

УДК 544.4

*Анатолій ТУРОВСЬКИЙ, Андрій КИЦЯ, Лілія БАЗИЛЯК*

## **КВАНТОВО-ХІМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ КІНЕТИКИ ТА МЕХАНІЗМУ ГІДРОЛІЗУ МЕТИЛАЦЕТАТУ В РЕАКЦІЯХ ФЕРМЕНТАТИВНОГО І ГОМОГЕННОГО КАТАЛІЗУ ХІМОТРИПСИНОМ І СЕРИНОМ**

*Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України,  
вул. Наукова, 3<sup>а</sup>, 79053 Львів, Україна  
e-mail: andriy\_kytsya@yahoo.com; bazyljak.l.I@nas.gov.ua*

*Виконано квантово-хімічне моделювання реакції гідролізу метилацетату в процесах ферментативного та гомогенного каталізу Хімотрипсином і Серином, відповідно. З'ясовано, що будова активного центру Хімотрипсину, прийнятого в літературі, підтверджується нашими обчисленнями. Оцінені кінетичні параметри реакцій утворення ацилсполук та їхнього гідролізу для обох видів каталізу. Виявлено, що утворення ацилхімотрипсину відбувається через низку проміжних комплексів, зумовлених конформаційними переходами, які спричинені водневими зв'язками Хімотрипсину і залежать від вояжу атома водню активної групи Серину. Доведено, що стабілізація активованих комплексів реакції ацилювання та деацилювання у ферментативному і гомогенному каталізі значно залежить від величини зарядів реакційного центру, що позначається на значеннях кінетичних параметрів таких реакцій. Розрахована термодинаміка елементарних стадій реакцій ацилювання та деацилювання.*

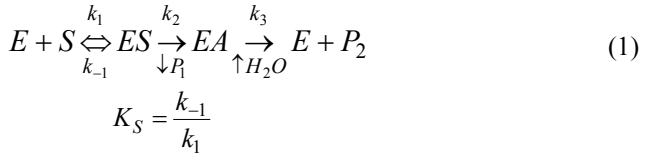
*Ключові слова: квантово-хімічне моделювання, ферментативний каталіз, гомогенний каталіз, гідроліз метилацетату, реакції ацилювання та деацилювання.*

### **1. ВСТУП**

Особливо значні успіхи в дослідженні рушійних сил ферментативного каталізу були досягнуті у випадку Хімотрипсину. Хімотрипсин – це ендопептидаза, яка в пептидах розщеплює пептидні зв'язки. Інформацію про будову молекули Хімотрипсину одержали за допомогою рентгенівського дослідження [1–4]. Виявили, що всі заряджені групи в молекулі ферменту спрямовані в бік водного розчину (за винятком трьох, які виконують специфічні функції в механізмі дії активного центру). Успіхи кінетичних досліджень у багатьох випадках були зумовлені працями М. Бергмана, Д. Фругона і Г. Нейрага, які виявили, що Хімотрипсин здатний гідролізувати також і прості низькомолекулярні продукти (аміди, складні ефіри).

Хімотрипсин за силою каталітичної дії при гідролізі складних ефірів приблизно в  $10^6$  перевищує  $\text{OH}^-$  та  $\text{H}_3\text{O}^+$ .

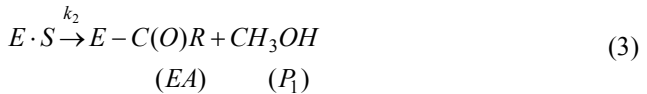
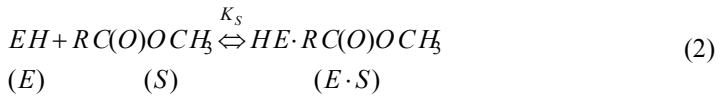
Гідроліз субстрату (амідів, складних ефірів) на активному центрі *Хімотрипсину* відбувається в декілька стадій. На першій стадії ферментативного процесу відбувається сорбція (утворення комплексу *Міхаеліса ES*). На подальших стадіях – хімічне перетворення сорбованої молекули з утворенням проміжної сполуки ацилферменту *EA* за кінетичною схемою:



$P_1$  і  $P_2$  – продукти гідролізу.

Положення рівноваги визначається лише невалентними взаємодіями з білком бокових, хімічно інертних фрагментів молекули субстрату. Проміжним продуктом є ацилфермент, який є нестабільною сполукою (час життя  $\sim 0,01$  сек. [5]).

Зрештою, ферментативний гідроліз можна подати у вигляді такої схеми:



Проте стадії (3) і (4) не є елементарними [6–9] і враховують швидке (рівноважне) утворення проміжного стану, яке відповідає новому конформаційному стану ферменту.

При гідролізі молекули субстрату, який сорбований на активному центрі, як атаквальний нуклеофіл є *ОН*-група *Серину* [6, 10–12]. Допускають, що висока активність *Серину* пов'язана з його оточенням в активному центрі. В його активності бере участь поряд з *Серином* також імідазольна група *His* [6, 10–11, 13]. Атом азоту *Гістидину* утворює водневий зв'язок з киснем гідроксилу *Серину*. Другий водневий зв'язок за *Бловим* [14] існує між атомом *N* і *Гістидину* та карбонільною групою залишку *Asp*, який розміщений у глибині ферментної глобули. Система водневих зв'язків приводить до збільшення негативного заряду на *ОН* групі *Серину*, що сприяє її нуклеофільності.

На стадії ацилювання відбувається нуклеофільна атака карбоксильного вуглецю субстрату узагальненим нуклеофілом активного центру: *Ser*, *His*, *Asp*. Внаслідок ацилювання активного центру відбувається поворот залишку *Ser* навколо зв'язку  $C_\alpha - C_\beta$  зв'язків, що супроводжується переміщенням атома кисню на  $\sim 2,5$  Å. Імідазольна група *His* переміщується в бік розчинника [3]. У підсумку імідазольна група *His* входить до вільного ферменту (і в комплексі *Міхаеліса*) у водневий зв'язок. *Ser* в ацилферменті вносить свій атом *N* для утворення водневого зв'язку з во-

дою. Отже, активована молекула води має здатність ефективно атакувати карбонільний вуглець субстрату на стадії деацільовання. При цьому утворюється продукт гідролізу і регенерується вільний фермент. Такий в загальних рисах хімічний механізм гідролітичної дії *Хімотрипсину*, який описаний в літературі.

Нас зацікавив аналіз такого підходу до ферментативного каталізу з використанням квантово-хімічних розрахунків.

## 2. МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Мета нашої праці – моделювати кінетику і механізм процесу ферментативного каталізу реакції гідролізу метилацетату *Хімотрипсином* з використанням квантово-хімічного методу.

*По-перше*, цікаво було розглянути поетапне моделювання процесу за загальноприйнятими схемами в літературі і, за змогою, доповнити їх.

*По-друге*, цікавою була оцінка кінетичних параметрів реакції ферментативного каталізу.

*По-третє*, доречно було порівняти кінетики процесів ферментативного та гомогенного каталізу метилацетату.

Квантово-хімічні обчислення проводили напівемпіричним методом *PM6* з використанням програми *MOPAC2009*. Для візуалізації отриманих результатів обчислень використали програму *JMol 11.8*.

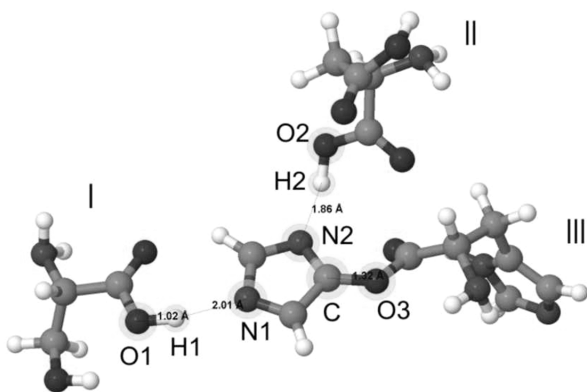
### Об'єкти моделювання такі:

- метилацетат;
- загальноприйнята активна форма *Хімотрипсину*, який складається з трьох фрагментів (рис. 1). На цьому ж рис. 1 зображено геометрію і електронні характеристики *Хімотрипсину*.

