

# ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том IV

## СОЕДИНЕНИЯ

№ 6

1962

### ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТА СОЛЮБИЛИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕПСИНА

*В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, Г. П. Большова*

Явление солюбилизации в относительно разбавленных растворах поверхности-активных веществ можно определить как самопроизвольное растворение соединений, в обычных условиях практически не растворимых в данном растворителе [1]. Раствор поверхности-активного вещества, содержащий постороннее соединение в солюбилизированном состоянии, по своим фазовым характеристикам не отличается от исходного раствора и является термодинамически устойчивым. Впервые эффект солюбилизации наблюдался в водных растворах мыл и затем систематически изучался в ряде работ [1, 2].

Существенно отличаясь по своей химической природе от мыл, белковые вещества тем не менее имеют с мылами общие свойства в связи с некоторой асимметрией строения макромолекул, включающих в себя полярные и неполярные группы,— они обладают поверхностной активностью. Этот факт позволил предположить, что белки должны проявлять солюбилизирующее действие [3].

В наших предыдущих работах [4—6] была изучена солюбилизация бензола и нитробензола в водных растворах фибрillярного белка — желатины и типичного глобулярного белка — яичного альбумина. В данной работе изучалось явление солюбилизации ферментом пепсином, являющимся глобулярным белком и обладающим ярко выраженной биологической активностью — протеолитическим действием.

При этом мы предполагали получить новые сведения о взаимодействии глобулярных белков с молекулами солюбилизата, а также попытаться, хотя бы в общих чертах, выяснить связь между строением белковых молекул и их способностью солюбилизировать малорастворимые вещества и, что самое главное, выяснить влияние эффекта солюбилизации углеводорода на биологическую (протеолитическую) активность пепсина.

#### Объект исследования и методика

Пепсин очищали и кристаллизовали по методике Нортропа [7], усовершенствованной Левдиковой [8]. В качестве солюбилизируемого вещества применяли бензол, очищенный по известной методике [9]. Для приготовления растворов использовали дважды перегнанную воду. Для количественного измерения солюбилизации применяли рефрактометрический метод [10] с рефрактометром типа Пульфриха.

Определение растворимости бензола производили следующим образом. Свежеприготовленные растворы пепсина определенной концентрации (от 0,03% до 5%) и рН среды (от 0,5 до 12) наливали по 10 мл в стеклянные колбочки с притертymi пробками. Измеряли показатели преломления этих растворов, а затем в каждую колбочку прибавляли 0,5—1 мл бензола и после достижения равновесия снова изменили показатели преломления.

#### Результаты и их обсуждение

Прежде всего исследовали кинетику процесса солюбилизации, для того чтобы определить время, необходимое для полного насыщения бензолом раствора пепсина.

В качестве примера на рис. 1 показано изменение показателя преломления 0,88% раствора пепсина при возрастающем количестве бензола. Как видно, насыщение раствора бензолом наступает примерно через 2—2,5 часа. Аналогичные результаты были получены и для других концентраций и pH среды растворов пепсина. Тот факт, что различные избыточные добавки бензола (рис. 1, кривая 4—5) приводят к одному показателю преломления (при прочих равных условиях), свидетельствует о том, что бензол находится в солюбилизированном состоянии и что раствор является термодинамически равновесным.

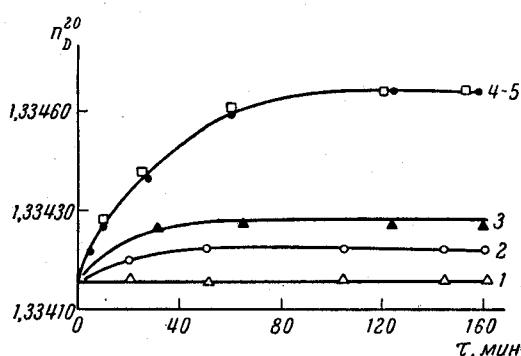


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость  $n_D^{20}$  от времени для растворов пепсина при разных количествах добавленного бензола,  $c=0,88\%$ ;  $pH = 4$ ;  $t=20^\circ$ :

1 — чистый раствор пепсина; 2 — добавлено 0,0114 г бензола; 3 — то же, 0,0228 г; 4 — то же, 0,0798 г; 5 — то же, 0,879 г

Рис. 2. Зависимость растворимости бензола от  $pH$  среды,  $t = 20^\circ$ :

