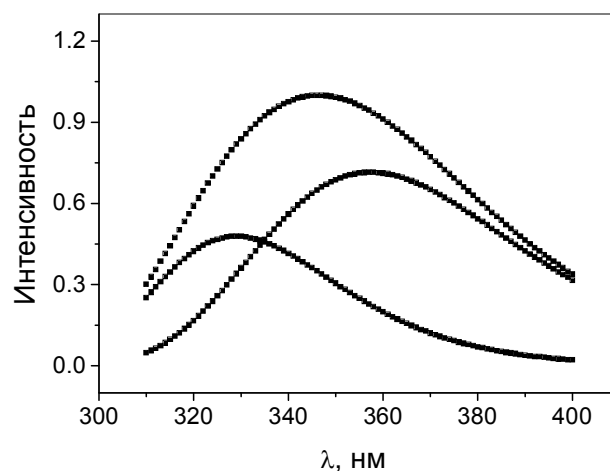


Рис. 5. Спектр флуоресценции липазы *Candida rugosa* в буфере ( $\text{pH}=7.2$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) и результат его разложения на компоненты.

ценции обеих компонент, что позволяет предположить разворачивание белка. Проникновение молекул растворителя вглубь фермента приводит к увеличению полярности микроокружения триптофановых остатков. В растворах ХН и ХДХН, в отличие от раствора ДХН, а также в растворе триблоксополимера не происходит достоверного изменения положения максимума флуоресценции обеих компонент, но наблюдается незначительный голубой сдвиг максимума суммарной флуоресценции, вызванный перераспределением интенсивностей компонент. Самые существенные изменения спектра наблюдаются в растворе Гем: происходит голубой сдвиг максимума суммарной флуоресценции на 10 нм, и красный сдвиг максимума длинноволновой компоненты на 5 нм.

Таким образом, по результатам, представленным в разделах 2.4 и 2.5, можно заключить, что исследованные амфифильные вещества оказывают влияние как на структуру фермента, так и на форму организации субстрата в растворе.

## 2.6. Кинетические параметры реакции ферментативного гидролиза ПНФЛ

Все попытки модифицировать каталитическую систему амфифильными соединениями приводили к снижению активности фермента. В растворах ДСН, ЦТАБ, Гем, бета-казеина и триблоксополимера наблюдалось резкое снижение активности фермента при увеличении концентрации ПАВ. В случае СЖК концентрационная зависимость носила сложный характер, наблюдались минимум и максимум активности, положение которых не менялось с температурой (рис. 6). При 42°C активность липазы в точке максимума на 20% выше по сравнению с буфером, что мы объясняем повышением устойчивости липазы по отношению к тепловой денатурации в растворах ДХН.

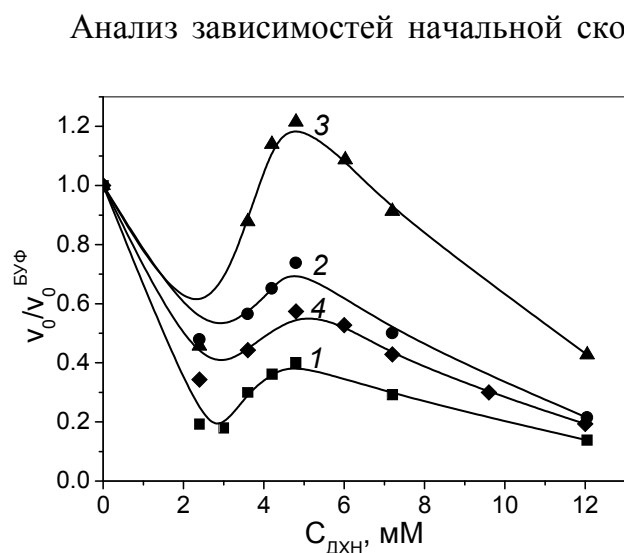


Рис. 6. Концентрационная зависимость активности липазы *Candida rugosa* в растворах ДХН (температура 1 – 30°C, 2 – 37°C, 3 – 42°C, 4 – 48°C).

