

Lipaze katalizuojamos reakcijos kinetikos kompiuterinis modeliavimas

Jurgita DABULYTĖ-BAGDONAVIČIENĖ^{1,2}, Feliksas IVANAUSKAS^{2,3},
Valdemaras RAZUMAS⁴

¹ Kauno Technologijos Universitetas, Fundamentaliųjų mokslų fakultetas
Studentų g. 50, LT-51368 Kaunas

² Vilniaus Universitetas, Matematikos ir informatikos fakultetas
Naugarduko g. 24, LT-03225 Vilnius

³ Matematikos ir informatikos institutas
Akademijos g. 4, LT-08663 Vilnius

⁴ Biochemijos institutas

Mokslininkų g. 12, LT-08662 Vilnius

el. paštas: jurgita.dabulyte@ktu.lt; feliksas.ivanauskas@maf.vu.lt; vrazumas@bchi.lt

Santrauka. Straipsnyje nagrinėjama paprastų netiesinių diferencialinių lygčių sistema, kuri aprašo lipaze katalizuojamos askorbo rūgšties palmitato hidrolizės kinetiką. Ši sistema buvo sprendžiama analitiškai ir gautas sistemos sprendinys formulių pavidalu. Remiantis apskaičiuotu sprendiniu buvo ištirta pradinio srovės augimo greičio priklausomybė nuo įvairių parametrų. Palyginti eksperimentiniai [3] ir modeliavimo rezultatai.

Raktiniai žodžiai: kompiuterinis modeliavimas, fermentinės reakcijos kinetika, lipazė.

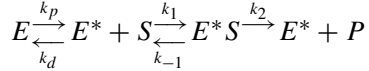
Įvadas

Veikiant natūralios aplinkos veiksniams bei sutrikus pusiausvyrai tarp laisvųjų radikalų susidarymo organizme ir ten veikiančių apsauginių antioksidantų sistemų, gali pasireikšti oksidacinis stresas, skatinantis ligų atsiradimą. Laisvieji radikalai pažeidžia audinius, oksiduodami baltymus, lipidus ir DNR. Dėka antioksidantų (pvz. L-askorbo rūgšties (vitamino C)) žmogaus organizmas yra apsaugomas nuo oksidacinio poveikio. Sukūrus optimaliomis sąlygomis veikiančią askorbo rūgšties elektrokatalizinės oksidacijos ant feroceno (Fc) funkcinę grupę turinčių savitvarkių monosluoksnių sistemą galima pritaikyti hidrolizuojančio fermento (*Thermomyces lanuginosus* lipazės, TLL) aktyvumo ir jo substrato (askorbo rūgšties palmitato, ARP) koncentracijos elektrocheminiam nustatymui. Šiame straipsnyje nagrinėjama maisto papildo – ARP ir TLL sistema. ARP yra alternatyvus vitamino C šaltinis. Lipazės plačiai naudojamos maisto, tekstilės, odos, kosmetikos, popieriaus pramonėje [2]. Platus lipazių praktinis pritaikymas reikalauja patikimų ir greitų fermento aktyvumo nustatymo metodų. Biochemijos instituto darbuotojai yra pasiūlę naują amperometrinių lipazės aktyvumo nustatymo metodą [5], kuriame sukamasis diskinis Au elektrodas modifikuojamas redokso aktyviuoju savitvarkiu monosluoksniu, yra talpinamas į 0.01 M fosfatinį buferį, turintį 0.1 M NaClO₄ ir 0.25% Tritono X-100 (pH = 7.0, 40°C). Prie anodinių elektrodo po-

tencialų, ne tiesiogiai ant Au, bet per savitvarkį monosluoksnį vyksta askorbo rūgšties elektrooksidacija [3]. Pagrindinė šio darbo užduotis yra kompiuterinis nagrinėjamos sistemos modeliavimas, bei eksperimentinių rezultatų palyginimas su modeliuotais.

1. Modelis

Fermentinės reakcijos fazių sąlyčio riboje kinetika [6] yra aprašoma tokiu modeliu



Teigiama, kad vyksta vandenyje tirpaus fermento grįžtamas prisiskverbimas į sąlyčio paviršių, kurį sudaro Tritono X-100 micelės ir ARP. Šio proceso metu, lipazė iš E būvio pereina į E^* . Prisiskverbęs fermentas jungiasi su substrato molekule sudarydamas „Michaelis-Menten“ kompleksą E^*S . Fermentinės reakcijos metu vitaminas C (produktas) yra vandenyje tirpus ir greitai difunduoja nuo fazių sąlyčio paviršiaus.