1 — в воде; 2 — то же ( $c = 0,18\%$ ); 3 — в растворе пепсина ( $c = 0,33\%$ )

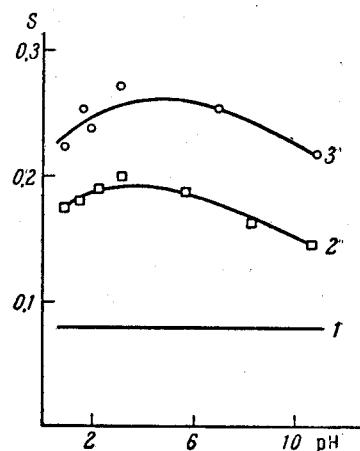


Рис. 2

Далее изучали влияние  $pH$  среды на солюбилизацию бензола в водных растворах пепсина. Различные значения  $pH$  среды создавали добавлением 0,1 или 0,05 н. КОН или HCl и измеряли стеклянным электродом.

Результаты измерений (рис. 2) показывают, что растворимость бензола в водном растворе пепсина увеличивается в 2—2,5 раза, причем величина солюбилизации несколько снижается в крайних значениях  $pH$  в кислой и щелочной областях. Ранее [6] методом оптического вращения и измерения вязкости было установлено, что после солюбилизации бензола яичным альбу-

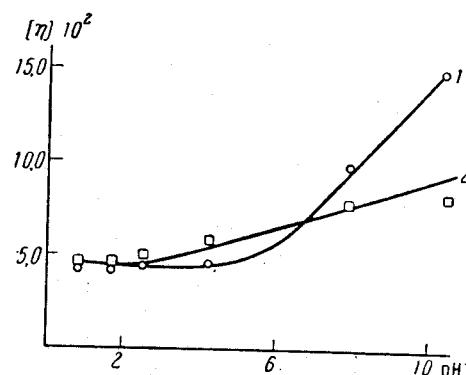


Рис. 3. Зависимость приведенной вязкости раствора пепсина от  $pH$  среды ( $c = 0,33\%$ ,  $t = 20^\circ$ ):

1 — до солюбилизации; 2 — после солюбилизации бензола

мином изменяется конформация его молекул — глобулы становились более компактными.

Используя те же методы, мы хотели выяснить, какие изменения происходят с молекулами пепсина после солюбилизации бензола.

Результаты измерений вязкости разбавленных растворов (0,33%) (рис. 3) показывают, что приведенная вязкость  $[\eta] = ([\eta]_{(c)} - \eta_{(0)})/\eta_{(0)}$ .

$\cdot(1/c)$  мало изменяется в интервале рН от 0,80 до 4,25 для чистого (не солюбилизированного бензола) раствора пепсина. Известно, что при рН выше 6 пепсин денатурирует, что приводит к повышению вязкости, связанному с изменением конформации молекул пепсина в сторону повышения асимметрии их формы.

После солюбилизации бензола в кислой области рН вязкость мало изменилась. При  $pH \geq 6$  приведенная вязкость после солюбилизации

бензола заметно уменьшается. Этот эффект также связан с изменениями в структуре белка, которые качественно можно характеризовать, как переход глобул в более симметричные формы.

В литературе [11] неоднократно указывалось, что оптическое вращение может служить чувствительной характеристикой состояния белковой молекулы. Нами было определено удельное оптическое вращение растворов пепсина до и после солюбилизации. Растворы пепсина меняют величину своего удельного оптического вращения во времени [12], поэтому

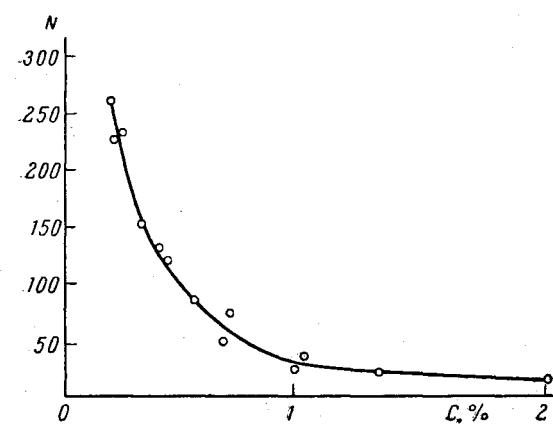


Рис. 4. Зависимость приведенной солюбилизации бензола ( $N$ ) (в молях на моль пепсина)

мы определяли  $[\alpha]_D^{20}$ , выдерживая растворы чистого пепсина и растворы, насыщенные бензолом, одинаковое время ( $\sim 2,5$  часа). Как видно из таблицы,

