

УДК 541.64:547.466

ДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕТИЛРЕЗОРЦИНА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА

© 2011 г. Ю. И. Матвеев, И. Г. Плащина

Учреждение Российской академии наук
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
119991 Москва, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 03.06.2010 г.
Принята в печать 29.11.2010 г.

Нижняя граница ферментативной активности лизоцима связана с температурой плавления жидкого кристалла, образованного петлями опушки и водой, а верхняя граница — с переходом опушки из стеклообразного состояния в клубкообразное. Анализ аминокислотного состава петель опушки позволяет выявить впадину активного центра лизоцима и аминокислотные остатки, ответственные за захват и гидролиз субстрата. Моделирование системы метилрезорцин—петли опушки системой из двух связанных осцилляторов дает основание для описания зависимости активности системы лизоцим—метилрезорцин от их мольного соотношения и по экспериментальным данным позволяет определить параметры модели. Анализ влияния концентрации метилрезорцина на ферментативную активность лизоцима показывает, что она может быть повышена по сравнению с чистым лизоцимом в ограниченных пределах (не более, чем в 3 раза).

ВВЕДЕНИЕ

Ранее в работе [1] на основании калориметрических исследований и оценок, выполненных с помощью метода аддитивных вкладов, была проанализирована работа лизоцима как фермента. Было показано, что основной вклад в ферментативную активность лизоцима вносит опушка, где располагается его активный центр, и воздействие метилрезорцина сводится к изменению амплитудно-частотной характеристики колебания петель опушки. Дальнейшие экспериментальные исследования ферментативной активности системы лизоцим—метилрезорцин A показали, что она зависит от мольного соотношения лизоцима и метилрезорцина R и характеризуется двумя максимумами в области $0 < R < 100$ [2]: при $R = 3$ и 50. Кроме того, исследования температурной зависимости ферментативной активности указанной системы показали [3], что она имеет место в ограниченном диапазоне температур $20 < T < 57^\circ\text{C}$.

По данным калориметрических исследований системы лизоцим—метилрезорцин ниже температуры денатурации ядра глобулы лизоцима будет показано, что нижняя граница ферментативной активности лизоцима связана с температурой плавления жидкого кристалла, образованного петлями опушки и водой, а верхняя граница — с переходом опушки из стеклообразного состояния в неупорядоченное (клубкообразное). Анализ аминокислотного состава петель позволяет вы-

явить впадину (cleft) активного центра лизоцима и аминокислотные остатки, ответственные за захват и гидролиз субстрата. Моделирование системы метилрезорцин—петли опушки системой из двух связанных осцилляторов дает возможность описать зависимость активности системы лизоцим—метилрезорцин от R и по экспериментальным данным [2] определить параметры модели. Из модели следует, что метилрезорцин влияет только на один максимум ферментативной активности.

ОЦЕНКА ТЕМПЕРАТУРНОГО ДИАПАЗОНА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА

Как уже было указано, ферментативная активность лизоцима существует в ограниченном диапазоне температур $20 < T < 57^\circ\text{C}$. Ниже будет показано, что такое ограничение связано с физическим состоянием опушки, и величина этого диапазона может быть оценена расчетным путем.

Определим температуру стеклования опушки лизоцима. Так как степень полимеризации опушки $N = 66$ [1] и она значительно меньше степени полимеризации полимера N_c , равной 359, выше которой он переходит в высокоэластическое состояние, температура стеклования опушки T_g зависит от степени полимеризации. Воспользуемся формулой Фокса—Флори [4], устанавливающей зависимость температуры

E-mail: yu.matveev@mail.ru (Матвеев Юрий Игнатьевич).

стеклования T_g от молекулярной массы полимера M :

$$T_g = T_{g,\infty} - \alpha/M, \quad (1)$$

где $T_{g,\infty}$ – температура стеклования полимера при $M \rightarrow \infty$, α – некоторая постоянная.

Коэффициент α в выражении (1) определим из условия $T_g/T_{dn} = 0.94$ для лизоцима [5]. Тогда из зависимости температуры денатурации лизоцима T_{dn} от N [1]

$$T_{dn} = T_{m,\infty} - 7482/N_{nuc}$$

можно найти зависимость T_g от N :

$$T_g = T_{g,\infty} - 7047/N \quad (2)$$

или, выражая численный коэффициент в уравнении (2) через N_c , получим следующую зависимость T_g от N :

$$T_g = T_{g,\infty} - 19.6N_c/N \quad (3)$$

(в случае лизоцима $T_{g,\infty} = 438$ К).

