

УДК 577.154

ИССЛЕДОВАНИЕ РАВНОВЕСИЯ РЕАКЦИЙ СИНТЕЗА И ГИДРОЛИЗА КАРБАМИДА В ПРИСУТСТВИИ УРЕАЗЫ*

Т. П. ТЕРЕХИНА и Н. С. РАБОВСКАЯ

*Кафедра химической технологии Химического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Определены K_m , V , pH-оптимум и термостабильность уреазы — фермента, ускоряющего установление равновесия реакций синтеза карбамида из карбоната аммония и гидролиза карбамида. Показано, что уреазы может быть с успехом применена для изучения равновесия этих реакций в условиях умеренных температур и давлений. Определены равновесные концентрации карбамида в системе карбонат аммония — карбамид — вода при 20 и 37° и рассчитаны константы равновесия реакции синтеза карбамида для указанных температур.

Скорость установления равновесия реакций синтеза и гидролиза мочевины в условиях умеренных температур и давлений весьма мала. Именно этим, по-видимому, объясняется тот факт, что до недавнего времени в литературе имелись лишь приблизительные данные о величине равновесных концентраций реагирующих веществ в указанных реакциях при 25° [1]. Эти данные были получены экстраполяцией от равновесных концентраций, определенных для более высоких температур.

В связи с этим нам представлялось целесообразным для непосредственного изучения равновесия указанных реакций при умеренных температурах использовать катализатор, ускоряющий установление равновесия этих процессов. Таким катализатором является уреазы — фермент, широко применяемый в медицине и в аналитической химии для разложения мочевины.

В работе изучены свойства уреазы для выяснения возможных пределов ее использования в качестве катализатора установления равновесия реакций синтеза и гидролиза карбамида. Применение уреазы позволило определить параметры равновесия обратимой реакции гидролиза мочевины в условиях умеренных температур и давлений.

В период подготовки к печати нашего сообщения вышла статья Батлера и Рейтела [2], применивших уреазу для изучения влияния неводных растворителей на равновесные концентрации карбамида в его синтезе из карбоната аммония при 25°. Батлер и Рейтел получили сходные с нашими результаты по величинам равновесных концентраций карбамида, однако расчет соответствующих констант равновесия, приведенный этими авторами без учета гидролиза карбоната аммония, представляется нам некорректным.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кинетику ферментативного гидролиза карбамида изучали с помощью самопишущего pH-ста (Radiometer TTT-Is, Дания) титрованием 0,001 н. HCl, образующегося в процессе гидролиза NH_3 . Для этой цели использовали стеклянный и каломельный

* Работа проводилась в плане исследований процесса получения карбамида, осуществляемых под общим руководством академика С. И. Вольфовича.

электроды в интервале рН от 5,0 до 9,0 для различных опытов. Все эксперименты проводились при температуре $25^{\circ}\pm 0,2^{\circ}$ в 0,1 М КСl в безбуферной среде. Растворы уреазы и карбамида в 0,1 М КСl хранились в холодильнике не более 2 суток.

Типичный эксперимент проводили следующим образом: раствор карбамида определенной концентрации ($0,2\cdot 10^{-2}$ —7 М) в термостатируемой ячейке объемом 5—100 мл выдерживали при перемешивании магнитной мешалкой 3—5 мин, затем в ячейку непосредственно перед добавлением раствора фермента в $1\cdot 10^{-3}$ М фосфатном буфере добавляли 1 мМ дитиотрейтол, 0,5 мМ ЭДТА (рН 7,0) и через 10—20 с начинали запись кривой титрования.

При регистрации начального участка кинетической кривой время эксперимента составляло 2—4 мин.

При изучении влияния температуры, рН, добавок диметилсульфоксида на активность и стабильность фермента скорость гидролиза мочевины определяли с помощью высокочувствительного рН-метра (рН 340), снабженного самопишущим потенциометром (КСР-4) и позволяющего автоматически регистрировать небольшие изменения рН в системе, сопутствующие ферментативной реакции (метод Чанса [3]).

