

УДК 577.15.152

## КИНЕТИКА И ТЕРМОДИНАМИКА РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА-СИНТЕЗА АЦЕТИЛ-L-МЕТИОНИНА, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ АЦИЛАЗОЙ I СВИНОЙ ПОЧКИ

**В.-Ю. К. ШВЯДАС, И. Ю. ГАЛАЕВ и И. В. БЕРЕЗИН**

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Изучены кинетика и термодинамика равновесной реакции гидролиза-синтеза ацетил-L-метионина, катализируемой ацилазой I свиной почки. При высоких концентрациях продуктов (ацетатиона и L-метионина) гидролиз ацетил-L-метионина идет не до конца, а до равновесного уровня. Константа равновесия реакции гидролиза, определенная при достижении равновесия как в направлении гидролиза, так и в направлении синтеза, равна  $3,6 \pm 0,4$ . На основании изучения начальных скоростей реакций гидролиза и синтеза предложена кинетическая схема, описывающая зависимость скорости реакции от концентрации компонентов системы. Справедливость предложенной кинетической схемы подтверждается выполнением соотношения Холдена, а также совпадением кинетических параметров, определенных при анализе полных кинетических кривых и при анализе начальных скоростей реакций гидролиза и синтеза ацетил-L-метионина.

В последние годы все большее внимание привлекают ацилазы аминокислот (N-ациламидогидролазы аминокислот КФ 3.5.1.) как возможные катализаторы стереоселективного гидролиза N-ацилированных производных аминокислот — наиболее перспективного пути ферментативного разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы [1]. Несмотря на большое количество литературы, посвященной использованию ацилазы I свиной почки для разделения рацематов аминокислот [2] и физико-химическим свойствам этого фермента [3—9], до сих пор не проводилось изучения кинетики действия этого фермента.

Известно, что в определенных условиях гидролиз пептидной связи обратим [10—13]. Можно ожидать, что при высоких концентрациях продуктов гидролиза N-ациламидной связи также будет идти не до конца, а до установления в системе равновесного уровня. Однако имеющиеся в литературе данные по обратимости гидролиза ацетиламинокислот, катализируемого ацилазой I, носят отрывочный характер и зачастую противоречивы [4, 14—16]. Отсутствие кинетических данных для подобного рода реакций обусловлено в первую очередь тем, что существующие методы слежения за кинетикой гидролиза ациламидной связи либо малочувствительны [17], либо очень трудоемки [18] и непригодны для проведения большого числа измерений, требуемых при кинетическом исследовании. Разработанный нами простой и высокочувствительный метод определения активности ацилаз аминокислот [19] позволил провести исследование кинетики реакции гидролиза ацетил-L-метионина, катализируемой ацилазой I свиной почки.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ацетил-L-метионин был синтезирован по методике [20]. Ацилаза — лиофилизированный препарат фирмы «Reanal» (Венгрия) с активностью 500 ед. в 1 мг (1 ед. соответствует превращению 1 мкмоль ацетил-L-метионина в 1 ч при pH 7,5 и 25°). За реак-

циями гидролиза и синтеза ацетил-L-метионина следили по методу с использованием о-фталевого альдегида [19], при необходимости проводилось более сильное разбавление проб (300—500 раз).

Константа равновесия реакции гидролиза рассчитывалась по формуле

$$K_{\text{равн}} = \frac{[\text{L-Метионин}]_{\text{равн}} [\text{Ацетат}]_0}{[\text{Ацетил-L-метионин}]_0 - [\text{L-Метионин}]_{\text{равн}}} \quad (1)$$

для случая гидролиза ацетил-L-метионина или по формуле

$$K_{\text{равн}} = \frac{[\text{L-Метионин}]_{\text{равн}} [\text{Ацетат}]_0}{[\text{L-Метионин}]_0 - [\text{L-Метионин}]_{\text{равн}}} \quad (2)$$

для случая синтеза ацетил-L-метионина из L-метионина и ацетата натрия, где индексами «0» и «равн» обозначены соответственно соответствующие начальные и равновесные концентрации компонентов системы. Изменением концентрации ацетата натрия в ходе реакции, составляющим не более 2—3%, пренебрегали при расчете констант равновесия.