Зависимость удельного оптического вращения раствора пепсина от рН среды до и после солюбилизации ( $c = 0,33\%$ )

pH	$[\alpha]_D^{20}$ до солюбилизации	$[\alpha]_D^{20}$ после солюбилизации	pH	$[\alpha]_D^{20}$ до солюбилизации	$[\alpha]_D^{20}$ после солюбилизации
1,0	42,5	41,0	6,0	53,0	38,0
1,85	41,5	33,0	10,5	55,0	39,0
3,0	43,0	33,0	12,7	56,5	39,0
4,25	45,0	37,0			

оптическое вращение мало изменяется в кислой среде до  $pH = 6$ ; при дальнейшем увеличении рН оптическое вращение возрастает, так как наступает денатурация. После солюбилизации  $[\alpha]_D^{20}$  всегда оказывалось меньше. Это свидетельствует об изменении конформации молекул пепсина, которое сопровождается уменьшением внутренней энергии и об увеличении  $\alpha$ -спиральности после солюбилизации бензола. Бензол, взаимодействуя с неполярными участками спирали, очевидно, образует более плотный клубок.

В работе была исследована также солюбилизация бензола в растворах пепсина различной концентрации. Особенно наглядно видна эта зависимость на рис. 4. Здесь по оси ординат отложено число молей бензола, связанных с 1 моль пепсина. При этом из общей величины солюбилизации вычитается растворимость бензола в воде.

В разбавленных растворах на 1 моль пепсина приходится 260 молей бензола. При больших концентрациях ( $c = 1-2\%$ ) эта величина доходит до 12—8 молей на 1 моль пепсина; по-видимому, уменьшение приведенной солюбилизации с увеличением концентрации пепсина объясняется воз-

можной ассоциацией молекул пепсина за счет взаимодействия гидрофобных участков цепи.

Измерения удельного оптического вращения для тех же растворов показали небольшое изменение от  $[\alpha]_D^{20} = 45_{90}$   $[\alpha]_D^{20} = 43$ ; очевидно, степень  $\alpha$ -спиральности остается неизменной при увеличении концентрации, а изменение в величине солюбилизации происходит вследствие образования четвертичной структуры [13], т. е. ассоциацией молекул пепсина.

Так как ферментативную активность обычно определяют при 37°, нами исследовалась солюбилизация бензола при этой температуре. Опыты показали, что все закономерности (зависимость солюбилизации от pH среды и концентрации) те же, что и при 20°, поэтому результаты этих опытов здесь не приводятся.

Выяснив в описанных опытах некоторые общие закономерности солюбилизации бензола глобулярным белком — пепсином, мы попытались установить степень влияния эффекта солюбилизации на присущую этому белку — ферменту протеолитическую активность. Протеолитические ферменты могут действовать на различные субстраты, поэтому существуют разнообразные методы для определения ферментативной активности. В качестве белковых субстратов широко используется желатина, казеин, гемоглобин, сывороточный и яичный альбумины. Нативные белки, как правило, мало пригодны для определения протеолитической активности, так как ферменты легче гидролизуют денатурированные белки.

Меттом [14] был предложен простой метод определения активности (переваривающей способности) пепсина. Принцип определения заключается в изменении количества растворенного (переваренного) яичного белка, предварительно денатурированного теплом в капиллярной трубке. В колбочки с одинаковым объемом раствора чистого пепсина и раствора, солюбилизировавшего бензол, помещали 2—3 трубочки с денатурированным белком и ставили в термостат при 37°. Через определенное время (2—3 суток) трубочки вынимали и с помощью измерительного микроскопа измеряли длину переваренного столбика белка (т. е. разность между начальной и конечной длиной столбика). Измерения активности производили при  $pH < 2$  (область наибольшей активности пепсина). При  $pH = 0,6; 1,3; 2,0$  активность пепсина снижается под влиянием солюбилизации бензола соответственно со 100 до 22%, до 49% и до 51%.

Процесс гидролиза денатурированного яичного альбумина является гетерогенным, и скорость его должна определяться скоростью диффузии фермента к поверхности «столбика» яичного альбумина, т. е. вязкостью среды. Как показали наши опыты (рис. 3), вязкость в области  $pH < 2$  одинакова для чистого и солюбилизированного бензол пепсина. Следовательно, наблюдаемое торможение реакции гидролиза на 40—70% может быть объяснено только уменьшением ферментативной активности пепсина за счет солюбилизации.