## 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНІ ОБГОВОРЕННЯ

З оптимальної геометрії активного фрагменту *Хімотрипсину* видно (рис. 1), що водневі зв'язки відповідно до відстаней існують між атомами  $H1$  і  $N1$ , а також між атомами  $H2$  і  $N2$ . Ймовірно, другий зв'язок сильніший (відстань коротша). Зазначимо, що спорідненість до електрона у *Хімотрипсиновому* фрагменті досить висока. При наближенні молекули метилацетату до *Хімотрипсину* по координаті  $C1-O1$  (рис. 2, **а**) при досягненні відстані 1,60 Å відбувається зміна геометрії комплексу, а також видовження водневого зв'язку  $O1...H...N1$ , що зумовлено конформаційними змінами молекули *Хімотрипсину*. Таке конформаційне перетворення відбувається з досить значною затратою енергії (пік 1 на рис. 3).

З рис. 2, **а** видно, що при відстані  $C1-O1$  1,60 Å заряди на  $H1$  і  $O1$  дещо збільшуються; заряд на  $N1$  зменшується. Зміна кута  $O2-N2-O3$  незначна. Міжатомна відстань  $O1-H1$  також зросла. Незначна зміна відстані  $C1-O1$  призводить до значних змін в геометрії і величин зарядів на атомах фрагмента *Хімотрипсину*. Якщо відстань  $C1-O1$  1,59 Å, то в наслідок нових конформаційних змін утворюється новий комплекс (**а**) (рис. 2, **б** і рис. 3, **а**). З рис. 2, **б** видно значне збільшення заряду на реакційному центрі  $O1$ . Зростає заряд на  $C1$  метилацетату. Заряд на  $N1$  значно падає внаслідок значного зменшення відстані  $N1-H1$ . Заряди на  $N2$  і  $H2$ , відповідно, падають з огляду на збільшення відстані водневого зв'язку внаслідок зміни міжатомних відстаней і кутів навколишніх атомів. Простежується дуже значна зміна дієдрального кута  $O2-N2-O3$ , що приводить до стабільнішої конформації *Хімотрипсину* (рис. 3, **а**).



Jmol

Заряд на	H1	O1	N1	H2	O2	N2	C	O3
	+0,385	-0,546	-0,363	+0,403	-0,515	-0,474	+0,338	-0,429

Відстань	O1 – H1	N1 – H1	O2 – H2	N2 – H2	C – O3
Å	1,02	2,01	1,05	1,86	1,32

**Рис. 1.** Геометрія та електронні характеристики молекули *Хімотрипсину*.

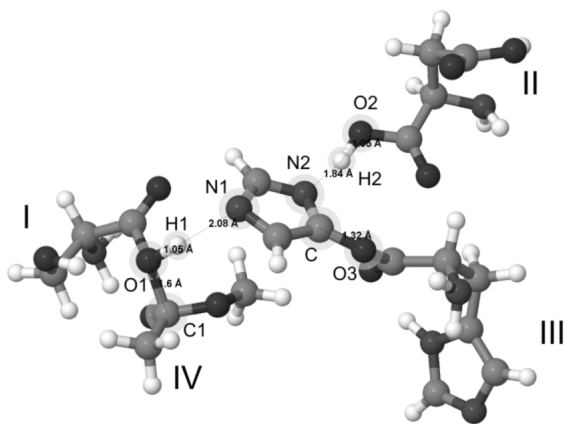
I – *Ser*; II – *Asp*; III – *His*. Потенціал іонізації 9,605; спорідненість до електрона: -2,601. Кут  $O2-N2-O3$  104,8°.

У разі наближення атома C1 до O1 атом O4 (рис. 4, **a**; рис. 3, пік 2) наближається до атома H1, а при відстані 1,48 Å відбувається переміщення атома H1 до O4 та відрив від комплексу молекули метанолу. Такий процес проілюстровано піком 2 на рис. 3.

Для комплексу (рис. 4, **a**), який і є активованим комплексом утворення проміжної нестабільної сполуки, найбільш суттєво зростають заряди на атомах H1 і N1. Зменшуються заряди на C1 і O1. Відстані внаслідок приєднання атома водню до O4 метилацетату (рис. 4, **a**) збільшуються відповідно для N1–H1, і зменшуються для N2–H2.

В комплексі ( $\beta$ ) (рис. 3) при відстані C1–O1 = 1,47 Å значно зменшуються відстані O4–H1, N2–H2 і збільшуються міжатомні відстані C1–O4, N1–H1, C–O3 як підсумок суттєвих змін загальної геометрії комплексу. Заряди збільшуються на N4, N2 і H2 атомах та зменшуються на атомах H1, O1, C1 і O4. Значних змін зазнає кут O2–N2–O3.

Комплекс ( $\beta$ ) (рис. 3) переходить у проміжну сполуку через конформацію ( $\gamma$ ) (рис. 3). Утворення проміжної сполуки [*Kh*-CH<sub>3</sub>CO] (рис. 5) призводить до зменшення зарядів на атомах C1, O1, N1, N2, O3 і збільшення на атомах N2, O2, H2 і O1.

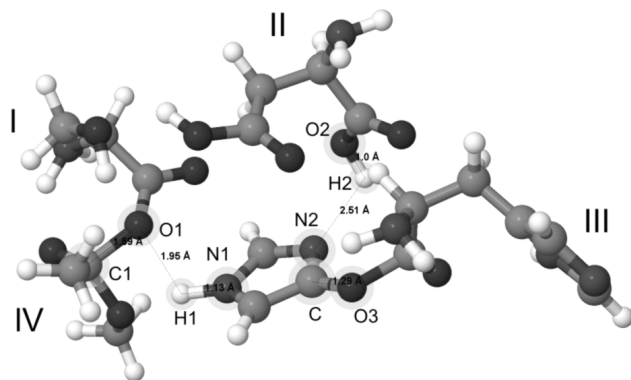


Jmol

Відстань C1 – O1: 1,60 Å. Кут O2 – N2 – O3: 104,7°

Заряд на	H1	O1	N1	C1	H2	O2	N2	C	O3
	+0,399	-0,531	-0,358	+0,758	+0,401	-0,519	-0,476	+0,339	-0,432

Відстань	O1 – H1	N1 – H1	O2 – H2	N2 – H2	C – O3
Å	1,05	2,08	1,05	1,84	1,32



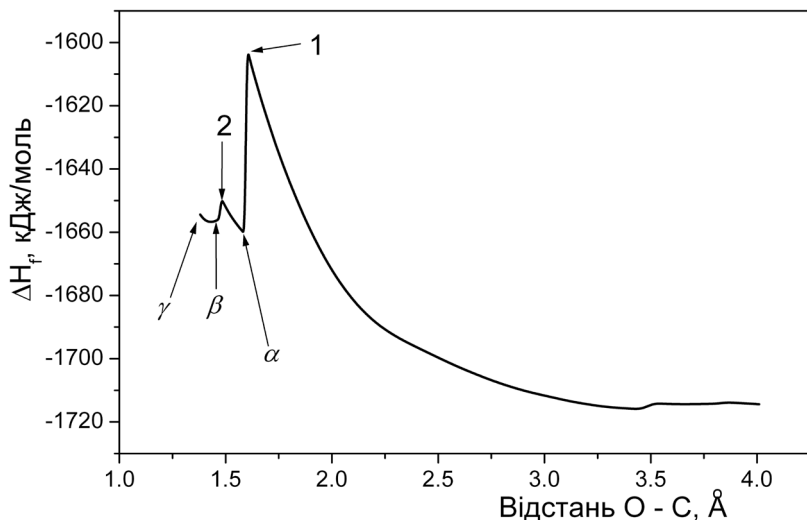
Jmol

Відстань C1 – O1: 1,59 Å. Кут O2 – N2 – O3: 122,9°

Заряд на	H1	O1	N1	C1	H2	O2	N2	C	O3
	+0,405	-0,706	-0,212	+0,811	+0,360	-0,500	-0,457	+0,423	-0,420