Анализ зависимостей начальной скорости гидролиза ПНФЛ от концентрации субстрата в рамках уравнения Михаэлиса-Ментен позволил проследить, как изменяются основные кинетические параметры реакции в растворах исследуемых амфифильных веществ (таблица 6). В растворах бета-казеина, триблоксополимера и Гем кинетические параметры уравнения Михаэлиса-Ментен определить не удалось в виду низкой активности фермента, что не позволило варьировать концентрацию субстрата. Существенное снижение активности фермента в растворах катионного ЦТАБ и анионного ДСН и искажение

Таблица 6. Константа Михаэлиса ( $K_M$ ), максимальная скорость ( $V_{MAX}$ ), каталитическая константа ( $k_{cat}$ ) и эффективность катализа ( $s$ ) реакции гидролиза ПНФЛ липазой *Candida rugosa* в растворах амфифильных веществ

Система	$C_{ПАВ}$ , мМ	$K_M$ , μМ	$V_{MAX}$ , $10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{cat}$ , $\text{с}^{-1}$	$s$ , $10^6 (\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$
буфер	0	10	95	27.2	2.7
ДСН	0.03	19	82	23	1.2
	0.3	17	30	8.5	0.5
ЦТАБ	0.03	30	2.4	0.69	0.02
ДХН	2.4	5.6	18	5.1	0.9
	4.8	61	44	12.6	0.2
ХДХН	2.5	1.6	7.2	2.1	1.3
	6	54	22	6.3	0.1
ХН	5	15	53	15.3	1.0
	12	20	71	20.1	1.0

формы кинетических кривых также не позволило достоверно оценить кинетические параметры реакции при концентрациях амфифила выше 0.03 и 0.3 мМ соответственно.

Во всех исследованных системах вне зависимости от особенностей строения амфифила и заряда головной группы наблюдается снижение эффективности катализа ( $s$ ). Поскольку амфифилы оказывают влияние и

на величину максимальной скорости ( $V_{MAX}$ ) и на константу Михаэлиса ( $K_M$ ), ингибирование происходит по смешанному механизму.

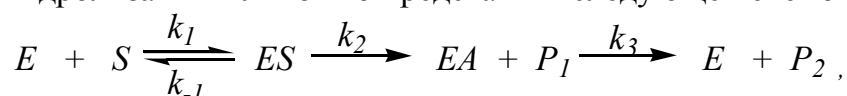
В растворе ЦТАБ наблюдается снижение максимальной скорости реакции почти в 40 раз по сравнению с буфером, что, вероятно, вызвано изменением структуры фермента, затрагивающим активный центр. Сходство структур ЦТАБ и субстрата, а также трехкратное увеличение константы Михаэлиса доказывают конкурентный характер ингибирования. Эффективность катализа в растворе ЦТАБ минимальна, а в растворах Гем вообще не удалось определить кинетические параметры в виду низкой активности фермента. Эти результаты позволяют заключить, что катионные ПАВ оказывают наибольшее ингибирующее действие на каталитический процесс. Этот вывод подтверждается и данными по изменению структуры фермента и солюбилизации субстрата в растворах ЦТАБ. Снижение максимальной скорости реакции, эффективности катализа и увеличение константы Михаэлиса в растворах ДСН не так значительно по сравнению с раствором ЦТАБ той же концентрации. Данные по триптофановой флуоресценции липазы и солюбилизации ПНФЛ в растворах ДСН, как и в случае ЦТАБ, также доказывают смешанный механизм регуляции активности фермента.

Зависимость начальной скорости реакции от концентрации СЖК носит сложный характер (рис. 6). Для выявления причин подобной зависимости кинетические параметры реакции в растворах этих ПАВ определялись в трех точках.