Торможение ферментативной активности наблюдалось при всех изученных концентрациях (от 0,2 до 2%) (рис. 5). Здесь интересно отметить и тот факт, что с увеличением концентрации пепсина свыше 1% не наблюдается увеличения его активности. Эти данные хорошо согласуются с описанными выше выводами, сделанными при изучении влияния концентрации пепсина на солюбилизацию. А именно, что с увеличением концентрации пепсина происходит ассоциация по неполярным участкам молекул. Очевидно, эти неполярные участки играют большую роль при проявлении протеолитической активности фермента. Предполагаемый механизм торможения ферментативной активности заключается в том, что бензол, взаимодействуя с гидрофобными группами, экранирует его активные центры.

Был применен и другой метод определения ферментативной активности — гемоглобиновый метод Ансона [15]. Метод Ансона отличается от

метода Метта природой субстрата и различным соотношением системы: фермент — субстрат. В методе Ансона это отношение меньше, чем в методе Метта.

Методом Ансона нам не удалось обнаружить такого сильного торможения ферментативной активности, как в методе Метта. Используя спектрофотометр при  $\lambda = 280 \text{ \AA}$ , мы измерили кинетику переваривания гемоглобина пепсином до и после солюбилизации бензола. Как показали эти

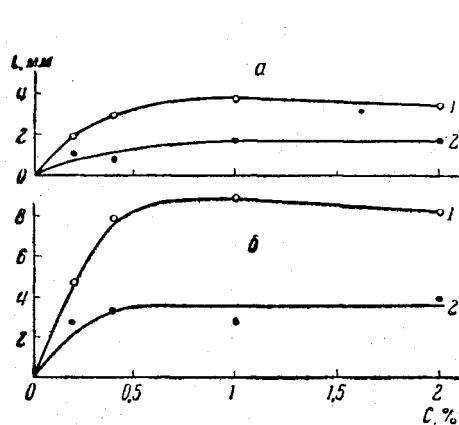


Рис. 5

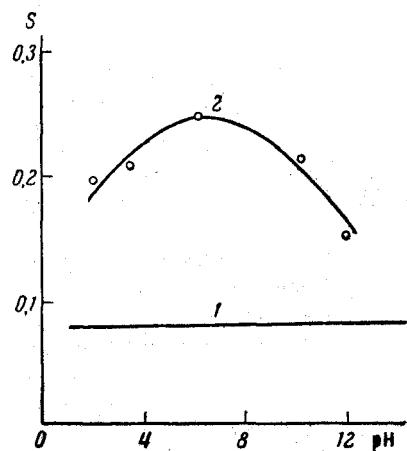


Рис. 6

Рис. 5. Определение ферментативной активности пепсина по методу Метта:  
a — через 30 час. реакции гидролиза; б — то же, через 5 суток;  $t = 20^\circ$ ,  $\text{pH} < 2$ ; 1 — для чистых растворов пепсина; 2 — для растворов пепсина, солюбилизовавших бензол

Рис. 6. Растворимость бензола ( $S$  в г на 100 мл раствора) в растворах гемоглобина при различных  $\text{pH}$  ( $c = 0,5\%$ )

1 — в воде; 2 — в растворах гемоглобина

измерения, торможение оказалось невелико — около 10%. Этот факт позволяет предположить, что используемый в качестве субстрата гемоглобин должен в этих условиях также солюбилизировать бензол, отнимая его от пепсина в связи с обратимостью процесса солюбилизации. Это и было установлено в специальном опыте (рис. 6). Гемоглобин обладает не меньшей способностью солюбилизировать бензол, чем пепсин, поэтому при добавлении к раствору гемоглобина пепсина, солюбилизированного бензолом, происходит, по-видимому, перераспределение бензола, вследствие чего активность ферmenta подавляется в меньшей степени.

Приносим благодарность П. А. Ребиндера за постоянное внимание к работе.

### Выводы

1. Исследована солюбилизация бензола в растворах пепсина. Показано, что растворимость бензола в водных растворах пепсина увеличивается в 2—2,5 раза по сравнению с его растворимостью в чистой воде. Наибольший эффект солюбилизации имеет место при  $\text{pH}$  от 3 до 5.

2. Показано, что солюбилизация бензола приводит к значительному снижению протеолитической активности пепсина. После солюбилизации активность его падает со 100 до 40—70% (метод определения активности по Метту). Уменьшение торможения протеолитической активности на 10%, обнаруженное методом Ансона, связано со способностью гемоглобина солюбилизировать бензол и свидетельствует об обратимости процесса солюбилизации.