Відстань	O1 – H1	N1 – H1	O2 – H2	N2 – H2	C – O3
Å	1,95	1,13	1,00	2,51	1,29

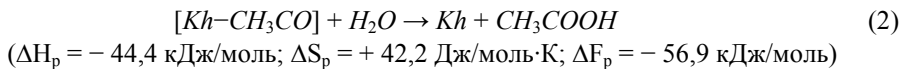
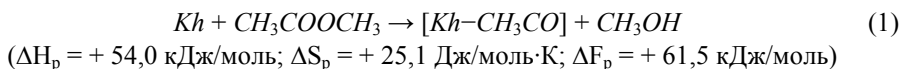
Рис. 2. Зміна геометрії комплексу в точці 1 (відповідно до рис. 3).  
I – Ser, II – Asp, III – His, IV – метилацетат.



**Рис. 3.** Утворення комплексу  $[Kh-CH_3CO]$ : **1** – координація комплексу  $[Kh-CH_3COOCH_3]$  (1,60 Å), перенесення атома водню від *Серину* до атома азоту; **2** – відрив метанолу (1,48 Å).

Міжатомна відстань  $C1-O1$  для проміжної сполуки становить 1,39 Å. Відстань  $N2...H2$  значно зростає. Дуже сильно змінюється кут  $O2 - N2 - O3$ . Спорідненість до електрона падає порівняно з вихідним активним центром *Хімотрипсину*.

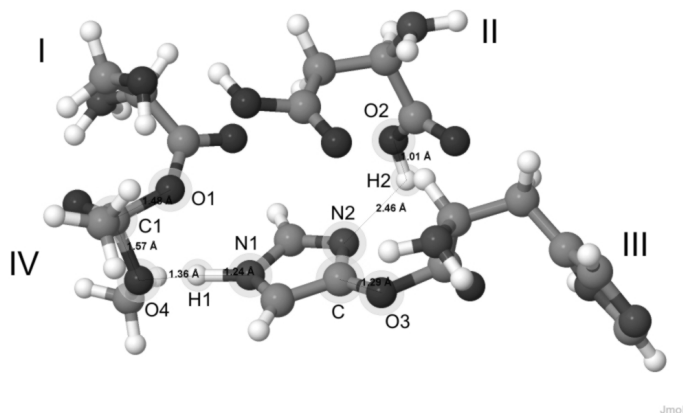
Розглянемо термодинаміку ферментативного каталізу *Хімотрипсином* реакції розщеплення зв'язку  $C-O$  в метилацетаті. Далі подаємо схему процесу, термодинаміка якого розрахована без врахування взаємодій комплексів з метанолом (1) та оцтовою кислотою (2):



Тут:  $Kh$  – *Хімотрипсин*;  $Kh-CH_3CO$  – *Ацилхімотрипсин*.

$\Sigma\Delta F = + 4,6 \text{ кДж/моль}; K = \exp(-\Delta F/RT) = 0,2$ .

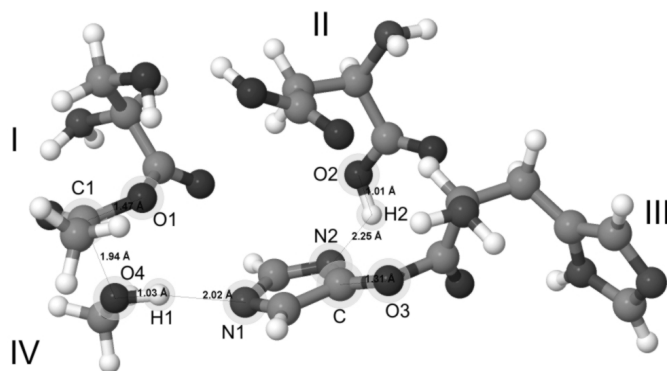
Термодинамічні характеристики вихідних речовин, продуктів реакції та проміжної сполуки (*Ацилхімотрипсину*) наведені в табл. 1. Як видно з розрахунків, процес утворення *Ацилхімотрипсину* ендотермічний. Така проміжна сполука термодинамічно не є стійкою і легко переходить у кінцеві продукти реакції деацилування.


**a**

Відстань C1 – O1: 1,48 Å. Кут O2 – N2 – O3: 123,3°

Заряд на	H1	O1	N1	C1	O4	H2	O2	C	O3
	+0,420	-0,648	-0,280	+0,801	-0,550	+0,363	-0,502	+0,399	-0,425

Відстань	O4 – H1	C1 – O4	N2 – H1	O2 – H2	N2 – H2	C – O3
Å	1,36	1,57	1,24	1,01	2,46	1,29

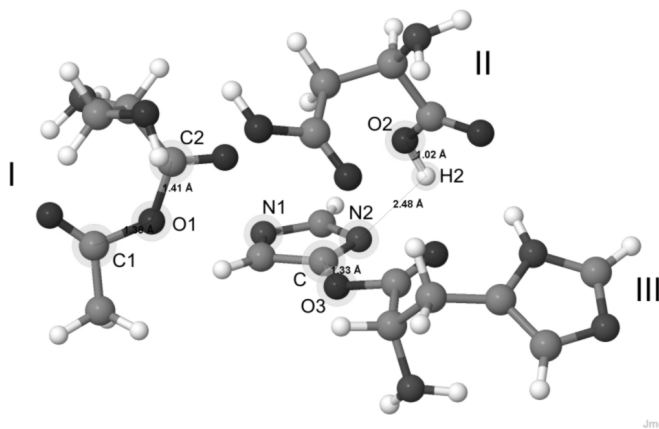

**b**

Відстань C1 – O1: 1,47 Å. Кут O2 – N2 – O3: 117,8°

Заряд на	H1	O1	N1	C1	O4	H2	O2	C	O3	N2
	+0,376	-0,623	-0,374	+0,794	-0,523	+0,378	-0,513	+0,349	-0,434	-0,481

Відстань	O1 – H1	C1 – O4	N1 – H1	O2 – H2	N2 – H2	C – O3
Å	1,03	1,94	2,02	1,01	2,25	1,31

**Рис. 4.** Зміна геометрії комплексу в точці 2. (a) I – Ser, II – Asp, III – His, IV – метилацетат; (б) I – Ser + CH<sub>3</sub>CO, II – Asp, III – His, IV – метанол.



Jmol

Кут  $O2 - N2 - O3$ :  $83,2^\circ$ . Потенціал іонізації: 9,050. Спорідненість до електрона:  $-2,120$ .

Заряд на	C2	O1	N1	C1	H2	O2	C	O3	N2
	+0,595	-0,559	-0,324	+0,717	+0,388	-0,520	+0,302	-0,412	-0,419

Відстань	$O1 - C1$	$C2 - O1$	$O2 - H2$	$N2 - H2$	$C - O3$
Å	1,39	1,41	1,02	2,48	1,33

**Рис. 5.** Геометрія та електронні характеристики комплексу  $[Kh-CH_3CO]$ .

I – Ser +  $CH_3CO$ , II – Asp, III – His.