Matematiškai šio modelio kinetiką aprašome tokia lygčių sistema:

$$[E_0] = [E] + [E^*] \cdot \frac{I}{V} + [E^*S] \cdot \frac{I}{V}, \quad (1)$$

$$\frac{d[E^*S]}{dt} = k_1[E^*][S] - (k_2 + k_{-1})[E^*S], \quad (2)$$

$$\frac{d[E^*]}{dt} = k_p[E] + (k_2 + k_{-1})[E^*S] - (k_d + k_1[S])[E^*], \quad (3)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{dc_A}{dt} = k_2[E^*S] \cdot \frac{I}{V}, \quad (4)$$

čia $[E_0]$ – pradinė bendra fermento koncentracija, $[E]$ – laisvo fermento koncentracija, $[E^*]$ – prisiskverbusio fermento koncentracija, $[E^*S]$ – prisiskverbusio fermento ir substrato komplekso koncentracija, $[S]$ – pradinė paviršinė substrato ARP koncentracija, I – terpėje esančių micelių paviršiaus plotas, V – bendras sistemos tūris, k_p – prisiskverbimo greičio konstanta, k_d – desorbcijos greičio konstanta, k_1 – E^*S komplekso susidarymo greičio konstanta, k_{-1} – E^*S komplekso skilimo greičio konstanta, k_2 – katalizinė greičio konstanta, $[P]$ – produkto koncentracija tirpale, o t – laikas.

Reakcija yra homogeniška visame tūryje, todėl erdvinės koordinatės nenagrinėjamos. Sudėjus (1)–(4) lygčių sistemos (2) ir (3) lygtis turime

$$\frac{d[E^*]}{dt} + \frac{d[E^*S]}{dt} = k_p[E] - k_d[E^*]. \quad (5)$$

Pasinaudoję (1) lygtimi gauname

$$\frac{d[E^*]}{dt} + \frac{d[E^*S]}{dt} + [E^*] \left(k_p \cdot \frac{I}{V} + k_d \right) + k_p \cdot [E^*S] \cdot \frac{I}{V} = k_p[E_0]. \quad (6)$$

Išdiferencijavę (4) lygtį pagal laiką ir po to panaudoję (2) ir (4) turime

$$\frac{d^2[P]}{dt^2} + (k_2 + k_{-1}) \frac{d[P]}{dt} = k_1 k_2 [E^*][S] \cdot \frac{I}{V}. \quad (7)$$

Išdiferencijuojame šią lygtį dar kartą pagal laiką gauname

$$\frac{d^3[P]}{dt^3} + (k_2 + k_{-1})\frac{d^2[P]}{dt^2} = k_1k_2\frac{d[E^*]}{dt} \cdot [S] \cdot \frac{I}{V}. \quad (8)$$

Irašę išraiškas

$$\begin{aligned} [E^*] &= \frac{\frac{d^2[P]}{dt^2} + (k_2 + k_{-1})\frac{d[P]}{dt}}{k_1k_2 \cdot [S] \cdot \frac{I}{V}}, & [E^*S] &= \frac{\frac{d[P]}{dt}}{k_2 \cdot \frac{I}{V}}, \\ \frac{d[E^*S]}{dt} &= \frac{\frac{d^2[P]}{dt^2}}{k_2 \cdot \frac{I}{V}}, & \frac{d[E^*]}{dt} &= \frac{(k_2 + k_{-1})\frac{d^2[P]}{dt^2} + \frac{d^3[P]}{dt^3}}{k_1k_2 \cdot [S] \cdot \frac{I}{V}} \end{aligned} \quad (9)$$

į (6) turime

$$\frac{d^3[P]}{dt^3} + \frac{d^2[P]}{dt^2} \cdot A_1 + \frac{d[P]}{dt} \cdot A_2 = A_3, \quad (10)$$

čia

$$\begin{aligned} A_1 &= k_2 + k_{-1} + k_1 \cdot [S] + k_p \cdot \frac{I}{V} + k_d, \\ A_2 &= (k_2 + k_{-1}) \cdot \left(k_p \cdot \frac{I}{V} + k_d \right) + k_1k_p \cdot [S] \cdot \frac{I}{V}, \\ A_3 &= k_p k_1 k_2 \cdot [S][E_0] \cdot \frac{I}{V}. \end{aligned} \quad (11)$$

Žinodami, kad pradinio laiko momentu $[P] = 0$ (10) lygties sprendinys yra

$$[P] = \frac{A_3}{A_2}t + \frac{A_3}{A_2}r_1(e^{-\frac{t}{r_1}} - 1) + \frac{A_3}{A_2}r_2(e^{-\frac{t}{r_2}} - 1), \quad (12)$$

kur r_1 ir r_2 yra lygties $A_2r^2 - A_1r + 1 = 0$ šaknys, t.y. $r_{1,2} = \frac{A_1 \pm \sqrt{A_1^2 - 4A_2}}{2A_2}$.