Вычисленная по формуле (3) температура стеклования опушки $T_g = 331$ К = 58°C, т.е. близка к экспериментально найденной верхней температурной границе активности лизоцима. Это означает, что в рабочем температурном диапазоне фермента опушка находится в стеклообразном состоянии. При $T > T_g$ опушка лизоцима переходит в клубкообразное состояние и он перестает действовать как фермент. Последнее связано с тем, что возрастают амплитуды колебаний петель, и они не могут захватить и удержать молекулы субстрата.

Увеличение температурного диапазона работы фермента и соответственно его активности при повышении температуры среды может быть достигнуто при переходе к ферментам с более высокой степенью полимеризации. Последнее основывается на том, что в растворе яичного лизоцима число аминокислотных остатков, содержащихся в ядре, примерно равно числу аминокислотных остатков в опушке [1]. Полагая, что данное правило распространяется на лизоцимы с более высокой степенью полимеризации, можно сделать вывод, что температура стеклования их опушек будет тоже расти. Следовательно, лизоцимы, полученные из других источников и имеющие более высокую степень полимеризации, будут иметь более высокую верхнюю границу работы фермента. Степень полимеризации лизоцима может быть увеличена также термическим сшиванием молекул яичного лизоцима, как это было сделано в работе [6].

Оценим теперь нижнюю границу работы фермента. Ранее в работе [7] было показано, что при понижении температуры системы полимер–вода последняя переходит в “льдоподобное” состояние при температуре $T_m(0)$ (в градусах Цельсия), определяемой из уравнения

$$T_m(0) = 154(y^2 - 3.43y + 3.083)(y/\gamma - 1), \quad (4)$$

где $y = T_g/T_{mw} = 1.135$ (в качестве T_g взята температура стеклования опушки $T_g = 52^\circ\text{C}$), $\gamma = T_g/T_{mp} = 0.94$ для лизоцима. В нашем случае “льдоподобным” состоянием воды является состояние гидратированной воды в опушке глобулы, перешедшей в упорядоченное состояние под влиянием петель опушки. Из выражения (4) получим $T_m(0) = 15^\circ\text{C}$, которая очень близка к экспериментально найденной нижней температурной границе ферментативной активности лизоцима (20°C [3]). Таким образом, во всем температурном диапазоне исследования ферментативной активности лизоцима его опушка находится в стеклообразном состоянии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ ЛИЗОЦИМА, ЗАХВАТЫВАЮЩИХ МОЛЕКУЛЫ ХИТИНА И РАСЩЕПЛЯЮЩИХ ЕГО ГЛИКОЗИДНЫЕ СВЯЗИ

При описании взаимодействия лизоцима с субстратом обычно ориентируются на данные, приведенные в работе [8], согласно которым при взаимодействии лизоцима со смесью N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты удержание субстрата происходит за счет карбоксильной группы Ala-107, NH-групп Asn-59, Trp-62 и Trp-63, а в реакции гидролиза принимают участие Glu-35 и Asp-52. В случае хитина ситуация немного меняется. Оценка параметров растворимости δ аминокислотных остатков Ala, Asn, Trp с помощью выражения

$$\delta = A_i [RT_g/N_A \sum \Delta V_i]^{0.5},$$

где $A_i = 2.12|\bar{V} - 1|^{-0.6}$, $\bar{V} = V/V_c$, $V_c = 180.8$ см³, $V = N_A \Delta V$, полученного в работе [9], дает такие значения для параметров растворимости аминокислотных остатков: $\delta_{\text{Ala}} = 36$ (МПа)^{0.5}, $\delta_{\text{Asn}} = 22.3$ (МПа)^{0.5}, $\delta_{\text{Trp}} = 20.6$ (МПа)^{0.5}. Число звеньев в опушке лизоцима меньше критической степени полимеризации, а параметры растворимости зависят от температуры стеклования аминокислотных остатков. Поэтому реальные параметры растворимости аминокислотных остатков меньше вычисленных значений в $(T_{g,\infty}/T_g)^{0.5} = 1.15$, т.е. $\delta_{\text{Ala}} = 31.3$ (МПа)^{0.5}, $\delta_{\text{Asn}} = 19.4$ (МПа)^{0.5}, $\delta_{\text{Trp}} = 17.9$ (МПа)^{0.5}.

