

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 664.41+66.063.8

**Борисенко Александр Алексеевич, Брацихин Андрей Александрович,
Сарычева Людмила Александровна, Борисенко Алексей Алексеевич**

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АКТИВНОГО ЦЕНТРА СУБТИЛИЗИНА И ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА В ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ

*В статье представлены результаты квантово-химического исследования влияния электрохимически активированной воды на каталитическую активность протеолитического фермента субтилизина, продуцент – *Bacillus licheniformis*. Установлено влияние активированных дисперсионных сред на распределение зарядов атомов и электростатического потенциала активного центра молекулы субтилизина. Выявлены специфические участки, являющиеся донорами и акцепторами протонов. На молекулярном уровне изучен механизм катализа и обоснованы выводы о более высокой активности фермента в активированной среде.*

Ключевые слова: молекула субтилизина, электрохимически активированная вода, квантово-химические расчеты, электростатический потенциал, активность ферментов.

**Aleksandr Borisenko, Andrey Bratsikhin,
Ludmila Saricheva, Aleksey Borisenko**

QUANTUM-CHEMICAL ANALYSIS OF THE ACTIVE SITE OF SUBTILISIN AND IMPROVING THE EFFICIENCY OF ENZYMATIC CATALYSIS IN FOOD TECHNOLOGY

*The article presents the results of quantum-chemical study of influence of electrochemically activated water on the catalytic activity of proteolytic enzyme subtilisin, producer – *Bacillus licheniformis*. Influence of activated dispersion media on the distribution of atomic charges and electrostatic potential of the active site of the subtilisin molecule has been determined. Identified specific areas, which are donors and acceptors of protons. The mechanism of catalysis was studied at the molecular level and justifies the conclusions of the higher activity of the enzyme in an activated environment.*

Keywords: the subtilisin molecule, the electrochemically activated water, quantum-chemical calculations, electrostatic potential, the activity of enzymes.

В настоящее время производство продуктов здорового питания является стратегическим направлением большинства развитых стран мира, обеспечивающим основу здоровья и жизнедеятельности людей. Особый интерес представляет направленное регулирование функционально-технологических свойств сырья на различных этапах его переработки за счет применения ферментативного катализа, который открывает широкие возможности для разработки легко усвояемых высококачественных пищевых продуктов для ординарного и лечебно-профилактического питания. В этой связи одной из фундаментальных проблем современной биотехнологии является регулирование функциональной активности ферментов [1, 2].

Целью работы являлось исследование влияния электрохимически активированной воды на протеолитическую активность ферментного препарата Протолихетерм Г20х путем молекулярного моделирования и квантово-химического анализа. Протолихетерм Г20х представляет собой фермент-

ный препарат, продуцентом которого является термофильный спорообразующий штамм бактерий *Bacillus licheniformis* (ВКМ В-2220В). Основу ферментного препарата составляет субтилизин, относящийся к классу сериновых протеаз [3].

Квантово-химическое исследование субтилизина осуществлено на основе анализа его аминокислотной последовательности [4] и пространственной структуры [5] при размещении молекулы фермента в центре водного бокса с помощью инструментария программного продукта HyperChem [6, 7]. Оптимизация топологии молекулы белка проведена с использованием пакета программ VMD/NAMD [8, 9].

На основе геометрической оптимизации молекулы фермента в питьевой воде установлено значение минимальной потенциальной энергии системы, составляющее $-55\,738,445$ кДж/моль при среднеквадратичном градиенте $-0,385$ кДж/(Å·моль). Для определения электростатического потенциала и электронной плотности в области расположения каталитической триады Asp, His, Ser активного центра субтилизина (рис. 1) выполняли расчет частичных зарядов на атомах исследуемой молекулы фермента, используя полуэмпирический квантово-химический метод CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap) [10].