3. Предполагаемый механизм торможения протеолитической активности пепсина заключается в том, что бензол, взаимодействуя с неполярными группами пепсина, экранирует его активный центр.

Московский государственный  
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
12 VIII 1961

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mc Bain, Solubilization and Related Phenomena, N.-Y., 1955; A. Шварц, Дж. Перри, Дж. Берг. Поверхностно-активные вещества и моющие средства, М., 1960.
2. A. S. Lawgess, Trans. Faraday Soc., 33, 325, 815, 1937; 34, 660, 1938; R. S. Shearns, Н. Оренхаймер, E. Simon, W. D. Harkins, J. Phys. Chem., 15, 296, 1947; Н. В. Клевен, Chem. Revs, 47, 1, 1950; К. А. Пospelova, П. А. Ребиндер, Acta physicochimica, URSS, 16, 71, 1942; П. А. Ребиндер, Коллоидн. ж., 8, 157, 1946; К. А. Пospelova, З. Н. Маркина, Труды 2-й Всес. конф. по коллоидн. химии, Киев, 1952; П. А. Ребиндер, К. А. Пospelova, Вступительная статья в книге Клейтона «Эмульсии», Изд. ин. лит., 1950; З. Н. Маркина, К. А. Пospelova, П. А. Ребиндер, Докл. АН СССР, 99, 121, 1954; З. Н. Маркина, П. А. Ребиндер, Докл. АН СССР, 109, 1156, 1956.
3. Д. Л. Талмуд, Ж. физ. химии, 15, 532, 1941; С. Е. Бреслер, Д. Л. Талмуд, Докл. АН СССР, 43, 326, 367, 1944; С. Е. Бреслер, Биохимия, 14, 180, 1949; В. А. Талмуд, Докл. АН СССР, 79, 643, 1951; Г. А. Деборин, Докл. АН СССР, 67, 889, 1949; Г. А. Деборин, Л. Б. Горбачев, Докл. АН СССР, 82, 943, 1952; Т. М. Клотз, Disc. Faraday Soc., 13, 189, 1953.
4. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, К. Т. Очуррова, Докл. АН СССР, 123, 505, 1958.
5. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, Н. И. Серая, Высокомолек. соед., 1, 1617, 1959.
6. В. Н. Измайлова, В. А. Пчелин, Л. Е. Боброва, Высокомолек. соед., 6, 847, 1961.
7. Д. Нортроп, М. Кунитц, Р. Херриот, Кристаллические ферменты, М., 1950, стр. 240.
8. Г. А. Левдикова, Вопросы мед. химии, 2, 151, 1956.
9. К. Вейганд, Методы эксперимента органической химии, 67, 162, 1951.
10. А. И. Юрченко, Доклад на 3-й конференции по высокомолекул. соед., Изд. АН СССР, 1945; С. С. Вуюцкий, М. А. Зайцева, Успехи химии, 16, 69, 1947; Л. Е. Перегудова, С. С. Вуюцкий, Коллоидн. ж., 10, 309, 1948.
11. P. Doty, F. Fang, J. Amer. Chem. Soc., 78, 498, 1956; F. Fang, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 79, 761, 1957; С. Е. Бреслер, В. М. Кушнер, С. Я. Френкель, Биохимия, 24, 685, 1959.
12. Simpson R. B. Kauzman, J. Amer. Chem. Soc., 75, 5139, 5154, 1953.
13. S. L. Laeh, Rev of pure app. chem., 9, 35—85, 1959.
14. Б. И. Збарский, И. Б. Збарский, А. И. Солнцев, Практикум по биологической химии, М., 1954, стр. 72.
15. M. Anson, J. Gen. Physiol., 22, 79, 1938; H. E delhoech, J. Amer. Chem. Soc., 78, 2644, 1956.

#### INFLUENCE OF THE SOLUBILIZATION EFFECT ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF PEPSIN

V. A. Pchelin, V. N. Izmailova, G. P. Bolshova

#### Summary

The solubilization of benzene by pepsin solutions at various pH values and concentrations of the medium has been investigated. The proteolytic activity fell by 40% (according to the Mett method) after solubilization. The mechanism proposed for the drop in enzymic activity of pepsin is that benzene, interacting with the non-polar (hydrocarbon) groupings of the enzyme, blocks its active centers.