Для этой цели 1 мл раствора уреазы ($2\cdot 10^{-8}$ — $8\cdot 10^{-8}$ М) вводили в термостатируемую ячейку, содержащую 9 мл раствора карбамида с концентрацией $3,2\cdot 10^{-2}$ — $5\cdot 10^{-2}$ М, и через 20—30 с начинали запись кинетической кривой. Реакционную смесь перемешивали магнитной мешалкой.

Определение равновесных степеней превращения карбамида проводили в запаянных ампулах. При заполнении и запаивании ампул газовая фаза сводилась к минимуму, так как наличие ее могло сказаться на значениях равновесных концентраций в растворе.

Типичный эксперимент проводили следующим образом: водные растворы (2 М) карбамида, карбоната аммония, карбамата или их смеси объемом 10 мл заливали в ампулы в присутствии различных количеств уреазы (от 0,015 до 0,50 г). Ампулы запаивали и выдерживали в изотермических условиях до установления равновесия в течение 4—17 суток. После вскрытия ампул их содержимое немедленно выливали в охлажденную концентрированную НСl для инактивации уреазы. Затем кислоту нейтрализовали NH_4OH до рН 6,0. Концентрацию карбамида в реакционной среде определяли спектрофотометрически в виде комплекса карбамида с *n*-диметиламинобензальдегидом по методике, предложенной Ваттом с сотр. [4]. Растворы перед определением оптической плотности центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 8000 об/мин. Оптическую плотность измеряли на автоматическом анализаторе Gemsaeк фирмы «Electro-Nucleonics» при длине волны 420 нм.

В работе использован препарат уреазы Олайнского завода химреактивов с активностью 350—970 ед.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики фермента K_m и V определены методом обработки начальных участков кинетических кривых в координатах Лайнувера — Берка. Средние значения (из шести параллельных экспериментов) были равны: K_m $(3,3\pm 0,3)\cdot 10^{-3}$ М; V $(6,5\pm 0,5)\cdot 10^{-7}$ моль/с, при концентрации уреазы $1,5\cdot 10^{-8}$ М в 0,1 М КСl при 25° .

Для нахождения оптимальных условий использования фермента была исследована зависимость его активности от рН среды в интервале рН 4,5—9,0 (рис. 1), оптимум находится при рН 6,5. Температурная зависимость активности уреазы, исследованная в интервале температур 20—70°, показывает, что активность уреазы увеличивается при повышении температуры и имеет оптимум при 50° (рис. 2).

При кратковременном использовании уреазы наиболее эффективно проводить реакцию при температуре 50°. Однако изучение термостабильности уреазы при температуре 50° и выше (рис. 3) показало, что длительное использование фермента при таких температурах в экспериментах по определению равновесной концентрации нецелесообразно вследствие прогрессирующей денатурации белка; в таких случаях наиболее эффективно использование уреазы при 37°.

Для определения концентрации уреазы, необходимой для установления равновесия в системе карбамид — карбонат аммония — вода, и продолжительности процесса была проведена серия опытов по гидролизу карбамида при комнатной температуре. Равновесие можно считать достигнутым, если выполнены следующие условия: 1) концентрация карбамида не изменяется при дальнейшем увеличении продолжительности опыта; 2) увеличение количества фермента не вызывает измене-

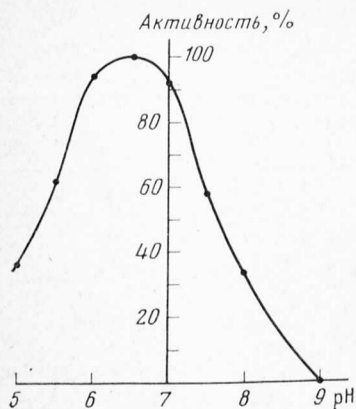


Рис. 1

Рис. 1. Влияние pH на активность уреазы

Условия опыта: 25° ; концентрация субстрата — $5 \cdot 10^{-2}$ М и фермента — $2 \cdot 10^{-3}$ М