Константы ионизации ацетил-L-метионина и метилового эфира L-метионина («Sigma», США) определяли титрованием щелочью (0,1—0,05 н. КОН) на титраторе Radiometer TTT-1c (Дания). Все эксперименты выполнены при 25° и pH 7,5. Все расчеты выполнены на компьютере PDP 8/E\*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Равновесие в реакции гидролиза-синтеза ацетил-L-метионина.** Константа равновесия реакции гидролиза ацетил-L-метионина, определенная при достижении равновесия как в направлении гидролиза так и в направлении синтеза, составляет  $3,6 \pm 0,4$  (см. табл. 1). Несомненно,

Таблица 1

Равновесные концентрации компонентов системы  
ацетил-L-метионин + H<sub>2</sub>O ⇌ L-метионин + ацетат-ион и константы равновесия  
реакции гидролиза (K<sub>равн</sub>) при 25° и pH 7,5

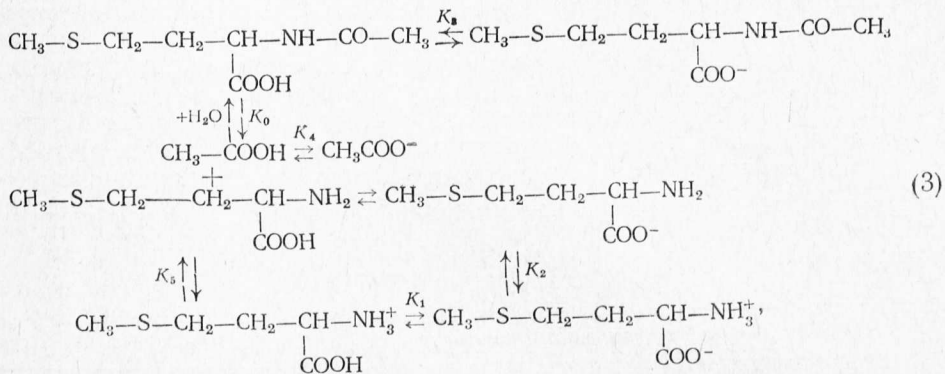
Путь достижения равновесия	Ацетил-L-метионин, М	Ацетат, М	L-Метионин, М	K <sub>равн</sub> , М
Гидролиз	0,021	1	0,079	3,76
	0,036	2	0,064	3,55
	0,044	3	0,056	3,82
	0,049	4	0,051	4,16
	0,049	2	0,031	3,26
	0,056	2	0,094	3,36
Синтез	0,019	1	0,081	4,26
	0,039	2	0,061	3,13
	0,0405	3	0,055	3,67
	0,050	4	0,050	4,00
	0,018	2	0,032	3,55
	0,055	2	0,095	3,45

определенная константа равновесия не является термодинамической константой в строгом смысле слова, поскольку концентрации реагентов в реакционной смеси намного выше, чем в разбавленных растворах, для которых коэффициент активности равен единице и справедливо равенство между активностью и концентрацией. Для определения термодинамической константы равновесия при высоких концентрациях реагентов необходимо использовать уже не концентрации реагирующих веществ, а их активности. Однако отсутствие в литературе данных по коэффициентам активности подобного рода соединений, обусловленное исключительной трудностью и неоднозначностью измерения этих величин, привело к тому, что в настоящее время общепринято использование констант равновесия, рассчитанных по концентрациям реагирующих веществ, в

\* Авторы приносят благодарность И. Л. Борисову за помощь, оказанную при составлении программ обсчета экспериментальных данных.

качестве оценки для истинных термодинамических констант равновесия [10, 11].

Поскольку константа равновесия  $K_0$  в расчете на неионизованные формы не зависит от pH, а весь вклад в pH-зависимость обусловлен ионизацией определенных ионогенных групп [10, 11], то, зная константы ионизации этих ионогенных групп, можно рассчитать зависимость свободной энергии гидролиза  $\Delta G_{\text{гидр}} = -RT \ln K_{\text{равн}}$  от pH. Анализ схемы (3), учитывающей все существующие в данной системе равновесия,



где  $K_1$  и  $K_2$  — константы ионизации карбоксильной и аминогруппы L-метионина,  $K_3$  — константа ионизации карбоксильной группы в ацетил-L-метионине,  $K_4$  — константа ионизации уксусной кислоты,  $K_5$  — константа ионизации аминогруппы в метиловом эфире L-метионина, описывающая ионизацию аминогруппы в L-метионине при незаряженной карбоксильной группе, приводит к выражению (4), описывающему зависимость  $K_{\text{равн}}$  от концентрации водородных ионов в системе

$$K_{\text{равн}} = K_0 \frac{(1 + K_4/[H^+]) (1 + K_1/K_2 + K_1/[H^+] + [H^+]/K_5)}{1 + K_3/[H^+]}. \quad (4)$$