Кинетические параметры нелинейно меняются с концентрацией ПАВ, что усложняет интерпретацию полученных результатов. Для того, чтобы понять молекулярные механизмы действия СЖК на каталитический процесс, недостаточно приведенных характеристик. Поэтому на примере ДХН был проведен анализ изменения констант скорости и энергий активаций элементарных стадий изучаемой реакции с концентрацией амфифила.

## 2.7. Исследование механизма ингибирующего действия СЖК на активность липазы *Candida rugosa*

В рамках теории Михаэлиса-Ментен рассматриваемую реакцию ферментативного гидролиза ПНФЛ можно представить следующей схемой:



где  $E$  - фермент,  $S$  - субстрат,  $ES$  - фермент-субстратный комплекс,  $EA$  - ацилированный фермент,  $P_1$  и  $P_2$  – продукты реакции.

В общем случае параметры уравнения Михаэлиса-Ментен, константу каталитическую ( $k_{cat}$ ), константу Михаэлиса ( $K_M$ ) и эффективность катализа ( $s$ ), можно представить в виде функции констант скоростей индивидуальных стадий реакции [Hedstrom, 2002]:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad (4),$$

$$s = \frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (5).$$

Для определения констант скоростей и энергий активации каждой из элементарных стадий реакции использовалось уравнение температурной зависимости константы скорости реакции в рамках уравнения Аррениуса [Ayala, Di Cera, 2006]:

$$k = k_0 \exp \left[ -\frac{E}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] \quad (6),$$

где  $E$  – энергия активации,  $k_0$  – константа скорости при температуре  $T_0$ ,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура.

Для определения констант скоростей, энергий активации каждой из элементарных стадий реакции и эффективности катализа были проанализированы температурные зависимости константы каталитической ( $k_{cat}$ ) и эффективности катализа ( $s$ ) в рамках уравнения Аррениуса в температурном диапазоне 15 – 48°C (рис. 7, таблица 7) [Ayala, Di Cera, 2006]:

$$\frac{1}{k_{cat}} = \frac{1}{k_{3,0}} \exp \left[ \frac{E_3}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] + \frac{1}{k_{2,0}} \exp \left[ \frac{E_2}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] \quad (7),$$



$$\frac{1}{s} = \frac{k_{-1,0}}{k_{1,0}k_{2,0}} \exp\left[\frac{E_1 + E_2 - E_{-1}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right] + \frac{1}{k_{1,0}} \exp\left[\frac{E_1}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right] \quad (8),$$

где  $E_1$ ,  $E_{-1}$ ,  $E_2$  - энергии активации элементарных стадий,  $k_{i,0}$  – соответствующие константы скорости при температуре  $T_0$ .