Taigi, apskaičiuojame produkto koncentraciją pagal (12) ir pasinaudoję (9) galime apskaičiuoti prasiskverbusio fermento koncentraciją, bei prasiskverbusio fermento ir substrato kompleksų koncentraciją, jei $[S] = S_0 = \text{const}$, $[E_0] = E_0 = \text{const}$:

$$\begin{aligned} [E^*] &= \frac{A_3}{A_2} \frac{\frac{1}{r_1}e^{-\frac{t}{r_1}} + \frac{1}{r_2}e^{-\frac{t}{r_2}} + (k_2 + k_{-1})(1 - e^{-\frac{t}{r_1}} - e^{-\frac{t}{r_2}})}{k_1k_2 \cdot [S] \cdot \frac{I}{V}}, \\ [E^*S] &= \frac{A_3}{A_2} \frac{1 - e^{-\frac{t}{r_1}} - e^{-\frac{t}{r_2}}}{k_2 \cdot \frac{I}{V}}. \end{aligned} \quad (13)$$

Pritaikius stacionarumo sąlygą E^* ir E^*S koncentracijų kitimui laike

$$\frac{d[E^*S]}{dt} = 0, \quad \frac{d[E^*]}{dt} = 0, \quad (14)$$

iš (1)–(4) lygčių seka, kad

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{dc_A}{dt} = \frac{k_2[E_0][S]}{\frac{k_d}{k_p} \cdot \frac{V}{T} K_m^* + K_m^* + [S]}, \quad (15)$$

čia $K_m^* = \frac{(k_2+k_{-1})}{k_1}$ paviršinė Michaelio-Menten konstanta.

Apskaičiavus produkto t.y. askorbo rūgšties koncentraciją laike randamas ARP bioelektrokatalizinės oksidacijos pradinio srovės augimo greitis, kuris yra išreiškiamas lygtimi [1]

$$\frac{dI_{kat}}{dt} = 0.62n_e F A D_A^{2/3} w^{1/2} v^{-1/6} \cdot \frac{1}{1 + \frac{P_t}{P_m}} \cdot \frac{dc_A}{dt}, \quad (16)$$

čia n_e – elektronų skaičius, F – Faradėjo konstanta, A – elektrochemiškai aktyvaus elektrodo plotas, D_A – askorbo rūgšties difuzijos koeficientas tirpale, D_m – askorbo rūgšties difuzijos koeficientas dializiniėje membranoje, kuria, saugant nuo užteršimo terpėje esančiais ARP ir Triton X-100, uždengtas Au elektrodo paviršius, δ – difuzinio sluoksnio storis prie membranos paviršiaus, δ_m – membranos storis, w – kampinis elektrodo sukimosi greitis, v – skysčio klampis, P_t – vitamino C pralaidumo koeficientas terpėje $P_t = D_A / \delta$, P_m – vitamino C pralaidumo koeficientas membranoje $P_m = D_m / \delta_m$, dc_A / dt – ARP fermentinės hidrolizės greitis, I_{kat} – katalizinės srovės stipris.

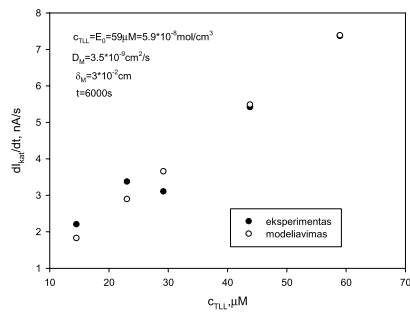
2. Rezultatai

Kompiuterinis nagrinėjamos sistemos modeliavimas buvo atliekamas su tokiomis parametru reikšmėmis: $F = 9.65 \cdot 10^4$ C/mol, $[E_0] = 2.35 \cdot 10^{-8}$ mol cm⁻³, $[S] = 6.7 \cdot 10^{-12}$ mol cm⁻², $I = 7.5 \cdot 10^5$ cm², $V = 10$ cm³, $n_e = 2$, $A = 0.08$ cm², $D_A = 6.5 \times 10^{-6}$ cm²/s, $D_m = 6.5 \times 10^{-7}$ cm²/s, $\delta = 4.3 \cdot 10^{-3}$ cm, $\delta_m = 3 \cdot 10^{-3} - 3 \cdot 10^{-2}$ cm, $w = 10.5$ s⁻¹, $v = 0.01$ cm²/s, $k_p = 0.025$ cm/s, $k_d = 100$ s⁻¹, $k_1 = 1.12 \cdot 10^9$ cm²/(mol·s), $k_{-1} = 10$ s⁻¹, $k_2 = 75$, s⁻¹ [4].

