

CERCETARI PRIVIND INFLUENTA UNOR FACTORI ASUPRA ACTIVITATII CATALITICE A α -CHIMOTRIPSINEI IN MICELE INVERSE



Gabriela PAUN*, Veronica MOROEANU*, Elena NEAGU*, Gabriel Lucian RADU**

* Institutul National de Cercetare-Dezvoltare pentru Ştiinţe Biologice - Centrul de Bioanaliză - Splaiul Independenţei nr. 296, Bucuresti, Romania, Tel/Fax: + 40-21-223.90.70; + 40-21-220.09.00; <http://bioanaliza.dbio.ro>
 ** Universitatea Politehnica Bucuresti – Splaiul Independenţei nr.313, Bucuresti



Tablel 1 A.E. a α -chimotripsinei functie de gradul de hidratare

REZUMAT

Enzimologia clasica a fost axata pe studiul enzimelor libere; cele mai valoroase experimente cu scopul de a elucida structura centrilor catalitici si mecanismele fizico-chimice ale biocatalizei au fost intreprinse doar pe enzime izolate din celulele vii intr-o forma cat mai pura.

Enzimologia moderna ia in considerare interactiunea in timp si spatiu a componentilor individuali ai celulei (inclusiv enzimele) avand loc contacte macromoleculare mult mai multe decat ne-am putea imagina pe baza experimentelor.

Se incearca gasirea unor modele adecvate care sa poata simula structura si functiile fragmentelor de celule continand enzime si in primul rand ale membranelor biologice.

Utilizarea micelilor inverse ca mediu de reactie alternativ pentru reactii enzimatice a inceput in urma cu aproape doua decenii, in paralel cu rectiile enzimatice in solventi organici nemiscibili in apa. Micellele inverse - formate prin dizolvarea unui surfactant intr-un solvent organic, in prezenta unei cantitati mici de apa - sunt optic transparente si aproape orice enzima (pot fi utilizate chiar si multienzime) poate fi solubilizata in micela fara o pierdere serioasa a activitatii specifice.

Surfactantii protejeaza enzimele incluse in mijlocul apos de efectul denaturant al solventilor organici. Enzimele incluse in micela inverse pot actiona asupra substraturilor polare sau nepolare fiind posibile astfel reactiile de transformare a unui compus nepolar sub actiunea enzimei solubilizate in mediul micelar.

O aplicatie importanta a sistemelor micelare inverse este utilizarea lor ca medii de reactie implicand asimilarea ca nanoreactoare.

In acesta lucrare a fost luata in studiu ca enzima α -chimotripsina inclusa in micela inverse de AOT/izooctan. S-a urmarit spectrofotometric activitatea catalitica a α -chimotripsinei in mediu apos si micelar utilizand ca substrat N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester. Se constata, din datele experimentale obtinute ca activitatea enzimatica este comparabila in mediu apos (48.7 U/mg) si micelar fiind influentata semnificativ de gradul de hidratare si de cresterea temperaturii de reactie.

Mediu de reactie	Grad de de hidratare, w_0	Activitate enzimatica U/mg
Mediu apos, pH 7,8, 25°C	w_0	48.7
Concentratie enzimatica de 1.66 $\mu\text{g/ml}$, 1M, 25°C	5	38.56
Concentratie enzimatica 1.66 $\mu\text{g/ml}$, 1M, 25°C	8	48.5
Concentratie enzimatica 1.66 $\mu\text{g/ml}$, 1M, 25°C	9	154.04
Concentratie enzimatica 0.66 $\mu\text{g/ml}$, 1M, 25°C	10	118.25
Concentratie enzimatica 0.66 $\mu\text{g/ml}$, 1M, 25°C	11	126.03
Concentratie enzimatica 0.66 $\mu\text{g/ml}$, 1M, 25°C	12	132.26
Concentratie enzimatica 0.66 $\mu\text{g/ml}$, 1M, 25°C	15	142.99
Concentratie enzimatica 1.66 $\mu\text{g/ml}$	20	70.8