С помощью программы расчета CHEOPS, version 4.0 (“MillionZillion Software Company”, США) были найдены следующие свойства хитина: температура стеклования $T_g = 557$ К, объем повторяющегося звена $\Delta V = 172$ Å³, параметр растворимости $\delta_n = 30.4$ (МПа)^{0.5} и коэффициент поверхностного натяжения $\gamma = 49$ дин/см. Чтобы захватить и удерживать звенья хитина перечисленными аминокислотными остатками, необходимо выполне-

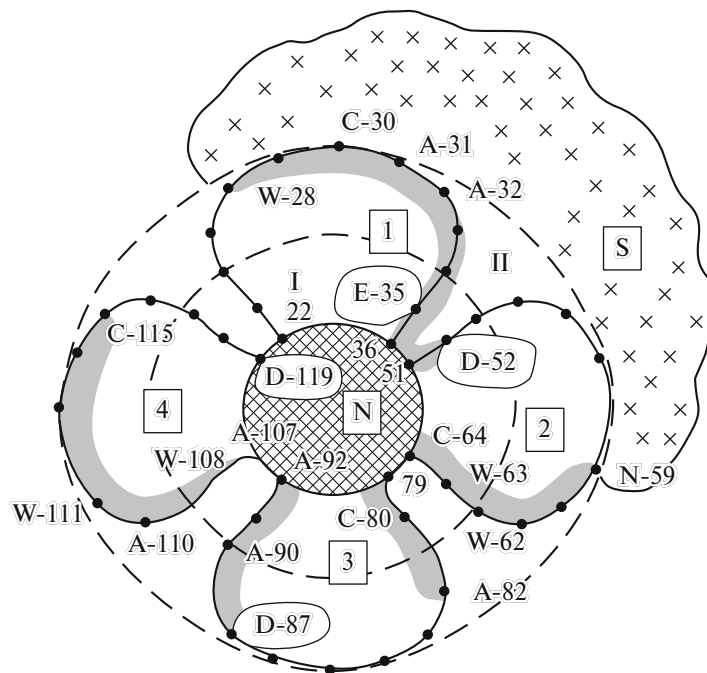


Рис. 1. Плоская модель лизоцима. Заштриховано ядро лизоцима, номера и латинские буквы в квадратах означают номера петель опушки с 1 по 4, N без номера и S – ядро лизоцима и субстрат соответственно, I, II – номера гидратных оболочек (выделены штриховыми окружностями). На рисунке показаны аминокислотные остатки, образующие петли, расположенные вдоль молекулы яичного лизоцима [1], A – аланин, C – цистеин, D – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота, N – аспарагин, W – триптофан.

ние условия совместимости $\delta_n \sim \delta_{ako}$. Этому условию отвечают только Ala и Cys. Таким образом, количество аминокислотных остатков, способных удержать субстрат, определяется природой субстрата.

На рис. 1 представлена плоская модель глобулы лизоцима, состоящая из плотного ядра N и опушки, образованной петлями 1–4. На петлях отмечены аминокислотные остатки, которые принимают участие в захвате хитина (C-30, A-31, A-32, C-64, C-80, A-82, A-90, A-92, A-107, A-110, C-115) и гидролизе гликозидных связей (E-35, D-52, D-87, D-119). Однако, согласно работе [8], в реакции гидролиза участвуют только два аминокислотных остатка – E-35 и D-52. Остальные аминокислотные остатки (D-87, который находится на вершине петли, и D-119, который находится на поверхности ядра) остаются инертными. Последнее связано с тем, что амплитуда колебаний D-87 слишком велика, чтобы стабилизировать структуру переходного состояния, а амплитуда колебаний D-119 слишком мала, чтобы входить в структуру переходного состояния (transition state). Поэтому в ферментативную активность вносят вклад только два аминокислотных остатка – E-35 и D-52, которые находятся друг против друга в первом гидратном слое (I). Та-

ким образом, положение аминокислотных остатков D-87 и D-119 определяют границы изменения ферментативной активности.

Из рис. 1 следует, что все аминокислотные остатки, участвующие в захвате хитина, располагаются на петлях таким образом, что образуют элементы впадины активного центра, напоминающие хоккейные клюшки (ручка около вершины петли, а крюк около поверхности ядра – на рис. 1 выделены серым цветом). На рис. 1 изображена плоская картина глобулы. Тогда, переходя к пространственной структуре опушки, можно при соответствующей ориентации петель получить объемную структуру впадины и определить аминокислотные остатки, находящиеся на ее стенках.

Воздействие метилрезорцина на ферментативную активность лизоцима, как видно на рис. 1, происходит в основном в первом гидратном слое, поскольку именно туда попадают аминокислотные остатки E-35 и D-52. Но химическое строение E-35 и D-52 таково, что каждый из них может связать максимум четыре молекулы метилрезорцина через водородные связи. Остальные молекулы метилрезорцина (максимум ферментативной активности находится в области $R > 4$) влияют на активность фермента путем пластификации субстрата, находящегося во впадине. Расчеты с помощью программы SNEOPS дают для метилрезорцина $\delta_{mr} = 27.8$ (МПа) $^{0.5}$, $\Delta V_{mr} = 118$ Å 3 , т.е.