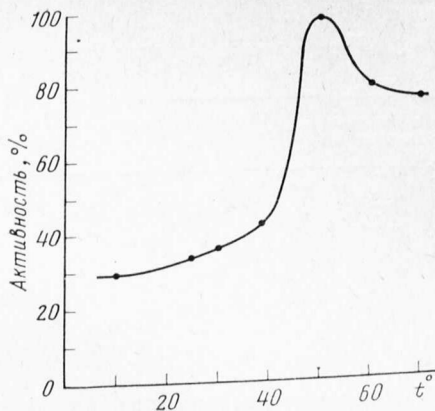


Рис. 2

Рис. 2. Влияние температуры на активность нативной уреазы

Условия опыта: рО 7,0; концентрация фермента — $8 \cdot 10^{-8}$ М, и субстрата — $3,2 \cdot 10^{-2}$ М

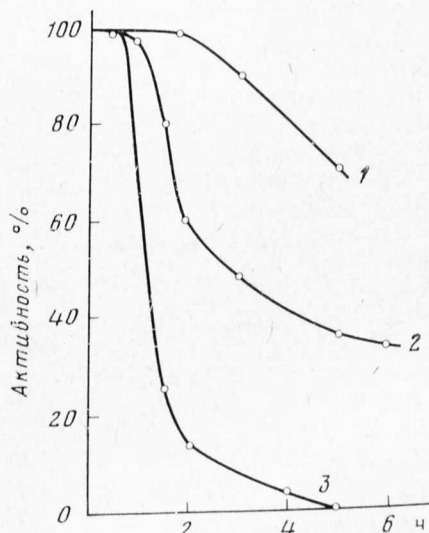


Рис. 3

ния концентрации карбамида; 3) значения полученных концентраций карбамида оказываются близкими независимо от того, проводили ли синтез карбамида из карбоната аммония (или его гидролиз) или использовали в качестве исходных веществ смеси водных растворов карбоната аммония и карбамида; 4) к моменту установления равновесия фермент высоко активен.

Результаты опытов по гидролизу карбамида представлены в табл. 1. Видно, что при концентрации уреазы 30 мг/мл для достижения равновесия достаточно 7 суток. Поэтому все последующие опыты проводили при концентрации 30 мг/мл и продолжительность опытов при 20° составляла не менее 7 суток.

Результаты опытов по определению равновесных концентраций карбамида при использовании двухмолярных растворов исходных веществ (табл. 2) показывают, что при 20° эта концентрация составляет величину порядка 0,32 мМ, что соответствует степени превращения $\eta = 0,016\%$ (η — отношение экспериментально найденной концентрации карбамида к концентрации карбамида, рассчитанной при условии 100%-ного превращения исходных веществ в карбамид).

Таблица 1

Зависимость степени гидролиза карбамида (η) от продолжительности опыта и количества уреазы

Концентрация уреазы, мг/мл	Время, сутки	η , %	Концентрация уреазы, мг/мл	Время, сутки	η , %
1,5	4	39,3	10	11	63,4
1,5	11	45,5	30	4	91,2
10	4	58,4	30	7	99,98
10	7	60,0	30	11	99,97

Таблица 2

Равновесная концентрация карбамида в водных растворах исходных веществ

Исходные вещества, 2 М	t°	Интервалы равновесных концентраций карбамида	$[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$, мм	Количество опытов
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	20	0,27—0,38	$0,32 \pm 0,08$	11
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	20	0,25—0,37	$0,32 \pm 0,08$	19
$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	20	0,25—0,37	$0,32 \pm 0,06$	16
$\text{NH}_2\text{C}(\text{O})\text{ONH}_4$ (карбамат)	20	0,27—0,35	$0,32 \pm 0,06$	7
$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{карбамат}$	20	0,25—0,36	$0,32 \pm 0,10$	7
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{карбамат}$	20	0,28—0,37	$0,32 \pm 0,07$	7
$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{карбамат}$	20	0,27—0,35	$0,32 \pm 0,07$	15
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	37	0,52—0,68	$0,60 \pm 0,13$	8
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	37	0,58—0,66	$0,60 \pm 0,06$	11
$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	37	0,58—0,69	$0,60 \pm 0,07$	12
$\text{NH}_2\text{C}(\text{O})\text{ONH}_4$	37	0,56—0,67	$0,60 \pm 0,10$	6
$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{карбамат}$	37	0,52—0,63	$0,60 \pm 0,07$	10
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	50	0,44—0,65	—	6
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	50	0,47—0,62	—	9
$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	50	0,48—0,66	—	7

Обработка экспериментальных результатов (оценка среднего значения равновесной концентрации мочевины \bar{c} и ее доверительного интервала для одной серии) проводилась с использованием уравнений математической статистики.