На рис. 1 представлена расчетная рН-зависимость свободной энергии гидролиза  $\Delta G_{\text{гидр}}$  ацетил-L-метионина. Видно, что равновесие реакции сдвинуто максимальным образом в сторону синтеза в области рН 7,0—8,0, т. е. в области рН-оптимума ацилазы I свиной почки. Интересно от-

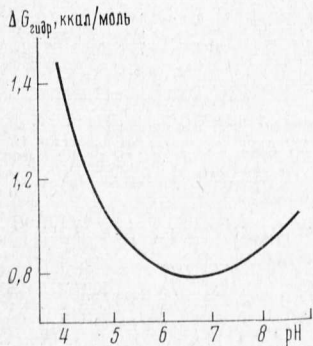


Рис. 1

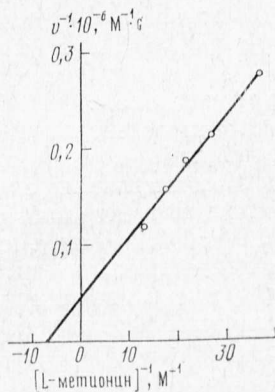


Рис. 2

Рис. 1. рН-зависимость свободной энергии гидролиза ацетил-L-метионина:  $pK_1$  2,3;  $pK_2$  9,2;  $pK_3$  3,8;  $pK_4$  4,75;  $pK_5$  7,4;  $K_0 = 3,7 \cdot 10^{-6}$

Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции синтеза ацетил-L-метионина, катализируемой ацилазой I свиной почки, от концентрации L-метионина (25°, рН 7,5; 2 М ацетат натрия, [E]=1 мг/мл)

метить также, что свободная энергия гидролиза ацетил-L-метионина в расчете на неионизованные формы исходных веществ и продуктов реакции составляет 7,46 ккал/моль (31,26 кДж/моль), т. е. синтез ацетил-L-метионина из неионизованной уксусной кислоты и неионизованного L-метионина является термодинамически выгодным процессом. Тот факт, что в обычных условиях синтез ацетамидной связи практически не наблюдается, обусловлен тем, что как исходные вещества, так и продукты реакции присутствуют в реакционной среде в виде ионов, а концентрация неионизованных форм ничтожно мала. Полученное для ацетил-L-метионина значение  $\Delta G_0$  несколько превышает значения свободной энергии гидролиза в расчете на неионизованные формы, обычно получаемые для пептидной связи [10, 11], и свидетельствуют о том, что синтез ацетамидной связи термодинамически еще более выгоден по сравнению с синтезом пептидной связи. Возможно, отличие значения  $\Delta G_{\text{гидр}}$  для ацетил-L-метионина от литературных данных по термодинамике гидролиза пептидной связи обусловлено тем, что  $K_{\text{равн}}$  определена при очень высокой ионной силе.

Таблица 2

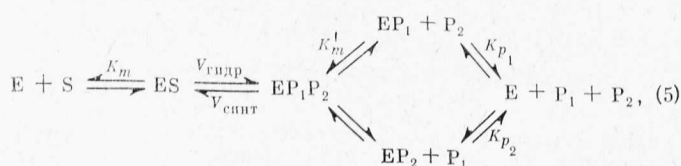
Ингибирование гидролиза ацетил-L-метионина, катализируемого ацилазой I свиной почки, в присутствии ацетата натрия (25°, pH 7,5)

Ацетат натрия, М	$K_m$ , мМ	$V_{\text{гидр}} \cdot 10^5 \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ ([E] = 1 мг/мл)	Ацетат натрия, М	$K_m$ , мМ	$V_{\text{гидр}} \cdot 10^5 \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ ([E] = 1 мг/мл)
0	5 ± 1	16 ± 3	0,1	17 ± 1	15 ± 2
0,025	8 ± 1	17 ± 2	0,15	23 ± 2	14 ± 2
0,05	11 ± 2	17 ± 2			

Кинетика реакции гидролиза-синтеза ацетил-L-метионина, катализируемой ацилазой I, в условиях достижения равновесия. Исследование кинетики синтеза ацетил-L-метионина по начальным скоростям показало, что во всем изученном интервале концентраций ацетата натрия 0,6—4 М (интервал концентраций ограничен, с одной стороны, растворимостью ацетата натрия и, с другой — условиями, в которых протекает в заметной степени реакция синтеза) скорость синтеза не зависит от концентрации ацетата натрия. Полученный результат является вполне закономерным, поскольку константа связывания ацетатона свободным ферментом равна  $43 \pm 5$  мМ (см. табл. 2), и, следовательно, при концентрациях 0,6—4 М практически весь фермент будет находиться в форме комплекса с ацетатионом.