Tablel 2 AE a α -chimotripsinei functie de temperatura mediului de reactie

Mediu de reactie	Temperatura (°C)	Activitate enzimatica (U/mg)
AOT 0,1M, Concentratie enzimatica de 0.66 $\mu\text{g/ml}$ si $w_0 = 9$	20	186.09
	25	154.04
	30	382.46
	35	178.78
	40	107.36
AOT 0,1M, Concentratie enzimatica de 0.66 $\mu\text{g/ml}$ si $w_0 = 10$	20	160.11
	25	118.25
	30	411.72
	35	329.87
	40	175.51
AOT 0,1M, Concentratie enzimatica de 0.66 $\mu\text{g/ml}$ si $w_0 = 11$	20	163.38
	25	126.03
	30	383.24
	35	329.8
	40	206.9
AOT 0,1M, Concentratie enzimatica de 0.66 $\mu\text{g/ml}$ si $w_0 = 12$	20	163.22
	25	132.26
	30	322.09
	35	314.31
	40	258.29

PARTE EXPERIMENTALA

Pentru determinarea activitatii α -chimotripsinei s-a urmarit hidroliza benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) prin urmarirea cresterii absorbantei la 256 nm.

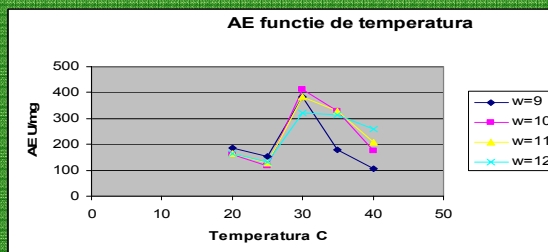
Cinetica acestei reactii a fost studiata masurand variatia absorbantei pentru 300s la $\lambda = 256$ nm. Activitatea enzimatica a fost calculata dupa formula :

$$A[U/mg] = (dA/dt \times V_{\text{total}} \times 1000) / \epsilon \times V_{\text{enzime}}, \quad \epsilon = 964 \text{ Lx mol}^{-1}\text{x cm}^{-1}$$

Micellele inverse au fost formate prin dizolvarea surfactantului anionic bis(2-etyl/hexyl) sulfosuccinat de sodiu (AOT) in izooctan si prin agitare energica in prezenta unor cantitati foarte mici de tampon apos Tris HCl pH 7.8.

Enzima a fost introdusa in sistemul micelar prin metoda injectarii.

Mediu de reactie	Observatii
Mediu apos in tampon Tris HCl, pH 7.8 0.1M, BTEE 1.07mM dizolvat in amestec apa:metanol 1:1 Concentratie enzimatica de 3,33 $\mu\text{g/ml}$	Valorile absorbantei la 256 nm se incadreaza in limita 0.3-0.6
AOT 0,1M in izooctan, BTEE dizolvat in faza organica (amestec acetoniitril : dioxan 1:1 raport de volum), w_0 variat prin tampon TrisHCl pH 7.8 0.1M la diferite temperaturi de lucru Concentratie enzimatica de 1.66 $\mu\text{g/ml}$ respectiv 0.66 $\mu\text{g/ml}$	Valorile absorbantei la 253 nm se incadreaza in limita 0.3-0.48



CONCLUZII

- Sistemul micelar invers permite urmarirea spectrofotometrica a activitatii enzimatic a α -chimotripsinei incluse cu mentinerea faptului ca se inregistreaza o usoara deplasare a maximumului de absorbtie pentru produsul de hidroliza al BTEE de la 256 nm in mediu apos la 253 nm in mediu micelar
- Cea mai buna activitate enzimatica pentru α -chimotripsina se obtine utilizand enzima proaspata dizolvata in tampon Tris HCl, 0.1M, pH 7,8; si in cel mult 12 ore de la dizolvare fiind pastrata la frigider sau pe gheata.
- Pentru toate gradele de hidratare ale sistemelor micelare studiate maximumul activitatii catalitice a α -chimotripsinei se inregistreaza la temperatura mediului de reactie de 30°C.

Referinte bibliografice

- Biswas R., Pal K.S. "Caging enzyme function: α -chymotrypsin in reverse micelle" Chemical Physics Letters, vol. 387, 221-226, 2004
- Levashov A.V., Klyachko N.L., Bogdanova N.G., Martinek K. "Fixation of a highly reactive form of α -chymotrypsin by micellar matrix". FEBS, vol.268 (1), 238-240, 1990
- Serrahero M.L.M., Cabral J.M.S. "Irreversible thermoinactivation of α -chymotrypsin in buffer and water miscible organic solvent. Comparison with a reverse micellar system". Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol.7, 191-205, 1999

Lucrarea a fost finantata din proiectul CEEX 149/2006

A 7-a editie a Seminarului National de Nanostiinta si Nanotehnologie, 20 martie 2006, Bucuresti - Academia Romana