$\delta_n \sim \delta_{mr}$. А так как весовая доля метилрезорцина, приходящаяся на часть молекулы субстрата во впадине, больше, чем концентрация метилрезорцина в растворе хитина, пластифицирующий эффект будет сильнее. В данном случае во впадине имеем локальный пластифицирующий эффект. Соответственно упругая связь между хитином и молекулой метилрезорцина ослаблена и зависит еще и от функции пластификации.

Пластификация хитина, находящегося во впадине, приведет к уменьшению его параметра растворимости и к дополнительной фиксации хитина другими аминокислотными остатками – W-62, W-63, W-108. Аминокислотные остатки W-28, N-59 и W-111 на внешней поверхности опушки, соприкасающиеся со слабо пластифицированным хитином, участие в захвате субстрата не принимают из-за большого отличия параметров растворимости. Таким образом, в опушке лизоцима имеются аминокислотные остатки, которые участвуют в дальнем захвате субстрата (у них параметры растворимости близки к параметру растворимости субстрата), и аминокислотные остатки, участвующие в ближнем захвате субстрата (их параметры растворимости близки к параметру растворимости пластифицированного субстрата во впадине).

СИСТЕМА ДВУХ СВЯЗАННЫХ ОСЦИЛЛЯТОРОВ (ASP-52)–МЕТИЛРЕЗОРЦИН

Как было показано в работе [1], аминокислотные остатки Glu-35 и Asp-52, способные атаковать гликозидные связи в субстрате, находятся в опушке лизоцима. Поскольку метилрезорцин является полярным веществом, он образует водородные связи как с петлями опушки, так и с субстратом. Аппроксимируем эту систему двумя связанными осцилляторами (рис. 2), масса одного из которых соответствует массе Glu-35 или массе Asp-52, а другая – массе метилрезорцина, силы упругости между всеми массами определяются водородными связями, причем в рассматриваемом приближении все они одинаковы.

Предложенная модель описывает следующие физические процессы в растворе.

1. До захвата молекулы хитина петля лизоцима, на которой находится один из аминокислотных остатков (Glu-35 или Asp-52), способный расщепить гликозидную связь, совершает свободные колебания вместе с петлей.

2. После захвата и подтягивания клубка хитина аминокислотными остатками лизоцима, рассмотренными в предыдущем разделе, аминокислота Glu-35 (или Asp-52) образует водородные

связи со звеньями хитина, которые влияют на частоту и амплитуду колебаний петли.

3. Избыточное количество метилрезорцина приводит к пластификации хитина, находящегося во впадине фермента. В результате коэффициент упругости между метилрезорцином и хитином будет меняться в зависимости от содержания метилрезорцина в растворе.

Рассмотрим систему уравнений, описывающую модель, представленную на рис. 2:

$$\begin{aligned} M_{mr}\ddot{X}_{mr} + (K_h + K_{hc})X_{mr} - K_h X_n &= 0 \\ M_n\ddot{X}_n + (4K_h + K_n)X_n + \eta\dot{X}_n - K_h X_{mr} &= f_0 e^{i\omega t} \end{aligned} \quad (5)$$

Здесь M_{mr} и M_n – масса метилрезорцина и аминокислотного остатка (Glu-35 или Asp-52), X_{mr} и X_n – амплитуда колебаний метилрезорцина и аминокислотного остатка (Glu-35 или Asp-52) соответственно, K_{hc} – коэффициент упругости водородной связи между метилрезорцином и субстратом, K_h – коэффициент упругости водородной связи между метилрезорцином и аминокислотным остатком, K_n – коэффициент упругости лизоцима, η – вязкость лизоцима. Коэффициент 4 при K_h во втором члене второго уравнения системы (5) означает, что даже в отсутствие метилрезорцина аминокислотный остаток может образовать четыре водородных связи с субстратом в случае чистого лизоцима (это максимальное количество водородных связей, которые могут образовать Glu-35 или Asp-52).

Из уравнения (5) определим амплитуду колебаний аминокислотного остатка X_n :

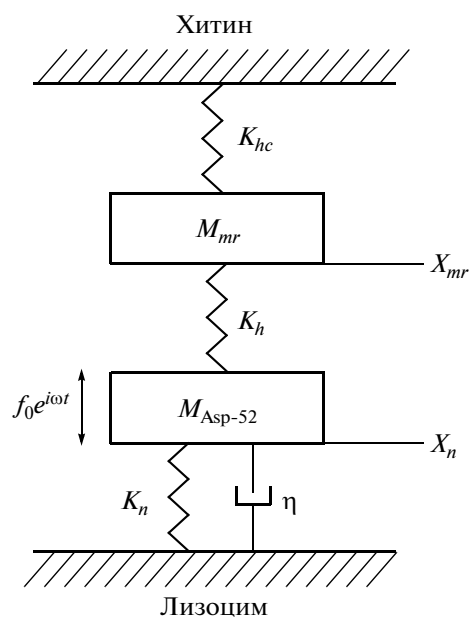


Рис. 2. Динамическая модель воздействия Asp-52 на хитин (субстрат) через метилрезорцин.