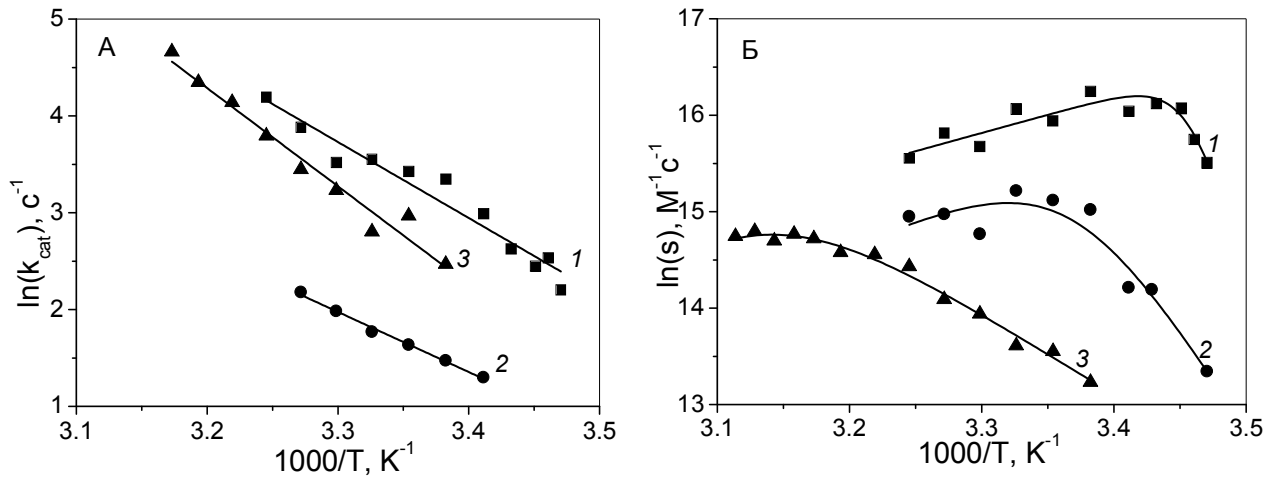


Рис. 7. Температурные зависимости каталитической константы (А) и эффективности катализа (Б) реакции гидролиза ПНФЛ липазой *Candida rugosa* в буферном растворе (1) и растворах ДХН (2 – 2.4мМ, 3 – 4.8мМ) в координатах Аррениуса.

Таблица 7. Константы скорости ( $k$ ), энергии активации ( $E$ ) элементарных стадий реакции и эффективность катализа ( $s$ ) для реакции ферментативного гидролиза ПНФЛ в буфере и в растворах ДХН (для  $25^\circ\text{C}$  при условии  $k_2 \ll k_3$ )

С <sub>ДХН</sub> , мМ	$k_1, 10^6$ $\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_{-1}$ , $\text{c}^{-1}$	$k_2$ , $\text{c}^{-1}$	$E_1$ , $\text{кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$	$E_{-1}$ , $\text{кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$	$E_2$ , $\text{кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$	$s, 10^6$ $\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$
0	2.6	$9.2 \cdot 10^{-2}$	27.2	26.0	372.6	61.1	2.7
2.4	1.5	3.3	5.1	47.7	185.1	51.9	0.9
4.8	7.7	$4.6 \cdot 10^2$	12.6	41.9	41.0	84.6	0.2

Сравнительный анализ данных, представленных в таблице 7, показывает, что ДХН влияет на все элементарные стадии реакции. Эффективность катализа в растворах ДХН существенно ниже, чем в буфере. Как видно из формулы 7 эффективность катализа определяется вкладом всех трех экспериментально определенных констант скорости. Сравнив степень изменения констант  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$  в растворах ДХН, можно заключить, что уменьшение эффективности катализа в большей степени определяется изменением константы скорости диссоциации фермент-субстратного комплекса  $k_{-1}$ . Уменьшение энергии активации этой стадии

может быть вызвано дестабилизацией этого комплекса в растворах ДХН; в результате происходит смещение равновесия обратимой стадии образования фермент-субстратного комплекса в сторону исходных реагентов.

Были рассмотрены два возможных механизма регуляции активности липазы. Первый связан с изменением структуры фермента в растворах амфифильных соединений. Данные триптофановой флуоресценции показывают, что в растворах ДХН происходит частичное разворачивание белка (таблица 5). Однако, очевидно, нельзя связывать наблюдаемые изменения активности липазы только с изменением структуры фермента. В растворах ХДХН и ХН также наблюдается сходный характер ингибирования, но согласно данным триптофановой флуоресценции не происходит разворачивания фермента. Второй механизм регуляции активности связан с изменением условий реакционного контакта субстрата с ферментом в растворах амфифильных соединений. Данные по ЯМР-самодиффузии (таблица 4) и солубилизации субстрата (таблица 3) демонстрируют образование смешанных агрегатов между ДХН и ПНФЛ, что в свою очередь отразится на свойствах поверхности жировых капель и условиях взаимодействия субстрата с ферментом. Основываясь на приведенных исследованиях физико-химических свойств растворов ДХН, его влияния на состояние субстрата и структуру фермента, была предложена следующая модель функционирования липазы в растворах СЖК (рис.8).