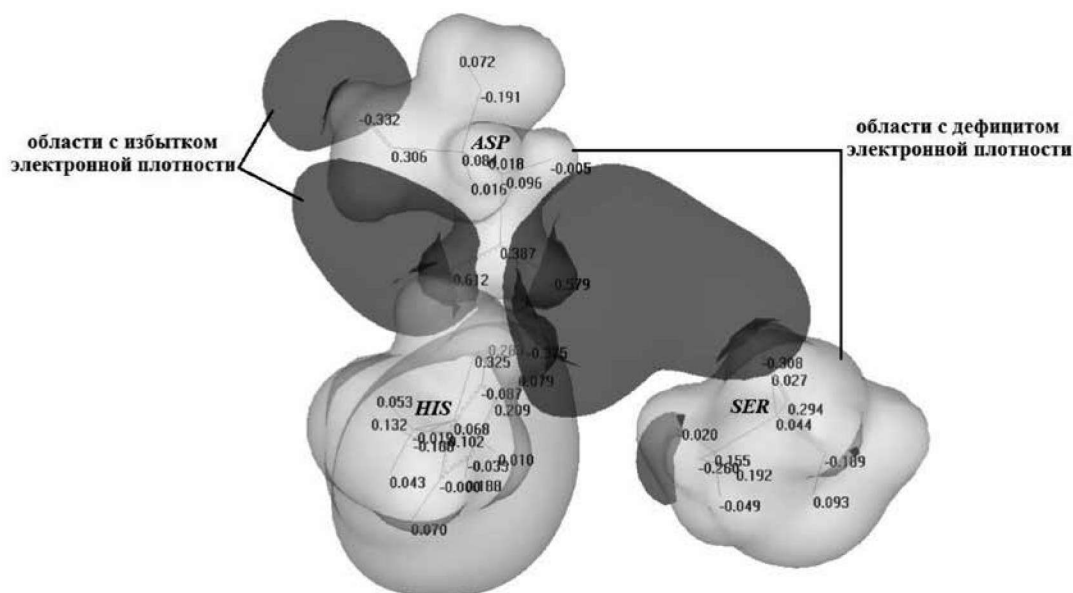


Рис. 1. Трехмерная карта распределения электростатического потенциала активного центра молекулы субтилизина в питьевой воде

На основе анализа результатов расчета частичных зарядов атомов и карты распределения электростатического потенциала активного центра молекулы субтилизина установлено, что в недиссоциированной форме карбоксильная группа аспарагиновой кислоты проявляет выраженные электрофильные свойства, а в депротонированной форме является нуклеофильным агентом с избытком электронной плотности (рис. 1). Имидазольная группа гистидина обладает выраженными нуклеофильными свойствами, являясь донором неподеленной электронной пары атома азота. В процессе взаимодействия между аминокислотными остатками активного центра имидазольная группа гистидина принимает протон от гидроксильной группы серина и приобретает положительный заряд, что приводит к образованию солевого мостика с аспарагиновой кислотой. Представленные результаты исследования молекулярной модели активного центра субтилизина согласуются с выводами других авторов о том, что остатки аспарагиновой кислоты и гистидина участвуют в процессах активации субстрата в ферментативном каталитическом цикле, благодаря их кислотно-основным свойствам [11, 12].

Важную роль в составе активного центра играет нуклеофильная группа, непосредственно участвующая в активации воды [13]. Для многих протеаз в данной роли выступает имидазольная группа гистидина. Каталитический центр ферментов рассматриваемого типа включает участок активации воды через гидроксильную (сульфгидрильную) группу серина и цепь переноса протона в виде имидазольной группы гистидина и карбоксильной группы аспарагиновой кислоты. Такая активация воды может проходить при непосредственном взаимодействии с ее молекулой или через проводник протона – имидазольное кольцо. Механизм катализа этими ферментами обычно включает промежуточное ацилирование гидроксильной группы активного центра с образованием ацилферментных интермедиатов [11].

Таким образом, в структуре активного центра субтилизина выявлены как нуклеофильные, так и электрофильные агенты, активирующие воду и действующие на субстрат. Согласованное взаимодействие нуклеофильных и электрофильных функциональных групп является основой эффективности субтилизина и ферментных препаратов на его основе.

Ферменты относятся к катализаторам, активность которых может изменяться под влиянием биологических компонентов, химических соединений и различных растворителей [14]. Следует ожидать, что использование электрохимически активированной воды в качестве растворителя может привести к изменению физико-химических характеристик активного центра фермента по сравнению с питьевой водопроводной водой.

С применением программных пакетов, используемых для молекулярного моделирования и выполнения квантово-химических расчетов молекулы субтилизина в питьевой воде проведены аналогичные исследования активного центра фермента в щелочной (католит) и кислой фракции (анолит) электрохимически активированной воды.

Минимальная потенциальная энергия молекулы фермента в результате ее геометрической оптимизации в католите составила 60 387,823 кДж/моль при среднеквадратичном градиенте 0,416 кДж/(Å·моль). Установленное изменение значения потенциальной энергии молекулы субтилизина по сравнению с питьевой водой указывает на увеличение ее реакционной способности в активированной водной среде.