$$X_n = \frac{f_o}{-M_n\omega^2 + 4K_h + K_n + i\omega\eta - \frac{K_h^2}{-M_{mr}\omega^2 + K_h + K_{hc}}} \quad (6)$$

При добавлении к раствору лизоцима $n \leq 4$ молекул метилрезорцина число водородных связей возрастет в n раз и соответственно в такое же число раз увеличиваются M_{mr} , K_{hc} и K_h . Но количество водородных связей между пет-

лей опушки и метилрезорцином, а также коэффициент упругости водородной связи останутся такими же, как и в случае чистого лизоцима. Тогда выражение (6) примет следующий вид:

$$X_n = \frac{f_o}{-M_n\omega^2 + 4K_h + K_n + i\omega\eta - \frac{nK_h^2}{-M_{mr}\omega^2 + K_h + K_{hc}}} \quad (7)$$

Переходу к одиночному осциллятору (чистому лизоциму) в выражении (7) соответствует $n = 0$, а X_n заменяется на X_{no} .

Определим резонансные частоты рассматриваемой колебательной системы. Для простоты вычисления выполним при $\eta = 0$. Резонансные частоты ω_1 и ω_2 могут быть найдены из уравнения $(-M_n\omega^2 + 4K_h + K_n)(-M_{mr}\omega^2 + K_h + K_{hc}) - nK_h^2 = 0$, и они равны

$$\omega_{1,2}^2 = A_1 \pm A_2 \left(1 + n \frac{K_h^2}{M_n M_{mr} A_2^2} \right)^{0.5} \quad (8)$$

Здесь $A_1 = \frac{\omega_o^2 + \omega_{mr}^2}{2}$, $A_2 = \frac{\omega_o^2 - \omega_{mr}^2}{2}$, $\omega_o^2 = \frac{4K_h + K_n}{M_n}$,

$$\omega_{mr}^2 = \frac{K_h + K_{hc}}{M_{mr}}.$$

Оценим ω_1 и ω_2 при следующих допущениях: $\frac{M_n}{M_{mr}} \sim 1$, $\frac{K_h}{K_n} \sim 1$, $\frac{K_{hc}}{K_h} \sim 1$. Тогда $A_1 = \frac{7K_n}{2M_n}$, $A_2 = \frac{3K_n}{2M_n}$, а корни уравнения (8) выражаются как

$$\begin{aligned} \omega_1^2 &= \frac{K_n}{2M_n} \left(7 + 3\sqrt{1 + \frac{4}{9}n} \right) \\ \omega_2^2 &= \frac{K_n}{2M_n} \left(7 - 3\sqrt{1 + \frac{4}{9}n} \right) \end{aligned} \quad (9)$$

Полагая, что активность фермента A пропорциональна среднему квадрату амплитуды колебаний аминокислотного остатка $|X_n|^2$, расщепляющего гликозидную связь, оценим относительную активность фермента $\tilde{A} = |X_n|^2 / |X_{no}|^2$, где $|X_n|^2$ – средний квадрат амплитуды колебаний аминокислотного остатка в присутствии метилрезорцина, $|X_{no}|^2$ – средний квадрат амплитуды колебаний аминокислотного остатка чистого лизоцима. Влияние числа аминокислотных остатков, расщепляющих гликозидные связи, на \tilde{A} при нормировании сокращается. Поскольку динамическое

воздействие на фермент обусловлено тепловыми колебаниями молекул растворителя, основной вклад в энергию колебаний рассматриваемой системы (рис. 2) вносят амплитуды колебаний с частотами ω_1 и ω_2 [10]. Тогда при $|X_n|^2 = X_o^2 / (\omega_o \tau_o)^2$, $|X_n|^2 = X_o^2 [\alpha / (\omega_1 \tau_o)^2 + (1 - \alpha) / (\omega_2 \tau_o)^2]$, где $X_o = f_o / K_n$, относительная активность фермента \tilde{A} примет вид

$$\begin{aligned} \tilde{A} &= \alpha \left(\frac{\omega_o}{\omega_1} \right)^2 + (1 - \alpha) \left(\frac{\omega_o}{\omega_2} \right)^2 = \\ &= \alpha \left(0.7 + 0.3 \sqrt{1 + \frac{2}{9}R} \right)^{-1} + (1 - \alpha) \left(0.7 - 0.3 \sqrt{1 + \frac{2}{9}R} \right)^{-1} \end{aligned} \quad (10)$$

Здесь α и $(1 - \alpha)$ – вклад колебаний с частотами ω_1 и ω_2 в ферментативную активность, $n = R/2$. Значения α можно найти из экспериментальных данных при $n \leq 4$ или $R \leq 8$.