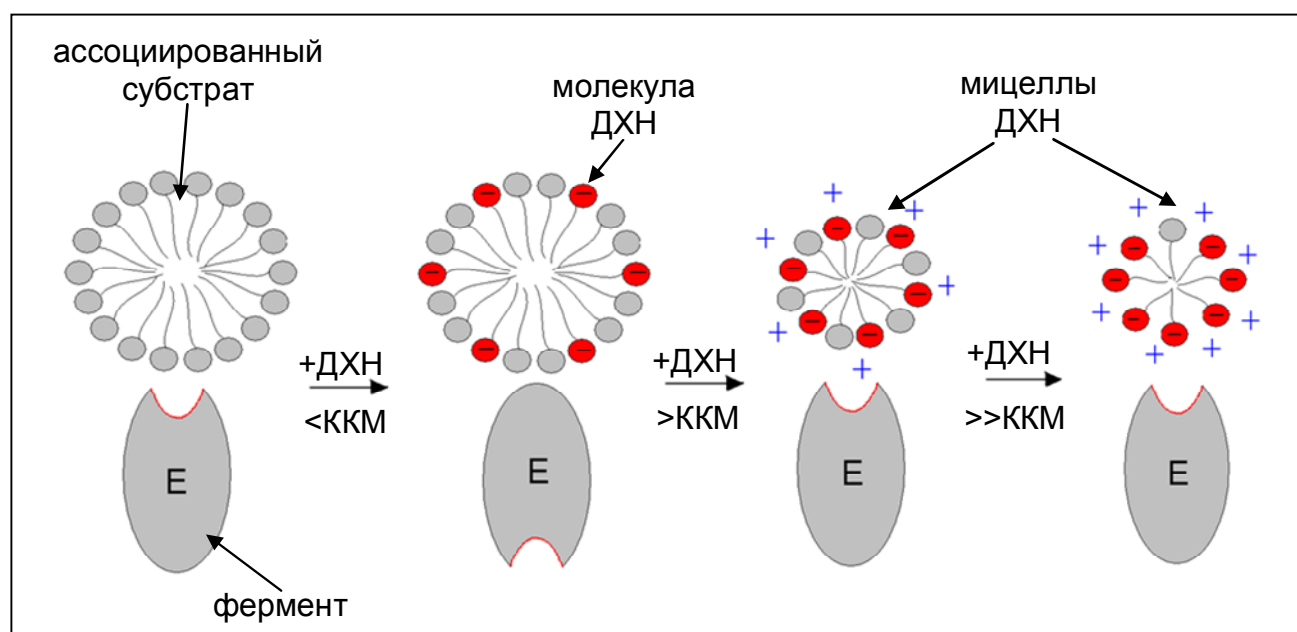


Рис. 8. Модель функционирования липазы *Candida rugosa* в растворах ДХН.

ПНФЛ в водном растворе образует агрегаты. При концентрации ДХН ниже ККМ вследствие высокого сродства к гидрофобной поверхности [Maldonado-Valderrama *et al.*, 2011] его молекулы будут встраиваться в агрегаты, образованные субстратом. Появление анионных молекул на поверхности субстрата препятствует

сорбции липазы (область ее активного центра также несет отрицательный заряд [Cygler, Schrag, 1999]) и образованию фермент-субстратного комплекса, что отражается в уменьшении  $k_1$  и в увеличении  $E_1$  при низких концентрациях ДХН. При концентрациях ДХН выше 2.8 мМ, происходит самоассоциация амфифильных молекул. Мицеллярные растворы СЖК, как было показано ранее, характеризуются достаточно высокой солюбилизационной емкостью по отношению к гидрофобному ПНФЛ. При этом отрицательный заряд головных групп ДХН в мицеллах скомпенсирован противоионами двойного электрического слоя и не препятствует контакту с липазой. Увеличение константы скорости и уменьшение энергии активации образования фермент-субстратного комплекса ( $k_1$ ,  $E_1$ ) при концентрации ДХН 4.8 мМ свидетельствуют об увеличении доступности субстрата для активного центра фермента. Таким образом, можно заключить, что агрегация ДХН способствует локальному концентрированию участников реакции, облегчая образование фермент-субстратного комплекса (мицеллярный каталитический эффект). Однако в целом эффективность катализа остается низкой. Сравнивая энергию активации процессов диссоциации фермент-субстратного комплекса ( $E_{-1}$ ) и процесса ацилирования фермента ( $E_2$ ), можно заключить, что, несмотря на увеличение константы скорости образования фермент-субстратного комплекса в 4.8 мМ растворе ДХН, эффективность катализа и там остается низкой вследствие непродуктивного распада комплекса.