Таблиця 1

**Термодинамічні характеристики реагентів і продуктів реакції гідролізу метилацетату**

Номер за пор.	Формула / назва речовини	$\Delta H$ , кДж/моль	$\Delta S$ , Дж/моль·К	$\Delta F$ , кДж/моль
1	<i>Хімотрипсин</i>	-1282,8	999,6	-1580,7
2	$CH_3C(O)OCH_3$	-407,9	317,1	-502,5
3	$H_2O$	-227,2	188,3	-283,2
4	$CH_3OH$	-202,1	233,9	-272,0
5	$CH_3COOH$	-423,4	288,7	-509,6
6	$[Kh-CH_3CO]$	-1434,7	1057,7	-1749,7

Розглянемо кінетику реакції ацилювання та деацилювання ферментативної частини *Хімотрипсину*. Кінетичні дані реакції утворення ацилферменту і стадії його деацилювання подано в табл. 2.

На рис. 3 зображена потенціальна крива реакції утворення ацилферменту. З зображеної кривої видно, що внаслідок взаємодії *Хімотрипсину* з метилацетатом утворюється низка проміжних комплексів, які зумовлені конформаційними змінами ферменту під дією метилацетату. Енергії процесу адсорбції субстрату на ферменті достатньо для утворення комплексу *Міхаеліса* (конформація на рис. 3 (1)).



Комплекс (1), який має досить високу вільну енергію, легко переходить у комплекс ( $\alpha$ ). Перехід з комплексу (1) в комплекс ( $\alpha$ ) є екзотермічним процесом з тепловим ефектом  $\sim 42$  кДж/моль. Комплекс ( $\alpha$ ) легко переходить в активований комплекс (2) (див. рис. 3, пік 2) з енергією активації  $\sim 8$  кДж/моль. Активований комплекс (2) переходить у конформацію ( $\beta$ ), а ( $\beta$ ) переходить в конформацію ( $\gamma$ ), яка з надзвичайно малим бар'єром переходить в проміжну сполуку – ацилфермент. Ентальпії активації утворення ацилферменту дещо завищені внаслідок неточності напівемпіричних методів розрахунку. Проте якісно кінетичним характеристикам процесу можна довіряти (табл. 2). Вільна енергія активації реакції ацилювання становить 32,6 кДж/моль, а для реакції деацилювання  $\Delta F^\ddagger = 16,7$  кДж/моль, тобто швидкість реакції деацилювання набагато більша. Реакція ацилювання є лімітуючою стадією процесу гідролізу метилацетату.

Таблиця 2

Кінетичні параметри ферментативного каталізу утворення ацилферменту

Стадія	Точка розрахунку	$\Delta H$ , кДж/моль	$\Delta S$ , Дж/моль·К	$\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/моль·К
1	Вихідні речовини	-1715,8	1150,6	63,6	102,5
	Активований комплекс	-1652,3	1046,0		
	Продукти реакції	-1669,0	1099,6		
2	Вихідні речовини	-1700,4	890,4	46,9	157,3
	Активований комплекс	-1653,5	1047,7		
	Продукти реакції	-1812,5	1013,8		

З рис. 6 видно, що активований комплекс реакції деацилювання проміжного продукту утворюється при міжатомній відстані C–O 1,75 Å. Процес деацилювання екзотермічний і проходить з тепловим ефектом 146,4 кДж/моль. Ймовірно процес деацилювання одностадійний, тобто його можна вважати елементарним. Значна різниця в ентропіях активації реакцій ацилювання та деацилювання пояснюється більш розрихленою структурою активованого комплексу для реакції деацилювання.

Зауважимо, що значний вклад у значення констант швидкостей у реакціях ацилювання та деацилювання *Хімотрипсину* характеризуються ентропійними чинниками, що пов'язано з великим вкладом в  $\Delta S^\ddagger$  активації коливальних складових ентропії, які зумовлені низькочастотними коливаннями зв'язків.

Для порівняння цікаво було *вивчити моделювання реакції кислотного гомогенного каталізу метилацетату*.

Об'єкти дослідження такі:

- метилацетат;
- Серин.

Допускали, що процес гомогенного каталізу проходить також через стадію ацилювання та деацилювання. Розрахунки термодинамічних параметрів реагентів, проміжних і кінцевих продуктів подано в табл. 3.

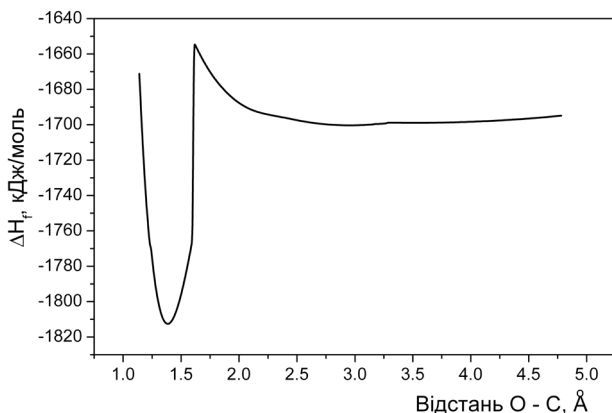


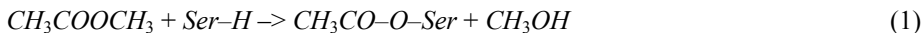
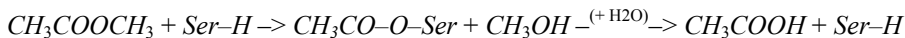
Рис. 6. Потенціальна крива деацилювання комплексу *Хімотрипсину*.

Таблиця 3

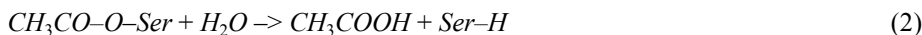
Термодинамічні характеристики реагентів

Номер за пор.	Формула / назва речовини	$\Delta H_f$ , кДж/моль	$\Delta S_f$ , Дж/моль·К	$\Delta F_f$ , кДж/моль
1	<i>Ser-H</i>	-580,3	367,4	-689,9
2	$CH_3C(O)OCH_3$	-407,9	317,1	-502,5
3	$H_2O$	-227,2	188,3	-283,2
4	$CH_3OH$	-202,1	233,9	-272,0
5	$CH_3COOH$	-423,4	288,7	-509,6
6	$CH_3CO-O-Ser$	-734,7	455,6	-870,3

Схема процесу:



$$(\Delta H_p = +51,5 \text{ кДж/моль}, \Delta S_p = +5,0 \text{ Дж/моль}\cdot\text{К}, \Delta F_p = +49,8 \text{ кДж/моль})$$

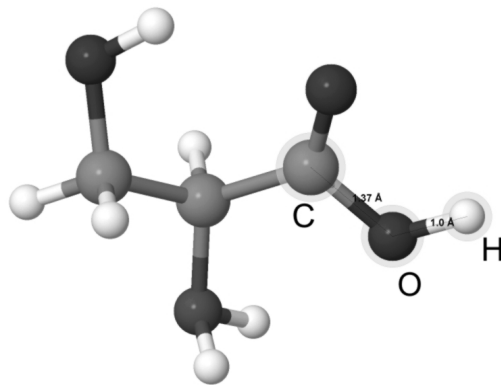


$$(\Delta H_p = -41,8 \text{ кДж/моль}, \Delta S_p = +12,1 \text{ Дж/моль}\cdot\text{К}, \Delta F_p = -45,2 \text{ кДж/моль})$$

$$\Sigma \Delta F = +4,6 \text{ кДж/моль}, K = \exp\left(-\frac{\Delta F}{RT}\right) = 0,16.$$

З розрахунків видно, що стадія утворення проміжного продукту ендотермічна і його утворення не є термодинамічно стійким. Ймовірно, що і час існування проміжного продукту надзвичайно малий. Реакція гідролізу проміжної сполуки термодинамічно вигідна. Загалом вільна енергія процесу гідролізу становить +4,6 кДж/моль. Приблизно в межах похибки реакція гідролізу метилацетату є термодинамічно дозволеною.