При $n \geq 4$ метилрезорцин, как было отмечено выше, пластифицирует субстрат. Последнее приводит к тому, что в выражении (9) n становится постоянным ($n = 4$), и влияние метилрезорцина на ферментативную активность происходит через коэффициент упругости K_{hc} , который уменьшается при дальнейшем увеличении содержания метилрезорцина в растворе.

Установим зависимость K_{hc} от содержания метилрезорцина R . Так как при пластификации хитина наблюдается ослабление водородной связи K_h , к которой последовательно присоединяется коэффициент упругости пластифицированного хитина $K_{chi}(R - 8)$,

$$K_{hc}^{-1} = K_h^{-1} + K_{chi}^{-1}(R - 8) \quad (11)$$

Поскольку $K_{chi}(R - 8)$ характеризует упругость опушки хитина, которая находится в стеклообразном состоянии, она пропорциональна температуре стеклования хитина, и действие пластификатора на коэффициент упругости хитина $(K_{chi})_o$ можно записать как $K_{chi}(R - 8) = (K_{chi})_o PI(R - 8)$,

где $PI(R - 8)$ – функция пластификации хитина метилрезорцином. В общем случае функцию пластификации можно определить по данным работы [11]. В рассматриваемом случае нас интересуют только некоторые оценки. Поэтому учтем только характер зависимости функции пластификации от содержания пластификатора R и запишем ее в виде $PI(R - 8) = 1 - \beta(R/8 - 1)^\xi$ (β и ξ – некоторые константы). Тогда с учетом выражения для функции пластификации найдем K_{hc} из соотношения (11):

$$K_{hc} = K_h (1 - \gamma(R/8 - 1)^\xi)^{-1} \quad (12)$$

($\gamma = \beta K_h / (K_{chi})_o$).

С учетом формулы (12) и принятых ранее допущений для оценки частот ω_1^2 и ω_2^2 уравнение для ω_{mr}^2 примет вид

$$\omega_{mr}^2 = \frac{K_n}{M_n} \left(1 + \frac{1}{1 - \gamma(R/8 - 1)^\xi} \right) \quad (13)$$

Тогда, учитывая формулу (13), выражения для ω_1^2 и ω_2^2 можно записать как

$$\omega_1^2 = \frac{2K_n}{M_n} (1.5 + y + \sqrt{(1 - y)^2 + 1}),$$

R	0	3	6	8	12	25	50	100
$\tilde{A}_{exp}, \%$	100	120	86	–	75	100	108	103
y	–	–	–	–	–0.173	–0.062	–0.036	–0.023
$\tilde{A}_{cal}, \%$	100	92	87	84	85	62	107	96

Наблюдающиеся расхождения между \tilde{A}_{exp} и \tilde{A}_{cal} (рис. 3) обусловлены погрешностью эксперимента и допущениями относительно γ и ξ при $R > 8$. В области $0 < R \leq 50$ погрешность определения \tilde{A} составляет порядка 30%. В дальнейшем нас будет интересовать область $25 < R < 50$, где по предварительным оценкам должен находиться максимум \tilde{A} .

ВЛИЯНИЕ ФЛУКТУАЦИЙ ЧИСЛА МОЛЕКУЛ МЕТИЛРЕЗОРЦИНА ВО ВПАДИНЕ ЛИЗОЦИМА НА ЕГО МАКСИМАЛЬНУЮ ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ

Если вычислить максимальную ферментативную активность лизоцима при соответствующем ей значении R , то она неограниченно возрастает в области очень узких значений R . Однако реально наблюдают значения \tilde{A} , близкие к 200–300%. Последнее обусловлено тем, что в молекулах лизоцима имеют место флуктуации R , связанные с флуктуациями размеров впадин из-за флуктуа-

$$\omega_2^2 = \frac{2K_n}{M_n} (1.5 + y - \sqrt{(1 - y)^2 + 1}),$$

где $4y = (1 - \gamma(R/8 - 1)^\xi)^{-1}$, а относительная активность фермента \tilde{A} равна

$$\tilde{A} = 2.5 \left(\alpha (1.5 + y + \sqrt{(1 - y)^2 + 1})^{-1} + (1 - \alpha) (1.5 + y - \sqrt{(1 - y)^2 + 1})^{-1} \right) \quad (14)$$

Оценим ξ и γ в выражении (14). Пусть \tilde{A} имеет максимальное значение при $R = 32$ (примерно соответствует среднему значению R между положениями максимума и минимума \tilde{A} , полученных экспериментальным путем в работе [2]). Тогда при $\xi = 0.5$ значение $\gamma = 3.46$. Более точное значение ξ и γ можно найти по положению максимума \tilde{A} .