Дальнейшее увеличение концентрации ДХН вызывает снижение начальной скорости реакции вследствие увеличения числа мицеллярных агрегатов и разбавления субстрата. Таким образом, при ферментативном гидролизе ПНФЛ липазой *Candida rugosa* в растворах СЖК уровень активности фермента в первую очередь определяется коллоидным состоянием субстрата и условиями фермент-субстратного взаимодействия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема регуляции активности липаз амфифильными соединениями широко изучается. Наблюдаемые изменения активности фермента традиционно связывают с модификацией его структуры в растворах ПАВ и с изменениями состояния субстрата в растворе.

В данной работе было проведено комплексное исследование влияния различных амфифильных соединений, отличающихся по структуре и заряду головных групп, на участников реакционного процесса: липазу *Candida rugosa* и субстрат. Измерение триптофановой флуоресценции фермента позволило оценить структурные изменения, происходящие с белком в растворах ПАВ. Данные по солюбилизационной емкости мицеллярных растворов, а также результаты ЯМР-самодиффузии

свидетельствуют об изменении характера микрогетерогенной системы, образованной субстратом, в растворах ПАВ. Таким образом, в данной работе было показано, что введение в систему амфифильных соединений оказывает влияние как на структуру фермента, так и на характер коллоидной системы.

Показано, что модификация реакционной среды амфифильными веществами негативно сказывается на активности липазы *Candida rugosa* и эффективности катализа. Анализ кинетических параметров реакции гидролиза, а также определение констант скорости и энергий активации элементарных стадий позволили заключить, что регуляция активности липазы *Candida rugosa* в микрогетерогенных растворах на основе СЖК в первую очередь осуществляется за счет изменения формы организации субстрата в растворе и изменения его доступности к активному центру фермента.

Полученные в нашей работе результаты расширяют современные представления о механизме функционирования липаз, а также открывают новые возможности для регуляции их активности.

## ВЫВОДЫ

1. На основании сопоставительного анализа кинетических параметров реакции ферментативного гидролиза п-нитрофениллаурата, а также данных ЯМР, динамического светорассеяния, флуоресценции и солюбилизации субстрата установлено, что основными факторами регуляции активности липазы *Candida rugosa* в микрогетерогенных системах на основе амфифильных соединений являются изменение структуры фермента и состояния коллоидной системы, образованной субстратом.
2. Установлено, что в мицеллярных растворах амфифильных соединений происходит солюбилизация субстрата и модификация поверхности раздела фаз вследствие образования смешанных агрегатов. Большой солюбилизационной емкостью обладают бромид цетилтриметиламмония, додецилсульфат натрия и геминальный алкиламмонийный ПАВ, строение которых сходно со строением субстрата.
3. Показано, что степень воздействия амфифильных соединений на структуру липазы *Candida rugosa* различна: в растворах бромида цетилтриметиламмония, дезоксихолата натрия, додецилсульфата натрия и геминального алкиламмонийного ПАВ происходит частичное нарушение структуры фермента. В растворах холата натрия, хенодезоксихолата натрия и триблоксополимера конформационные изменения белка минимальны.
4. Установлен конкурентный характер ингибирования липазы *Candida rugosa* в растворах катионных бромида цетилтриметиламмония и геминального алкиламмонийного ПАВ.