Розглянемо кінетику процесу каталізу. На рис. 7 зображено міжатомні відстані й електронні характеристики *Серину*.



Jmol

Кут  $C-O-H$ :  $113,0^\circ$ . Потенціал іонізації: 10,232. Спорідненість до електрона:  $-0,066$ .

Заряд на	H	O	C	Відстань	O-H	C-O
	+0,348	-0,536	+0,561	Å	1,00	1,37

**Рис. 7.** Геометрія і електронні характеристики *Серину*.

Потенціал йонізації дещо вищий, ніж у випадку *Хімотрипсину*. Спорідненість до електрона досить низька.

В активованому комплексі ацилсерину (див. рис. 8) простежується значна зміна зарядів на реакційному центрі  $C-O$  порівняно з вихідною системою.

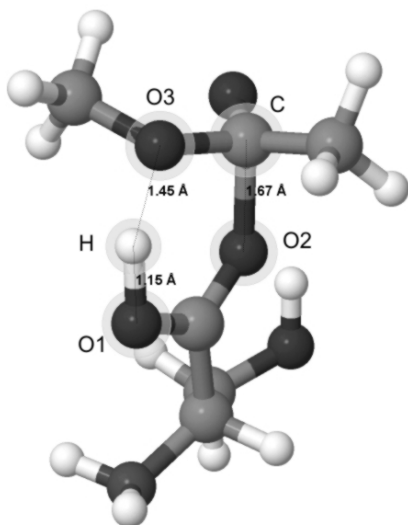
Остаточний проміжний продукт – ацилсерин – утворюється при відстані  $C-O \sim 1,5$  Å (рис. 9).

Процес утворення проміжного продукту ендотермічний (рис. 10) з теплою реакції  $\sim 46$  кДж/моль.

Перетворення активованого комплексу в проміжний продукт відбувається екзотермічно з теплою  $\sim 25$  кДж/моль.

Активований комплекс реакції гідролізу (рис. 11) проміжного продукту утворюється за між'ядерної відстані  $C-O \sim 1,6$  Å. Реакція гідролізу екзотермічна і відбувається з теплою  $\sim 27,2$  кДж/моль.

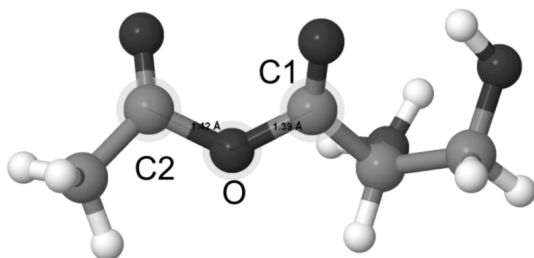
Кінетичні параметри реакції утворення проміжного продукту (ацилювання) і кінцевих продуктів (гідроліз) наведені в табл. 4. Потенціальні криві стадій зображено на рис. 10 і рис. 11.



Jmol

Заряд на	H	O1	O2	C	O3	Відстань	C-O2	O1-H	H-O3
	+0,418	-0,537	-0,570	+0,771	-0,585	Å	1,67	1,15	1,45

Рис. 8. Геометрія і величини зарядів активованого комплексу утворення ацилсерину.



Jmol

Кут C-O-C: 126,1°. Потенціал іонізації: 10,012 еВ. Спорідненість до електрона: -0,401 еВ.

Заряд на	C1	O	C2	Відстань	C1-O1	O-C2
	+0,584	-0,570	+0,703	Å	1,390	1,42

Рис. 9. Геометрія і електронні характеристики комплексу  $CH_3CO-O-Ser$  (реакція ацилювання).

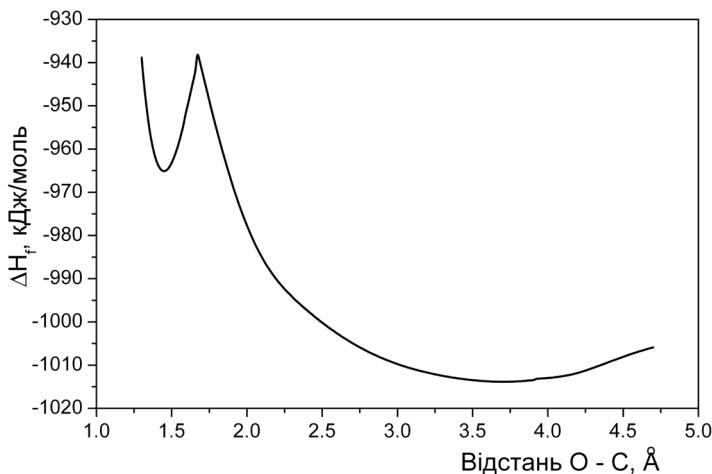


Рис. 10. Потенціальна крива утворення проміжної сполуки ацилсерину  $CH_3CO-O-Ser$ .

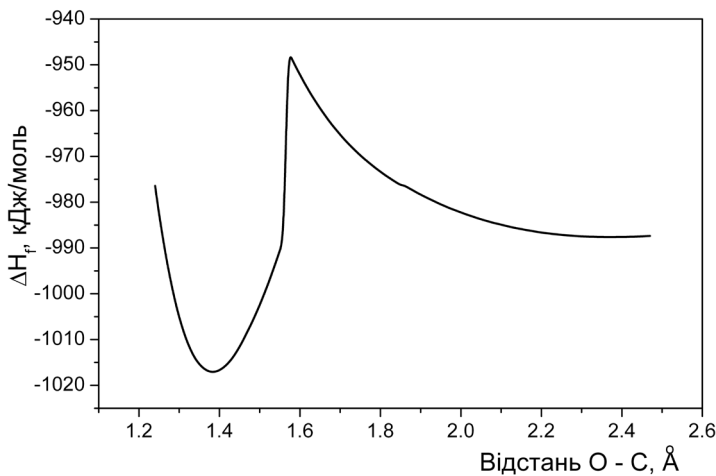


Рис. 11. Потенціальна крива реакції деацилювання  $CH_3CO-O-Ser$ .

Теплота активації реакції ацилювання набагато більша, ніж  $\Delta H^\ddagger$  реакції деацилювання. Проте ентропія активації першої реакції значно більша.

Вільна енергія активації реакції ацилювання становить  $-2,9$  кДж/моль. Вільна енергія активації реакції деацилювання при  $T = 298$  К становить  $+19,7$  кДж/моль. Тобто друга стадія є лімітуючою, тоді як для ферментативної реакції лімітуючою є стадія ацилювання.

Більша спорідненість до електрона активного фрагмента *Хімотрипсину* (–2,601 eВ) пояснює пришвидшення ферментативного каталізу, порівняно з гомогенним каталізом *Серином*, спорідненість якого до електрона досить низька (–0,0066 eВ).

Таблиця 4

Кінетичні параметри реакцій ацилювання та деацилювання *Серину*

Стадія	Точка розрахунку	$\Delta H$ , кДж/моль	$\Delta S$ , Дж/моль·К	$E_A$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/моль·К
1	Вихідні речовини	–1013,8	573,6	74,99	129,7
	Активованій комплекс	–938,9	443,9		
	Продукти реакції	–965,2	571,5		
2	Вихідні речовини	–987,4	513,4	40,6	34,7
	Активованій комплекс	–946,8	478,6		
	Продукти реакції	–1017,1	433,9		

Якщо допустити, що реакційні центри C1–O1 для *Хімотрипсину* і *Серину* мають приблизно однакові резонансні інтеграли та інтеграли перекривання, то орбітальну енергію цих двох реакцій визначатимемо за формулою [15]

$$E_{orbit} \approx \frac{const}{I - E},$$

де  $I$  – це потенціал йонізації (донора), а  $E$  – спорідненість до електрона (акцептора).