При температуре 37° равновесная концентрация карбамида в исследуемой системе увеличивается до 0,60 мм. Повышение температуры до 50° не привело к ожидаемому увеличению концентрации. Это обстоятельство, по-видимому, как уже было отмечено выше, связано с инактивацией уреазы.

Увеличение равновесной концентрации карбамида в указанной системе можно было достичь уменьшением количества воды, находящейся в сфере реакции. Для этой цели часть воды была заменена органическим растворителем, хорошо смешивающимся с водой, растворяющим карбамид и уреазу и не вызывавшим инактивацию фермента. В качестве такого растворителя был использован диметилсульфоксид (ДМСО). Предварительно было исследовано влияние этого растворителя на активность и температурную зависимость уреазы (рис. 4). С увеличением концентрации ДМСО активность уреазы снижается, однако в 30%-ном растворе ДМСО в воде активность фермента оказывается еще достаточно высокой для применения его в качестве катализатора в экспериментах по установлению равновесия.

Константы равновесия и исходные данные для их расчета

t°	[ДМСО], %	$[\text{NH}_4^+]$ *, М	$[\text{CO}_3^{2-}]$ *, М	H_2O , М	$[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$, мм**	K_p
20	5	2,135	0,135	44,0	0,36	1,15
20	10	2,135	0,135	41,6	0,41	1,14
20	20	2,135	0,135	36,9	0,50	1,13
20	—	2,135	0,135	46,4	0,32	1,13
37	—	2,135	0,135	46,4	0,60	2,13

* Концентрации $[\text{NH}_4^+]$ и $[\text{CO}_3^{2-}]$ рассчитаны с учетом гидролиза.

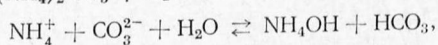
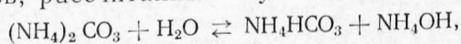
** Приведены экспериментально найденные равновесные концентрации карбамида.

В табл. 3 приведены результаты опытов по синтезу карбамида в присутствии ДМСО. Введение ДМСО увеличивает равновесную концентрацию карбамида.

Определенные нами равновесные концентрации карбамида легли в основу расчета константы равновесия реакции образования карбамида из карбоната аммония при исследованных температурах:

$$K_p^T = \frac{[\text{Карбамид}] \cdot [\text{H}_2\text{O}]^2}{[\text{NH}_4^+]^2 \cdot [\text{CO}_3^{2-}]}$$

[Карбамид] — экспериментально определенная равновесная концентрация карбамида; $[\text{NH}_4^+]$ и $[\text{CO}_3^{2-}]$ — концентрация ионов аммония и карбонатных ионов, рассчитанные с учетом влияния гидролиза:



$$K_{\text{гидр}} = \frac{K_{\text{воды}}}{K_{\text{HCO}_3^-} \cdot K_{\text{NH}_4\text{OH}}} = 11,80.$$

Константа равновесия, рассчитанная по данным табл. 2, для 20° составила величину 1,13, а для 37° — 2,13 (табл. 3 и рис. 5).

В табл. 3 приведены значения так называемых истинных концентраций ионов NH_4^+ , CO_3^{2-} , рассчитанные с учетом гидролиза карбоната аммония, равновесные концентрации карбамида, полученного в присутствии ДМСО и значения K_p^T , рассчитанные по этим данным. Как видно, значения констант равновесия при 20° реакций синтеза карбамида в присутствии ДМСО практически не отличаются от K_p^T , рассчитанной по данным табл. 2.

В работе Льюиса и Берроуза [1] приведены равновесные концентрации карбамида, полученные при 77 , 111 и 132° в реакциях неферментативного гидролиза и синтеза карбамида. Авторы использовали $4,57$ М растворы карбоната аммония, карбамида или их смесей. По данным, полученным ими, нами были проведены расчеты констант равновесия аналогично описанным выше.

На рис. 5 приведена кривая зависимости K_p^T от температуры по нашим экспериментальным данным (для 20 и 37°) и по данным, полученным Льюисом и Берроузом (132 , 111 и 77°) [1].