Начальная скорость синтеза ацетил-L-метионина зависит от концентрации L-метионина, причем полученная зависимость имеет михаэлисовский вид. Максимальная скорость синтеза составляет  $(0,21 \pm 0,03) \cdot 10^{-4} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$  при концентрации ацилазы I, равной 1 мг/мл, а константа Михаэлиса  $0,14 \pm 0,03 \text{ М}$  (см. рис. 2).

С учетом данных, полученных при исследовании начальных скоростей гидролиза [19] и синтеза ацетил-L-метионина предложена следующая общая кинетическая схема реакции гидролиза-синтеза, катализируемой ацилазой I:



где  $K_m$  — константа Михаэлиса для гидролиза ацетил-L-метионина;  $V_{\text{синт}}$  и  $V_{\text{гидр}}$  — максимальные скорости ферментативных реакций синтеза и гидролиза соответственно;  $K_{p_1}$  и  $K_{p_2}$  — константы связывания ацетатона и L-метионина свободным ферментом,  $K_m'$  — константа Михаэлиса по L-метионину в реакции синтеза ацетил-L-метионина; S — ацетил-L-метионин,  $P_1$  — ацетатон,  $P_2$  — L-метионин.

Математический анализ схемы (5) приводит к следующему выражению, описывающему изменение концентрации L-метионина от времени в дифференциальной форме:

$$-\frac{d[P_2]}{dt} = \frac{\frac{V_{\text{синт}} [P_1]_0 [P_2]}{K_{p_1} K_m'} - \frac{V_{\text{гидр}} [S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[P_1]_0}{K_{p_1}} + \frac{[P_2]}{K_{p_2}} + \frac{[P_1]_0 [P_2]}{K_{p_1} K_m'}}, \quad (6)$$

легко видеть, что последние два члена знаменателя можно записать в виде

$$[P_2] \left( \frac{1}{K_{p_2}} + \frac{[P_1]_0}{K_{p_1} K_m'} \right). \quad (7)$$

Отсутствие ингибирования L-метионином в концентрациях вплоть до 50 мМ [19] позволяет сделать вывод о том, что константа связывания больше или по крайней мере равна 0,5 М. Тогда величина первого члена в скобке не превышает 2, а величина второго члена больше 100, поскольку величины  $K_{p_1}$  и  $K_m'$ , определенные из анализа начальных скоростей реакций гидролиза и синтеза, составляют 0,043 и 0,14 М соответственно, а величина  $[P_1]_0$  находится в пределах 0,4—4 М. Приведенный расчет показывает, что с точностью до второго порядка можно пренебречь первым слагаемым в скобке в выражении (7) и тогда зависимость (6) принимает вид

$$-\frac{d[P_2]}{dt} = \frac{\frac{V_{\text{синт}} [P_1]_0 [P_2]}{K_{p_1} K_m'} - \frac{V_{\text{гидр}} [S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[P_1]_0}{K_{p_1}} + \frac{[P_1]_0 [P_2]}{K_{p_1} K_m'}}. \quad (8)$$

Подтверждением справедливости полученного уравнения может служить так называемое соотношение Холдена [21], связывающее термодинамические и кинетические параметры равновесной ферментативной реакции. Действительно, при равновесии  $d[P_2]/dt=0$ , тогда

$$\frac{V_{\text{синт}} [P_1]_{\text{равн}} [P_2]_{\text{равн}}}{K_{p_1} K_m'} = \frac{V_{\text{гидр}} [S]_{\text{равн}}}{K_m} \quad (9)$$

или

$$\frac{K_{p_1} K_m' V_{\text{гидр}}}{K_m V_{\text{синт}}} = \frac{[P_1]_{\text{равн}} [P_2]_{\text{равн}}}{[S]_{\text{равн}}} = K_{\text{равн}}. \quad (10)$$