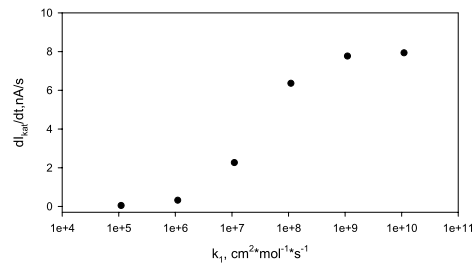
Eksperimentiškai registruojant ARP bioelektrokatalizinės oksidacijos (tariama ARP koncentracija 1 mM) smailės srovės pradinį didėjimo greitį (dI_{kat} / dt), nustatyta šio elektrocheminio parametro vertės priklausomybė nuo tariamos (priimant, kad visas preparate esantis baltymas yra aktyvi TLL forma) TLL koncentracijos terpėje (1 pav.) [3]. Eksperimentuose naudotas sukamasis diskinis Au elektrodas, padengtas FcC₄COOC₉SH monosluoksniu ir dializine membrana. Elektrochemiškai aktyvaus elektrodo (Au) plotas yra $A = 0.08$ cm². Kampinis diskinio elektrodo sukimosi greitis $w = 10.5$ s⁻¹. Kompiuteriniai skaičiavimai atlikti, kai askorbo rūgšties difuzijos koeficientas membranoje $D_m = 3.5 \cdot 10^{-9}$ cm²/s ir dializinės membranos storis $\delta_m = 3 \cdot 10^{-2}$ cm. Greičių konstantos: $k_1 = 1.12$ cm² mol⁻¹ s⁻¹, $k_{-1} = 10$ s⁻¹, $k_p = 100$ cm/s, $k_d = 0.025$ s⁻¹, $k_2 = 75$ s⁻¹.

Iš 1 pav. matyti, kad eksperimentiniai ir modeliavimo rezultatai yra artimi ir rezultatai rodo bioelektrokatalizinio proceso greičio tiesinę priklausomybę nuo fermento koncentracijos.

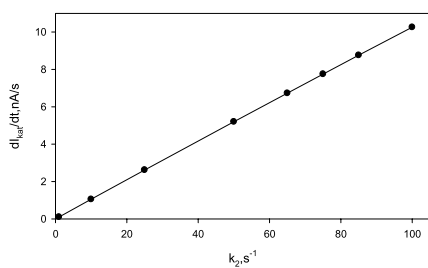
Kadangi atliekant eksperimentus yra nežinomos prasiskverbimo, desorbcijos, E^*S komplekso susidarymo, E^*S komplekso skilimo, katalizinė greičių konstantos, todėl



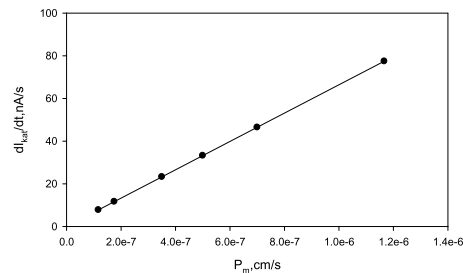
1 pav. ARP bioelektrokatalizinės oksidacijos pradinio srovės augimo greičio priklausomybė nuo tariamos TLL koncentracijos terpėje.



2 pav. $E * S$ komplekso susidarymo greičio konstantos k_1 , $\text{cm} \cdot \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ įtaka pradiniam srovės augimo greičiui.



3 pav. Katalizinės greičio konstantos k_2 , s^{-1} įtaka pradiniam srovės augimo greičiui.