Для метилацетату  $I \approx 11,66$  eВ;  $E$  для *Хімотрипсину* становить –2,66 eВ, тоді як для *Серину* це значення становить –0,0066 eВ. Відповідно, орбітальні енергії взаємодії для реакції утворення проміжних ацилполук будуть становити

$$\frac{const}{14,32} \text{ і } \frac{const}{11,67},$$

відповідно; тобто орбітальна енергія утворення ацилхімотрипсину буде в 1,22 раза меншою, порівняно з проміжною енергією утворення ацилполуки у випадку гомогенного каталізу *Серином*.

Варто зазначити, що електронна структура реагентів суттєво впливає на реакцію гідролізу зв'язку C–O в метилацетаті в процесі ферментативного та в процесі гомогенного каталізу (кислотного). Наприклад, величини зарядів на активних атомах кисню гідроксильних груп серинового фрагмента *Хімотрипсину* і самого вільного *Серину*, відповідно становлять –0,546 і –0,536, що призводить до більшої нуклеофільності *Хімотрипсину*.

У процесі ферментативного каталізу значно змінюються електронні характеристики реагентів, що призводить до значних змін нуклеофільності реакційного центру *Хімотрипсину* та реакційного центру субстрату (метилацетату). Якщо

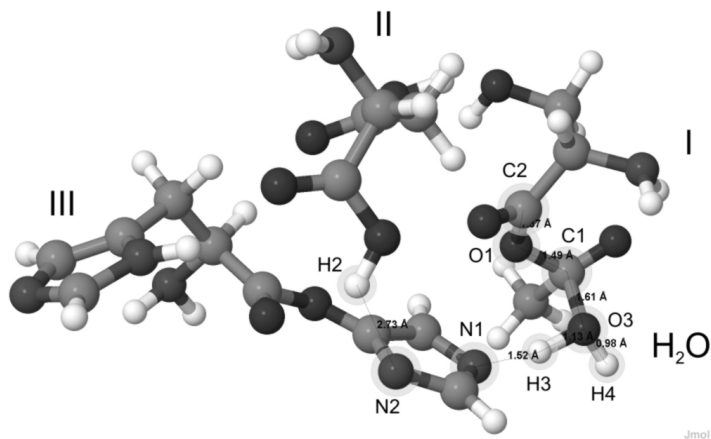
прийняти за характеристики таких реакційних центрів відповідні заряди, то отримаємо таку картину. Величини зарядів атомів по шляху реакції  $C1^+ - O1^-$  (рівноважний стан) змінюється від +0,666, -0,559 до +0,801, -0,648 в активованому комплексі.

Для реакції гомогенного каталізу метилацетату *Серином* в рівноважному стані заряди на реакційних центрах *C* і *O* дорівнюють +0,666 і -0,536 відповідно, а для активованого комплексу +0,771 і -0,537.

З цього випливає, що нуклеофільність реакційного центру (атом кисню *Серину*) *Хімотрипсину* дещо більша, ніж така сама характеристика для *Серину*. Загалом можна зробити висновок, що стабілізація активованого комплексу за рахунок зарядів реакційного центру *C-O* буде більшою, порівняно з гомогенним каталізом молекулою *Серину*. Відповідно до цього і теплота утворення активованого комплексу буде меншою у випадку ферментативного каталізу, що і приводить до меншої теплоти активації утворення ацилферменту.

Зазначимо, що активований комплекс ацилферменту у випадку ферментативного каталізу стабілізується також і завдяки утворенню водневого зв'язку атома водню *His* і атома кисню метилацетату (у підсумку атом водню переходить на кисень з утворенням метанолу).

Розглянемо більш детально реакцію деацилювання *Хімотрипсину*. Атом вуглецю *C1* (рис. 12) атакується атомом кисню *O3* молекули води з одночасною атакою водню атома азоту *N* імідазольної групи *His*. Геометрія та розподіл зарядів в активованому комплексі ацилтрипсину зображено на рис. 12.



Заряд на	C2	O1	N1	C1	H2	H3	H4	O3	N2
	+0,633	-0,651	-0,420	+0,794	+0,374	+0,412	+0,336	-0,554	-0,401

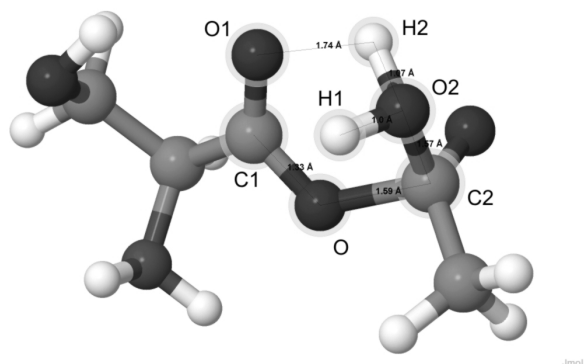
Відстань	O1 - C1	C2 - O1	O3 - C1	O3 - H3	O3 - H4	N1 - H3	N2 - H2
Å	1,49	1,37	1,61	1,13	0,98	1,52	2,73

**Рис. 12.** Геометрія активованого комплексу та заряди деяких атомів [*Kh-CH<sub>3</sub>CO*]-*H<sub>2</sub>O*.  
I - *Ser* + *CH<sub>3</sub>CO*, II - *Asp*, III - *His*.

Величина зарядів на реакційному центрі активованого комплексу ацилхімотрипсину  $C1-O3$ , відповідно, становлять  $+794$  і  $-0,554$ , тоді як для активованого комплексу ацилсерину значення таких зарядів становлять  $C2 (+757) - O2 (-0,549)$  (див. рис. 13).

З порівняння двох реакцій гідролізу ацилхімотрипсину й ацилсерину можна зробити висновок, що більша стабілізація активованого комплексу простежується у випадку стадії деацилювання ацилхімотрипсину. Завдяки такій більшій стабілізації активованого комплексу реакції деацилювання спостерігається дещо менша енергія активації для ферментативної реакції.

В реакції гідролізу ацилсполук нуклеофілом є молекула води. Електронні характеристики молекули води подано в підписах до рис. 13. Враховуючи, що потенціал йонізації ацилхімотрипсину становить  $9,05$  еВ, а для ацилсерину  $\sim 10$  еВ (різниця  $96$  кДж/моль), можна дійти висновку, що реакція деацилювання відбуватиметься з меншою енергією активації для ацилхімотрипсину. Ймовірно, що реакції деацилювання відбуваються за участю молекули гідроксонію, який має досить високу спорідненість до електрона.



Заряд на	C1	O	C2	O1	O2	H1	H2
	+0,634	-0,636	+0,757	-0,645	-0,459	+0,346	+0,404

Відстань	C1 - O	O - C2	O2 - C2	O2 - H1	O2 - H2	O1 - H2
Å	1,33	1,58	1,57	1,00	1,07	1,74

$H_2O$	$H_3O^+$
Заряд на O: $-0,6188$	Заряд на O: $-0,122$
Заряд на H: $+0,3094$	Заряд на H: $+0,374$
Відстань O - H: $0,95$ Å	Відстань O - H: $1,04$ Å
Потенціал йонізації: $11,906$	Потенціал йонізації: $22,869$
Спорідненість до електрона: $4,068$	Спорідненість до електрона: $-6,346$

Рис. 13. Геометрія активованого комплексу  $[CH_3CO-O-Ser] - H_2O$ .