Подставляя численные значения, получим, что левая часть равенства (10) равна 2,0\*, а правая — 3,6. Поскольку левая часть равенства представляет собой соотношение пяти различных величин, каждая из которых определена с ошибкой 10—15%, то ошибка в расчете величины этого соотношения составит 50—70%. Поэтому с учетом экспериментальных

\* Поскольку реакция синтеза протекает в условиях высокой концентрации электролита (ацетата натрия), то для приведения реакции гидролиза к тем же условиям были определены кинетические параметры реакции гидролиза ацетил-L-метионина в присутствии 3 М KCl:  $K_m$   $25 \pm 3$  мМ,  $V_{\text{гидр}}$   $(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$  М·с<sup>-1</sup> при концентрации ацилазы I, равной 1 мг/мл (см. для сравнения [19]).



ошибок можно считать, что для данной системы выполняется соотношение Холдена (10).

Справедливость предложенной схемы ферментативной реакции гидролиза-синтеза ацетил-L-метионина может быть проверена и непосредственно при изучении полных кинетических кривых ферментативной реакции гидролиза или синтеза.

Принтегрировав выражение (8) по  $dt$ , учитывая граничные условия  $[P_2]=[P_2]_0$  при  $t=0$  и  $[P_2]=[P_2]_{\text{равн}}$  при  $t=\infty$ , можно получить неявную зависимость  $[P_2]$  от  $t$ :

$$t = \frac{K_{p1}K'_m}{eV_{\text{синт}}} \left[ d(a - [P_2]) - \left( \frac{bd}{e} + c \right) \ln \frac{e[P_2] - b}{ea - b} \right], \quad (11)$$

где  $a=[P_2]_0$  (или  $[S]_0$  в случае реакции гидролиза);  $b=aK_{\text{равн}}$ ;  $c=1+a/K_m+[P_1]_0/K_{p1}$ ;  $d=[P_1]_0/K_{p1}K'_m+1/K_m$ ;  $e=K_{\text{равн}}+[P_1]_0$ .

Из неявной зависимости (11), задавая значения параметров, можно на ЭВМ рассчитать зависимость  $[P_2]$  от  $t$  и сравнить ее с экспериментальными данными. В качестве оценочных значений параметров уравнения (11) были взяты значения кинетических параметров, определенных по начальным скоростям реакций гидролиза и синтеза ацетил-L-метионина. Варьирование проводили по критерию наименьшей дисперсии. Как оказалось, параметры, наилучшим образом описывающие полные кинетические кривые гидролиза и синтеза, в пределах ошибки равны кинетическим параметрам, определенным по начальным скоростям реакций гидролиза и синтеза (см. табл. 3 и рис. 3).

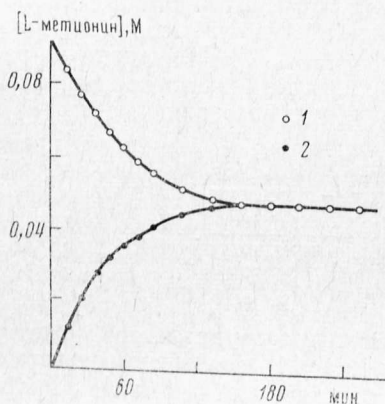


Рис. 3. Полные кинетические кривые реакции гидролиза и синтеза ацетил-L-метионина, катализируемых ацилазой I свиной почки (25°, pH 7,5)

Приведены расчетные кривые, значения кинетических параметров даны в табл. 3; 1 — реакция синтеза ацетил-L-метионина,  $[E]=1$  мг/мл; 2 — реакция гидролиза ацетил-L-метионина,  $[E]=0,15$  мг/мл

Хорошее описание полных кинетических кривых в рамках предложенной схемы ферментативной реакции гидролиза-синтеза ацетил-L-метионина, катализируемой ацилазой I свиной почки, с помощью кинетических параметров, определенных при анализе начальных скоростей реакций синтеза и гидролиза, позволяет сделать вывод о справедливости предложенной схемы для исследованной реакции.