4 pav. Vitamino C pralaidumo koeficiento membranoje priklausomybė pradiniam srovės augimo greičiui.

svarbu iširti šių konstantų įtaką pradiniam srovės augimo greičiui arba produkto koncentracijai. $E * S$ komplekso susidarymo greičio konstantos $k_1 \text{ cm} \cdot \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ įtaka pradiniam srovės augimo greičiui, bei katalizinės greičio konstantos $k_2 \text{ s}^{-1}$ įtaka pradiniam srovės augimo greičiui yra pateiktos 2 ir 3 pav. Tariama TLL koncentracija $59 \mu\text{M}$ ir tariama ARP koncentracija 3 mM . Pastebėta, kad dI_{kat} / dt tiesiškai priklauso nuo katalizinės greičio konstantos. Prasiskverbimo, desorbcijos, $E * S$ komplekso skilimo greičio konstantos įtakos pradiniam srovės augimo greičiui neturi.

Tiriama vitamino C pralaidumo koeficiento membranoje priklausomybė pradiniam srovės augimo greičiui ir produkto koncentracijai. Keičiamas membranos storis $\delta_m = \{3 \cdot 10^{-2}, 2 \cdot 10^{-2}, 10^{-2}, 7 \cdot 10^{-3}, 5 \cdot 10^{-3}, 3 \cdot 10^{-3}\}$, paliekant askorbo rūgšties difuzijos koeficientą pastovų $D_m = 3.5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ (toku būdu gaunami skirtingi vitamino C pralaidumo koeficientai membranoje). Vitamino C pralaidumo koeficientas terpėje $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm/s}$. Tariama TLL koncentracija $59 \mu\text{M}$ ir tariama ARP koncentracija 3 mM .

Iš 4 pav. matyti, kad pradinės srovės augimo greičio priklausomybė nuo vitamino C pralaidumo koeficiento membranoje yra tiesinė, o produkto t.y. vitamino C koncentracija nuo pralaidumo koeficiento membranoje nepriklauso.

3. Išvados

Iš eksperimentinių ir modeliavimo rezultatų galima padaryti tokias išvadas:

Naudojant R. Verger [6] fermentinės reakcijos kinetikos modelį galime atlikti kompiuterinę *Thermomyces lanuginosus* lipazės sistemos aktyvumo analizę.

Tiek eksperimentiškai, tiek skaitmeniškai nustatyta askorbo rūgšties palmitato bioelektrokatalizinės oksidacijos smailės srovės pradinio didėjimo greičio (dI_{kat} / dt) tiesinė priklausomybė nuo tariamos TLL koncentracijos terpėje. Modeliavimo rezultatai artimi eksperimentiniams.

Patvirtinta, kad dI_{kat} / dt tiesiškai priklauso nuo katalizinės greičio konstantos vertės. Prasiskverbimo, desorbcijos, E^*S komplekso skilimo greičio konstantos įtakos pradiniam srovės augimo greičiui neturi.

Nustatyta, kad pradinės srovės augimo greičio priklausomybė nuo vitamino C pralaidumo koeficiento membranoje yra tiesinė, o produkto, t.y. vitamino C koncentracija nuo pralaidumo koeficiento membranoje nepriklauso.

Literatūra

1. D.A. Gough, J.K. Leypoldt. Membrane-covered, rotated disc electrode. *Anal. Chem.*, 51:439–444, 1976.
2. A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc. Lipases and their industrial applications. *Appl. Biochem. Biotech.*, 118:155–170, 2004.
3. B. Kazakevičienė. Askorbo rūgšties ir jos darinių (bio)elektrokataliziniai virsmai ant aukso paviršiaus modifikuoto feroceno grupę turinčiais monosluoksniais. Biochemijos institutas, Vilnius, 2006.
4. M. Puida, F. Ivanauskas, I. Ignatjev, G. Valinčius, V. Razumas. Computational modeling of the amperometric bioanalytical system for lipase activity assay: A time-dependent response. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, 12(2):245–251, 2007.
5. G. Valinčius, I. Ignatjev, G. Niaura, M. Kažemėkaitė, Z. Talaikytė, V. Razumas, A. Svendsen. Electrochemical method for the detection of lipase activity. *Anal. Chem.*, 77:2632–2636, 2005.
6. R. Verger, M.C.E. Mieras, G.H. De Haas. Action of phospholipase A at interfaces. *J. Biolog. Chem.*, 248:4023–4034, 1973.

SUMMARY

J. Dabulytė-Bagdonavičienė, F. Ivanauskas, V. Razumas. Computational modeling of the kinetics of lipase catalyzed reaction

The kinetics of lipase catalyzed reaction (hydrolysis of ascorbic acid palmitate), described by the system of simple non-linear differential equations was presented. The system was solved analytically and the result expressed by formula. With reference to calculated solution the current dependence on various parameters was performed. The comparison of experiments [3] and calculated results was made.

Keywords: computer simulation, kinetics of enzyme reaction, lipase.