Интересно отметить, что значения равновесных концентраций карбамида, найденные Батлером и Рейтелом [2], при 25° для $0,75$ М растворов хорошо согласовались с величинами, рассчитанными для 25° по данным, полученным при неферментативном гидролизе Льюисом и Берроузом. Расчет проводился по уравнению Вант — Гоффа:

$$\ln \frac{c_2}{c_1} = k \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2},$$

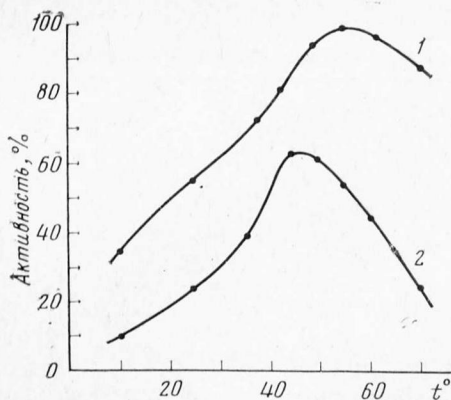


Рис. 4

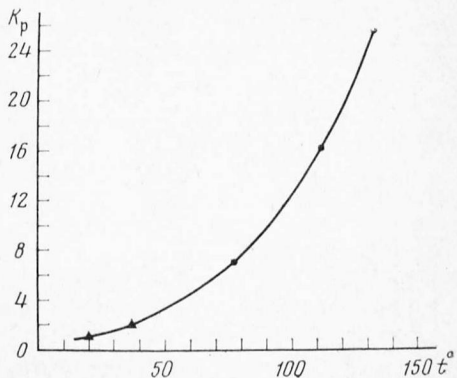


Рис. 5

Рис. 4. Температурная зависимость активности фермента при различных концентрациях ДМСО

Условия опыта те же, что на рис. 2; 1 — 10% ДМСО, 2 — 30% ДМСО

Рис. 5. Зависимость константы равновесия реакции синтеза карбамида из карбоната аммония от температуры

Кружками обозначены значения констант равновесия, рассчитанные по данным работы [1], треугольниками — по нашим экспериментальным данным

где c_1 и c_2 — равновесные концентрации карбамида при температурах T_1 и T_2 соответственно, $k=3300$. Однако значение константы равновесия, приведенное авторами ($5,5 \cdot 10^{-2}$) [2], не соответствует значению, полученному при расчете K_p^T по данным Льюиса и Берроуза. Авторы указанной работы [2] при расчете K_p^T использовали значения концентраций исходных веществ без учета гидролиза карбоната аммония, что, по нашему мнению, было необходимым. Помимо этого они, по-видимому, не учитывали плотность исходного раствора, в связи с чем полученное ими значение K_p^T ($5,5 \cdot 10^{-2}$) отличается от значения K_p^T , полученного нами ($3,14 \cdot 10^{-2}$) без учета гидролиза карбоната аммония, с учетом плотности исходного раствора.

Авторы благодарят И. А. Козлова и Н. Н. Олейникова за обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lewes J., Burrows J. (1912) J. Amer. Chem. Soc. 12, 1515—1529.
2. Butler L. G., Reithel F. J. (1977) Arch. Biochem. and Biophys. 178, 43—50.
3. Ishimura M., Ito T., Chance B. (1962) Biochim. et biophys. acta 52, 177—186.
4. Watt G. W., Chrisp J. D. (1954) Anal. Chem. 26, 452.

Поступила в редакцию
4.IV.1979

STUDY OF EQUILIBRIUM OF THE REACTIONS OF SYNTHESIS AND HYDROLYSIS OF CARBAMIDE IN THE PRESENCE OF UREASE

T. P. TEREKHINA and N. S. RABOVSKAYA

Department of Chemical Technology, M. V. Lomonosov Moscow State University

The values of K_m and V , pH optimum and thermal stability of urease were determined. It was shown that urease can be effectively used for the study of equilibrium of synthesis and hydrolysis of carbamide under conditions of moderate temperatures and pressure. The equilibrium concentrations of carbamide in the ammonium carbonate — carbamide — water system at 20° and 37° were determined. The equilibrium constants for carbamide synthesis at the given temperatures were calculated.