Ниже приведены экспериментальные \tilde{A}_{exp} и расчетные \tilde{A}_{cal} значения относительной ферментативной активности лизоцима \tilde{A} при различных значениях R , рассчитанные по формулам (10) и (12) при $\alpha = 0.998$, $\gamma = 3.46$, $\xi = 0.5$:

ции ориентации петель и толщины опушки. Поэтому ферментативная активность лизоцима имеет конечное значение. Ниже рассмотрим, как меняется выражение (14), если учесть флуктуации R .

Уравнение (14) при $\xi = 0.5$, $\gamma = 3.46$, $\alpha = 0.998$ можно преобразовать к следующему виду:

$$\tilde{A} = 0.866 - 0.0144z^{0.5} (1 - 0.577z^{0.5})^{-1} \quad (15)$$

($z = R/8 - 1$).

Для оценки флуктуаций \tilde{A} и z на ферментативную активность, особенно в точке максимума, преобразуем уравнение (15) и запишем его как

$$[69.4(\tilde{A} - 0.866)(1 - z/3) + 0.577]^2 = z$$

Пусть $\tilde{A} = \langle \tilde{A} \rangle + \delta \tilde{A}$, $z = \langle z \rangle + \delta z$, где $\langle \tilde{A} \rangle$ и $\langle z \rangle$ – средние значения \tilde{A} и z соответственно, $\delta \tilde{A}$ и δz – флуктуации \tilde{A} и z , относительно которых будем полагать, что они подчиняются нормальному закону распределения, т.е. $\langle \delta \tilde{A} \rangle = \langle \delta z \rangle = 0$. То же можно сказать относительно средних от нечетных степеней флуктуаций. Подставляя значения \tilde{A} и z , выраженные через их средние и флуктуации,

в уравнение (15) и усредняя его, получим выражение для средних величин в приближении Лифшица–Розенцвейга [12]:

$$4(1 - \langle z \rangle / 3)^2 W^2 + \langle \delta z^2 \rangle = 4 \langle z \rangle W, \quad (16)$$

в котором $W = (69.4(\langle A \rangle - 0.866))^2$.

При $\langle z \rangle = 3$, где решение уравнения (15) обращалось в бесконечность, с учетом флуктуаций параметр $\langle \tilde{A} \rangle$, как следует из уравнения (16), равен

$$\langle A \rangle = 0.866 \pm 0.0144 \left(\langle \delta z^2 \rangle / 12 \right)^{0.5} \sim 0.866$$

В области $\langle z \rangle = 3 \pm 3\sigma$, где $\sigma = \left(\langle \delta z^2 \rangle \right)^{0.5}$,

$$\langle A \rangle = 0.866 \pm 0.0176 / \sigma^{0.5} \quad (17)$$

Из выражения (17) можно оценить минимальное значение σ . При $\langle A \rangle = 0$ $\sigma = 4 \times 10^{-4}$ или $\left(\langle \delta R^2 \rangle \right)^{0.5} = 3.2 \times 10^{-3}$. Знаку плюс в выражении

соответствует значение $\tilde{A} = 1.732$. С учетом погрешности измерений $1.432 < \tilde{A}_{max} < 2.032$. В области $\langle z \rangle < 3 \pm 3\sigma$ или $\langle z \rangle > 3 \pm 3\sigma$

$$\tilde{A} = 0.866 - \frac{0.0144 z^{0.5} (1 - (\langle z \rangle - 3)^2 \langle \delta z^2 \rangle / (3 \langle z \rangle)^2)^{-1}}{1 - 0.577 z^{0.5}}$$

Однако, учитывая сделанные выше оценки средних квадратов флуктуаций, их вкладом в рассматриваемой области можно пренебречь. Поэтому в области $\langle z \rangle < 3 - 3\sigma$ или $\langle z \rangle > 3 + 3\sigma$ значения \tilde{A} можно определять из выражения (15), заменив их \tilde{A} на $\langle \tilde{A} \rangle$, z на $\langle z \rangle$.

Ниже приведены расчетные значения \tilde{A}_{cal} в области максимума ферментативной активности лизоцима и при различном содержании метилрезорцина R , $\alpha = 0.998$, $\gamma = 3.46$, $\xi = 0.5$.