5. На основе анализа температурных зависимостей параметров уравнения Михаэлиса-Ментен установлено, что снижение эффективности катализа в растворах дезоксихолата натрия связано с преимущественным влиянием амфифила на обратимую стадию образования фермент-субстратного комплекса.

6. Предложена модель регуляции активности липазы *Candida rugosa* в растворах солей желчных кислот, основанная на мицеллярном каталитическом эффекте – изменении микроокружения субстрата и его доступности активному центру фермента.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Роль поверхностного потенциала в каталитическом действии мицелл катионных поверхностно-активных веществ с гидроксильным фрагментом в головной группе / А.Б. Миргородская, **Л.Р. Богданова**, Л.А. Кудрявцева и др. // Журнал общей химии. – 2008. – Т. 78, № 2. – С.179-186.

2. Мицеллообразование в растворах дезоксихолата натрия / **Л.Р. Богданова**, О.И. Гнездилов, Б.З. Идиятуллин и др. // Коллоидный журнал. – 2012. – Т. 74, № 1. С. 3-9.

3. Мицеллярный каталитический эффект как регулятор активности липаз / **Л.Р. Богданова**, Е.А. Ермакова, Б.З. Идиятуллин и др. // Доклады академии наук. – 2012. – Т. 446, № 4. С. 456-459.

### Работы, опубликованные в материалах конференций

4. **Богданова, Л.Р.** Влияние межфазной поверхности на каталитическую активность липазы *Candida rugosa* / **Л.Р. Богданова**, Ю.Ф. Зуев // Сб. тезисов / Изд. КГУ. – Казань, 2008. – С. 51.

5. **Богданова, Л.Р.** Поверхностная активация липазы *Candida rugosa* в растворах амфифильных соединений / **Л.Р. Богданова**, Б.З. Идиятуллин, Ю.Ф. Зуев // Сб. тезисов / Изд. ФизтехПресс КФТИ КазНЦ РАН. – Казань, 2009. – С. 333.

6. **Богданова, Л.Р.** Влияние дезоксихолата натрия на константы скорости элементарных стадий реакции ферментативного гидролиза п-нитрофенилового эфира лауриновой кислоты / **Л.Р. Богданова**, Е.А. Ермакова, Ю.Ф. Зуев // Сб. тезисов / Изд. КГУ. – Казань, 2010. – С. 15.

7. Идиятуллин Б.З. Агрегация дезоксихолата натрия в водных растворах / Б.З. Идиятуллин, **Л.Р. Богданова** // Сб. тезисов / Изд. КГУ. – Казань, 2010. – С. 24.

8. Агрегационное поведение дезоксихолата натрия / Б.З. Идиятуллин, **Л.Р. Богданова**, Р.Х. Курбанов и др. // Сб. статей / ИФМК УНЦ РАН. – Уфа - Казань - Москва - Йошкар-Ола, 2010. – Ч. 1. – С. 244-247.

9. Агрегационное и солюбилизационное поведение дезоксихолата натрия / **Л.Р. Богданова**, О.И. Гнездилов, Б.З. Идиятуллин и др. // Сб. тезисов / Изд. Печать-Сервис-XXI век. – Казань, 2011. – С. 58.

10. Влияние дезоксихолата натрия на активность липазы *Candida rugosa* / **Л.Р. Богданова**, Б.З. Идиятуллин, Е.А. Ермакова, Ю.Ф. Зуев // Сб. тезисов / Изд. Карельский научный центр РАН. – Петрозаводск, 2011. – С. 361.
11. Ферментативная активность липазы *Candida rugosa* в присутствии мицелл бета-казеина / Н.Л. Захарченко, **Л.Р. Богданова**, Т.А. Коннова, Ю.Ф. Зуев // Сб. тезисов / ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – Нижний Новгород, 2012. – С. 112.