Також розглянули реакцію гідролізу метилацетату в присутності сірчаної кислоти. З'ясували, що перша стадія ацилювання відбувається з  $\Delta H_{\text{реакци}} = +5,8$  кДж/моль,  $\Delta S_{\text{реакци}} = -12,1$  Дж/моль·К,  $\Delta F_{\text{реакци}} = +9,6$  кДж/моль. Друга стадія деацилювання характеризується такими термодинамічними параметрами:  $\Delta H_{\text{реакци}} = +3,8$  кДж/моль,  $\Delta S_{\text{реакци}} = 29,3$  Дж/моль·К,  $\Delta F_{\text{реакци}} = -5,0$  кДж/моль. Сумарна реакція:

$$\Sigma \Delta F_{\text{реакци}} = +4,6 \text{ кДж/моль}; K = \exp\left(-\frac{\Delta F}{RT}\right) = 0,16.$$

Активаци́йні параметри реакції ацилювання:  $\Delta H^\ddagger = 143,1$  кДж/моль,  $\Delta S^\ddagger = 42,2^\circ$  Дж/моль·К,  $\Delta F^\ddagger = \sim 130$  кДж/моль.

Активаци́йні параметри реакції деацилювання:  $\Delta H^\ddagger = 43,1$  кДж/моль,  $\Delta S^\ddagger = 34,7$  Дж/моль·К,  $\Delta F^\ddagger = 32,6$  кДж/моль.

Порівнюючи кінетику гідролізу метилацетату в присутності сірчаної кислоти, треба зазначити, що процес деацилювання відбувається з такими самими кінетичними параметрами, як і у випадку *Серину*. Проте, енергія активації для  $H_2SO_4$  майже вдвічі більша, а ентропія активації надто мала.

З величини  $\Delta F^\ddagger$  видно, що лімітуючою стадією в реакції гідролізу метилацетату сірчаною кислотою є стадія утворення ацилпродукту, тоді як для *Серину* спостерігаємо зворотню картину. Ймовірно, не можна однозначно стверджувати про те, що для всіх реакцій гідролізу ефірів різними субстратами лімітуючою стадією є реакція утворення проміжного продукту (ацилферменту).

Квантово-хімічні розрахунки засвідчують, що насправді в активній частині ферменту існують водневі зв'язки, завдяки яким збільшується нуклеофільність реакційного атома кисню *Серину*. Ці зв'язки значною мірою визначають механізм утворення ацилферменту і впливають на значення їхніх кінетичних параметрів ферментативного каталізу і саму геометрію конформерів по шляху реакції.

З цього можна зробити такі висновки.

Реакція утворення проміжного продукту ацилхімотрипсину не є елементарною (як це описано в літературі [16]), а складається, ймовірно, з таких стадій:

- 1) водневий зв'язок серинова група – імідазольна група  $O-H\dots N$  дещо видовжується; ендотермічно утворюється комплекс *Міхаеліса*;
- 2) екзотермічний перехід атома водню до атома азоту (імідазольної групи *His*) (конформер  $\alpha$ );
- 3) утворення активованого комплексу реакції ацилювання (2);
- 4) перетворення активованого комплексу в комплекс ацилферменту (конформер  $\beta$ ), який переходить у конформер  $\gamma$ , і остаточно в проміжний продукт (ацилхімотрипсин).

Тобто реакцію ацилювання *Хімотрипсину* можна подати за схемою:

фермент + метилацетат  $\leftrightarrow$  комплекс *Міхаеліса*  $\leftrightarrow$  конформер  $\alpha$   $\leftrightarrow$  конформер  $\beta$   $\leftrightarrow$  конформер  $\gamma$   $\leftrightarrow$  ацилфермент.

Отже, реакція утворення ацилхімотрипсину складається з низки конформаційних перетворень самих реагентів по шляху реакції.

Проте у нас є деякі сумніви щодо загальноприйнятих позицій утворення самого комплексу *Міхаеліса*, які не можуть бути вирішені шляхом напівемпіричних розрахунків. Прийнято, що енергії процесу адсорбції субстрату на активному центрі ферменту достатньо для утворення комплексу *Міхаеліса*, який потребує досить

високої енергії утворення. Сумнівно, щоб фізична адсорбція змогла забезпечити таку енергетику.

Як свідчить практика квантово-хімічних розрахунків таких систем, взаємодія в них відбувається з досить низькими енергіями активації, проте і з незначними тепловими ефектами, які не здатні ініціювати утворення комплексу *Mixaelica*.

До такого комплексоутворення може привести хімічна адсорбція, або якийсь інший підхід. Наприклад, субстрат адсорбується на активній частині і виводить з рівноважного стану.

Кожний фермент, окрім реакційних центрів, має суттєву білкову частину. Вільна енергія ферменту є в рівноважному неробочому стані і є відносно стабільною; тобто фермент є з мінімальною вільною енергією. При адсорбції субстрату на активному центрі внаслідок взаємодії значно міняється конформація ферменту. Результатом цього є зміни невалентних і валентних зв'язків у молекулі, що призводить до збільшення вільної енергії системи, яка розподіляється між зв'язками системи, в тім числі і на реакційному центрі. Така збурена система ферменту приводить до короткотривалого хімічного акту з утворенням продуктів плюс вільний фермент, який має вихідну конформацію, яка знову збурюється субстратом.

Теоретично ця гіпотеза може бути підтверджена квантово-хімічними розрахунками на основі теорії збурень.

Можливо позитивний результат про розподіл енергії збуреної системи можна одержати відповідно до теорії *ППКМ* [17]. Згідно з цією теорією перетворення комплексу фермент–субстрат, як відомо, пов'язане з перерозподілом енергії між різними степенями свободи. Проте нульова енергія збуреного комплексу й активованого комплексу, а також потенціальна енергія зв'язків, які утворюють активний комплекс, не підлягають такому розподілу. Залишкові енергії збуреного комплексу й активованого комплексу називають незв'язаними енергіями. Різні ступені свободи відіграють різну роль в обміні енергії. Адіабатичні ступені свободи практично не передають енергії зв'язків, які розриваються, внаслідок малої ймовірності передачі енергії із зовнішніх ступенів свободи на внутрішні ступені, що відповідають трьом оберतालним і трьом поступальним рухам системи як цілого.

Внутрішні ступені свободи будуть складатися з активних і неактивних ступенів свободи. Активні ступені свободи – це ступені без обмежень енергії зв'язків, які утворюються або розриваються, а неактивні ступені свободи можуть передавати енергію зв'язків тільки тоді, коли активний комплекс є активованим комплексом.

Отже, схематично реакцію ініціювання ферменту субстратом можна подати за схемою:

фермент (домен) +  $H_2O$  → сольват – фермент + субстрат → збурений фермент – субстрат (нова конформація) → фермент – субстрат з розподіленою енергією по степенях свободи в комплексі *Mixaelica* → активований комплекс → продукти + фермент.

В літературі найбільш суттєвими причинами прискорення ферментативних реакцій, порівняно з гомогенними каталітичними процесами, є такі:

- 1) сорбційна взаємодія з білком бокових субстратних груп пришвидшує реакцію в  $10^7$  разів;
- 2) поліфункціональний каталіз (загальний кислотно–основний каталіз) може привести до прискорення реакції в 10 разів;

3) мікроефекти середовища активного центру можуть змінювати швидкість каталізу на десятки порядків.

Ймовірно, дуже важливу роль у процесах ферментативного каталізу відіграють мікроефекти середовища активного центру. Швидкість каталізу в таких випадках може змінюватися на десятки порядків. Однак у цьому напрямі майже нічого не зроблено.