R	30	31	32	33	40	50	100
$\tilde{A}_{exp}, \%$	—	—	—	—	—	108	103
z	2.75	2.875	3	3.125	4	3.2	11.5
$\tilde{A}_{cal}, \%$	31	—26	84	214	105	87	92

По сравнению с точным выражением (14) имеются расхождения при $R = 33$ (вместо $\tilde{A} = 2.14$ получается $\tilde{A} = 3.29$). Все остальные значения, определяемые по формулам (14) и (15), отличаются друг от друга и от экспериментальных значений в пределах погрешности измерений $\pm 30\%$. Так как в области $30 < R < 40$ измерения не проводили, вычисленные значения максимальной ферментативной активности можно рассматривать как оценочные.

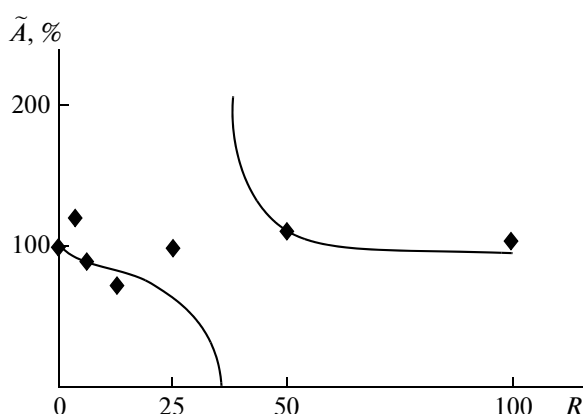


Рис. 3. Влияние метилрезорцина на ферментативную активность лизоцима относительно чистого лизоцима. Кривые — расчетные данные, точки — экспериментальные, взятые из работы [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по данным калориметрии можно определить температурную область работы фермента, а с помощью модели двух связанных осцилляторов рассчитать зависимость активности системы лизоцим–метилрезорцин от их мольного соотношения. Анализ зависимости ферментативной активности от концентрации метилрезорцина показывает, что она может возрасти по сравнению с чистым лизоцимом в ограниченных пределах (не более, чем в 3 раза). Эффективность лизоцима может быть увеличена при повышении температуры раствора, но ее рост ограничен температурой стеклования опушки лизоцима. Однако преимущество воздействия метилрезорцина на активность фермента заключается в том, что он целенаправленно действует на активный центр фермента. Происходит что-то вроде локального разогрева фермента. И несмотря на то, что повышение температуры фермента (от 36 до 55°C) приводит к увеличению активности нативного фермента в 2 раза, а модифицированного метилрезорцином в 1.3 раза [3], т.е. модифицированный фермент слабее реагирует на изменение температуры (он более стабилен к воздействию температуры), общий эффект повышения активности у модифицированного фермента оказывается большим.

Рассмотренные подходы могут быть использованы при анализе влияния степени полимеризации лизоцима на верхнюю границу температур-

ного диапазона работы фермента. В настоящей работе мы имели дело с экспериментальными данными по яичному лизоциму, у которого $N < N_c$. Увеличивая степень полимеризации опухи, как это было сделано в работе [6], можно расширить температурный диапазон работы фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Матвеев Ю.И., Плащина И.Г.* // Высокомолек. соед. А. 2010. Т. 52. № 6. С. 945.
2. *Plashchina I.G., Zhuravleva I.L., Martirosova E.I., Petrovskiy A.S., Loiko N.G., Nikolaev Yu.A., El-Registan G.I.* // Biotechnology in Medicine, Foodstuffs, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology. New York: Nova Sci. Publ., 2010. P. 87.
3. *Петровский А.С., Дерябин Д.Г., Лойко Н.Г., Михайленко Н.А., Кобзева Т.Г., Канаева П.А., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И.* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 2. С. 1.
4. *Fox T.G., Flory P.J.* // J. Appl. Phys. 1950. V. 21. № 6. P. 581.
5. *Матвеев Ю.И.* // Высокомолек. соед. А. 1997. Т. 39. № 4. С. 690.
6. *Lesnierowski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J.* // World's Poultry Sci. J. 2004. V. 60. № 3. P. 303.
7. *Matveev Yu.I.* // Starch: from Polysaccharides to Granules, Simple and Mixture Gels. New York: Nova Sci. Publ., 2004. P. 37.
8. *Фёршт Э.* Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980.
9. *Матвеев Ю.И.* // Высокомолек. соед. А. 2000. Т. 42. № 1. С. 84.
10. *Морз Ф.* Колебания и звук. М.; Л.: Гос. изд-во технико-теорет. лит., 1949.
11. *Matveev Y.I., Grinberg V.Y., Tolstoguzov V.B.* // Food Hydrocolloids. 2000. V. 14. № 5. P. 425.
12. *Лифшиц И.М., Розенцвейг Л.Н.* // Журн. эксперим. и теорет. физики. 1946. Т. 16. № 11. С. 967.