Таблица 3  
Кинетические параметры реакции гидролиза и синтеза ацетил-L-метионина, катализируемой ацилазой I свиной почки (25°, pH 7,5)

Путь реакции	Способ оценки	$V_{\text{синт}} \cdot 10^5$ , М · с <sup>-1</sup>	$V_{\text{гидр}} \cdot 10^5$ , М · с <sup>-1</sup>	$K_m$ , мМ	$K_{p1}$ , мМ	$K'_m$ , мМ
Гидролиз	Начальные скорости		17 ± 2	25 ± 3	43 ± 5	
	Полные кривые	2,0 ± 0,6	14 ± 3	30 ± 10	50 ± 10	140 ± 20
Синтез	Начальные скорости	2,1 ± 0,3				140 ± 20
	Полные кривые	1,7 ± 0,2	24 ± 6	30 ± 10	50 ± 10	150 ± 30

Разработка кинетической схемы, описывающей протекание реакции гидролиза-синтеза в условиях достижения равновесия, позволит при практическом разделении рацематов аминокислот стереоселективным гидролизом их N-ацильных производных оптимизировать такой важный параметр, как время протекания процесса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Африкан Э. К. (1967) Микробиол. синтез, вып. 1, 1—8.
2. Гринштейн Дж., Виниц М. (1965) Химия аминокислот и пептидов, с. 82—97, «Мир», М.
3. Ци Чжэн-у, Орехович В. Н. (1958) Биохимия 23, 772—776.
4. Bruns F. H., Schulze C. (1962) Biochem. Z. 336, 162—181.
5. Kördel W. F., Schneider F. (1976) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 357, 1109—1115.
6. Kördel W., Schneider F. (1976) Biochim. et biophys. acta 445, 446—457.
7. Frey G., Kördel W., Schneider F. (1977) Z. Naturforsch. 32c, 769—776.
8. Kördel W., Schneider F. (1977) Z. Naturforsch. 32c, 337—341.
9. Kördel W., Schneider F. (1977) Z. Naturforsch. 32c, 342—344.
10. Carpenter F. H. (1960) J. Amer. Chem. Soc. 82, 1111—1122.
11. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1977) Биоорг. химия 3, 99—105.
12. Ока Т., Morihara K. (1977) J. Biochem. 82, 1055—1062.
13. Gawron O., Glaid A. J., Boyle R. E., Odstrechel G. (1961) Arch. Biochem. and Biophys. 95, 203—210.
14. Спиричев В. Б., Шукина Л. А. (1958) Ж. общ. химии 28, 1709.
15. Орехович В. Н., Шукина Л. А., Ци Чжэн-у, Спиричев В. Б. (1958) Биохимия 23, 895—898.
16. Спиричев В. Б., Ци Чжэн-у, Орехович В. Н., Шукина Л. А. (1959) Биохимия 24, 667—671.
17. Mitz M. A., Schlueter R. J. (1958) Biochim. et biophys. acta 27, 168—172.
18. Moore S., Stein W. H. (1948) J. Biol. Chem. 176, 367—388.
19. Галаев И. Ю., Швядас В. К., Арен А. К., Березин И. В. (1980) Прикл. биохим. и микробиол. 16, 281—283.
20. Birnbaum S. M., Levintow L., Kingsley R. B., Greenstein J. P. (1952) J. Biol. Chem. 194, 455—470.
21. Корниш-Боуден Э. (1979) Основы ферментативной кинетики, с. 52, «Мир», М.

Поступила в редакцию  
24.XII.1979

#### THE KINETICS AND THERMODYNAMICS OF THE HYDROLYSIS—SYNTHESIS REACTION OF ACETYL-L-METHIONINE CATALYZED BY ACYLASE I FROM HOG KIDNEY

V.-Yu. K. SHVYADAS, I. Yu. GALAEV and I. V. BEREZIN

Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University

The kinetics and thermodynamics of the equilibrium reaction of hydrolysis — synthesis of acetyl-L-methionine catalyzed by acylase I from hog kidney were studied. At high concentrations of the products (acetate ion and L-methionine) the acetyl-L-methionine hydrolysis does not proceed to completion but to the equilibrium position. The equilibrium constant of hydrolysis determined at the attained equilibrium in both directions, i. e. hydrolysis and synthesis, is equal to  $3.6 \pm 0.4$ . Based on the initial rates of hydrolysis and synthesis, a kinetic pattern for the dependence of the reaction rate on concentration of the components of the system is proposed. Evidence for this kinetic pattern is supported by the Holden ratio and the coincidence of the kinetic parameters calculated from the total kinetic curves and the initial rates of hydrolysis and synthesis of acetyl-L-methionine.