### ВИСНОВКИ:

Проведено квантово-хімічне моделювання реакції гідролізу метилацетату в процесах ферментативного каталізу Хімотрипсином, на підставі якого запропоновано найбільш імовірний механізм проходження процесу, до якого входить стадія утворення проміжного продукту – ацилхімотрипсину. З'ясовано, що утворення проміжного продукту ацилхімотрипсину не є елементарною реакцією, а складається з низки конформаційних перетворень самих реагентів по шляху реакції. Доведено, що будова активного центру Хімотрипсину, прийнятого в літературі, підтверджується проведеними обчисленнями. Оцінені кінетичні параметри реакцій утворення ацилсполук та їхнього гідролізу для обох видів каталізу. Показано, що утворення ацилхімотрипсину відбувається через низку проміжних комплексів, зумовлених конформаційними переходами, які спричинені водневими зв'язками Хімотрипсину і залежать від зміщення атома водню активної групи Серину. Доведено, що стабілізація активованих комплексів реакцій ацилювання і деацилювання у ферментативному та гомогенному каталізі значно залежить від величини зарядів реакційного центру, що позначається на значеннях кінетичних параметрів таких реакцій.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Blow D. M., Steitz T. A.* X-ray diffraction studies of enzymes // *Ann. Rev. Biochem.* – 1970. – Vol. 39. – P. 63–100.
2. *Matthews B. W., Sigler P. B., Henderson R., Blow D. M.* Three-dimensional Structure of Tosyl- $\alpha$ -chymotrypsin // *Nature.* – 1967. – Vol. 214. – P. 652–656.
3. *Henderson R. J.* Structure of crystalline  $\alpha$ -chymotrypsin: IV. The structure of indoleacryloyl- $\alpha$ -chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme // *Mol. Biol.* – 1970. – Vol. 54. – P. 341–354.
4. *Birktoft J. J., Blow D. M., Henderson R., Steitz T. A.* The Structure of  $\alpha$ -Chymotrypsin // *Phil. Trans. Roy. Soc. (London).* – 1970. – Vol. B 257. – P. 67–76.
5. *Miller Ch. G., Bender M. L.* Direct observation of an acyl-enzyme intermediate in the  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of a specific substrate at neutral pH // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1968. – Vol. 90. – P. 6850–6852.
6. *Бернхард С.* Структура и функция ферментов. – М.: Мир, 1971.
7. *Hess G. P., McConn J., Ku E., McConkey G.* Studies of the Activity of Chymotrypsin // *Phil. Trans. Roy. Soc. (London).* – 1970. – Vol. B 257. – P. 89–104.
8. *Bernhard S. A., Gutfreund H.* Steps in the Reactions of Proteolytic Enzymes with Their Substrates // *Phil. Trans. Roy. Soc.* – 1970. – Vol. B 257. – P. 105–110.
9. *Himoe A., Brandt K., Hess G. P.* On the relationship between the conformation and the catalyzed reactivity of acyl-chymotrypsin // *J. Mol. Biol.* – 1971. – Vol. 55. – P. 215–230.
10. *Мосолов В. В.* Протеолитические ферменты. – М.: Наука, 1971. – 414 с.

11. *Cunningham L.* The Structure and Mechanism of Action of Proteolytic Enzymes // Comprehensive Biochem. – 1965. – Vol. 16. – P. 85–188.
12. *Bender M. L., Kezdy F. J.* The Current Status of the  $\alpha$ -Chymotrypsin Mechanism // J. Amer. Chem. Soc. – 1964. – Vol. 86. – P. 3704–3714.
13. *Березин И. В., Мартинек К.* // В сб.: Структура и функции ферментов – Изд-во МГУ, 1972.
14. *Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S.* Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin // Nature – 1969. – Vol. 221. – P. 337–339.
15. Реакционная способность и пути реакции [Под ред.: *Клопман Г.*] – М.: Мир, 1977. – 383 с.
16. *Березин И. В., Мартинек К.* Основы физической химии ферментативного катализа – М.: Вышш. шк., 1978. – 350 с.
17. *Стенухович А. Д., Улицкий В. А.* Кинетика и термодинамика радикальных реакций крекинга – М.: Химия, 1975. – 255 с.

## SUMMARY

*Anatoly TUROVSKY, Andry KYTSYA, Liliya BAZYLYAK*

### QUANTUM-CHEMICAL MODELING OF THE KINETICS AND CHEMICAL MECHANISM OF THE METHYL ACETATE HYDROLYSIS IN REACTIONS OF THE ENZYMATIC AND HOMOGENEOUS CATALYSIS BY CHEMO-TRYPSIN AND SERINE

*L.M. Lytvynenko institute of physical-organic chemistry and coal chemistry  
National Academy of Science of Ukraine  
3a Naukova Str., 79053 Lviv, Ukraine;  
e-mail: andriy\_kytsya@yahoo.com; bazyljak.L.I@nas.gov.ua*

It has been done the quantum-chemical modeling of the methyl acetate hydrolysis reaction in the processes of enzymatic and homogeneous catalysis by Chemotrypsin and Serine respectively. It was shown, that the structure of an active center of the Chemotrypsin taken in references is proved by our calculations. It were estimated the kinetic parameters for the reactions of acyl compounds formation and also of their hydrolysis for both types of the catalysis. It was shown, that the formation of acylchemotrypsin proceeds via a series of the intermediate complexes, caused by the conformation transition, which, in a great measure, caused by the hydrogen bonds of the Chemotrypsin and depend on the journey of Serine active group hydrogen atom. It was established, that the stabilization of the activated complexes of the acidulating and deacidulating reactions in enzymatic and homogeneous catalysis in a great measure depends on a value of the charges of the reactive center, that is indicated on the values of the kinetic parameters of such reactions. It has been calculated the thermodynamics of the elementary stages for the acidulating and deacidulating reactions.

Keywords: quantum-chemical modeling, enzymatic catalysis, homogeneous catalysis, methyl acetate hydrolysis, acidulating and deacidulating reactions.

## РЕЗЮМЕ

*Анатолій ТУРОВСЬКИЙ, Андрій КИЦЯ, Лілія БАЗЫЛЯК*

### КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ И МЕХАНИЗМА ГИДРОЛИЗА МЕТИЛАЦЕТАТА В РЕАКЦИЯХ ФЕРМЕНТАТИВНОГО И ГОМОГЕННОГО КАТАЛИЗА ХИМОТРИПСИНОМ И СЕРИНОМ

*Институт физико-органической химии и углекислоты им. Л. М. Литвиненка НАН Украины,  
ул. Научная, 3<sup>а</sup>, 79053 Львов, Украина  
e-mail: andriy\_kytsya@yahoo.com; bazyljak.L.I@nas.gov.ua*

Проведено квантово-хімічне моделювання реакції гідролізу метилацетату в процесах ферментативного і гомогенного каталізу Химотрипсином і Серином відповідно. Показано, що строєння активного центра Химотрипсина, прийнятого в літературі, підтверджується нашими розрахунками. Оцінені кінетичні параметри реакцій утворення ацилсполучень і їх гідролізу для обох видів каталізу. Показано, що утворення ацилхимотрипсина відбувається через ряд проміжочних комплексів, обумовлених конформаційними переходами, які викликані водородними зв'язками Химотрипсина і залежать від вояжа атома водороду активної групи Серина. Доказано, що стабілізація активованих комплексів реакцій ацилювання і деацилювання в ферментативному і гомогенному каталізі в значительній мірі залежить від величини зарядів реакційного центра, що сказується на значеннях кінетичних параметрів таких реакцій. Розрахована термодинаміка елементарних стадій реакцій ацилювання і деацилювання.

Ключевые слова: квантово-хімічне моделювання, ферментативний катализ, гомогенний катализ, гідроліз метилацетату, реакції ацилювання і деацилювання.

Надійшла 02.04.2012.

Після доопрацювання 16.05.2012.

Прийнята до друку 20.02.2013.