Анализ карты распределения электростатического потенциала активного центра молекулы субтилизина в католите (рис. 2) указывает на усиление нуклеофильных свойств участков с высокой электронной плотностью и электрофильных характеристик группировок с низкой электронной плотностью по сравнению с результатами моделирования в питьевой воде.

При использовании щелочной фракции электрохимически активированной воды в каталитической триаде аминокислотных остатков активного центра молекулы субтилизина наблюдается перераспределение частичных зарядов атомов с увеличением отрицательного заряда на атомах кислорода карбоксильной группы аспарагиновой кислоты и положительного заряда атома водорода имидазольной группы гистидина, принимающих участие в цепи переноса протона. Зафиксировано увеличение частичного заряда атома кислорода карбоксильной группы серина.

Представленные результаты исследований позволяют утверждать, что в католите происходит увеличение протеолитической активности субтилизина под влиянием специфического распределения зарядов атомов и улучшения взаимодействия нуклеофильных и электрофильных функциональных групп в его активном центре, по сравнению со свойствами фермента, проявляемыми в питьевой воде. Установленное повышение эффективности ферментативного катализа в щелочной фракции электроактивированной воды, по всей видимости, связано с изменением энергии растворителя в процессе активации – при переходе молекулы воды в гидроксил-ион ее реакционная способность возрастает в 107 раз [11, 15].

Нами проведена оптимизация топологии молекулы субтилизина в кислой фракции электрохимически активированной воды. При этом установлено, что значение минимальной потенциальной энергии исследуемого белка в анолите близко к результатам моделирования в питьевой воде и составляет 54 817,923 кДж/моль при среднеквадратичном градиенте – 0,408 кДж/(Å·моль).

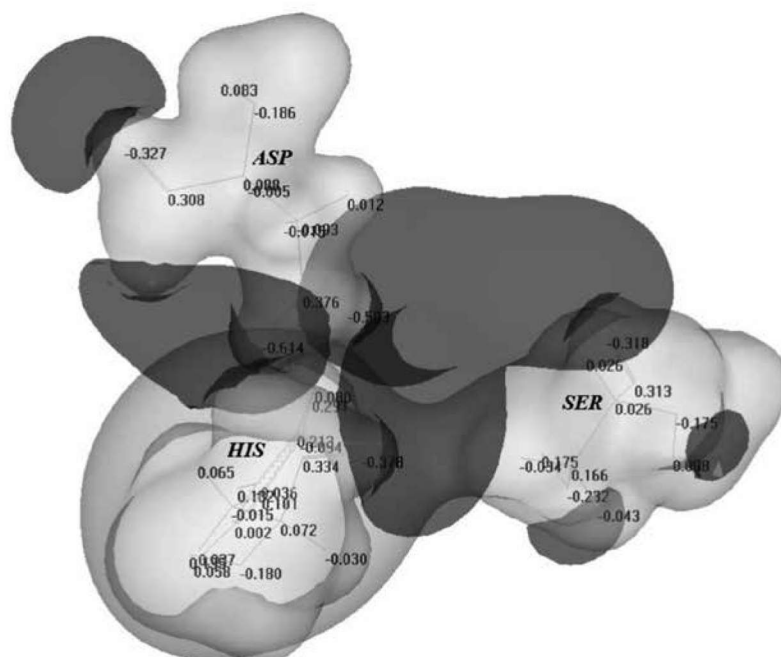


Рис. 2. Трехмерная карта распределения электростатического потенциала активного центра молекулы субтилизина в католите

Расчет зарядов на атомах аминокислотных остатков фермента позволил определить число электронов на различных атомных орбиталях и провести анализ карты распределения электростатического потенциала активного центра субтилизина в анолите (рис. 3). Проведенное квантово-химическое исследование показало, что электрофильные и нуклеофильные агенты, принимающие непосредственное участие в цепи переноса протона каталитической триады Asp, His, Ser, практически, не изменили своих свойств по сравнению с результатами моделирования молекулы субтилизина в питьевой воде. При этом зафиксировано увеличение электронной плотности в зоне карбоксильных групп всех аминокислотных остатков активного центра фермента, что может оказывать положительное влияние на степень переноса заряда в процессах активации молекул воды и субстрата.

Результаты молекулярного моделирования и квантово-химических расчетов позволяют сделать вывод о том, что ферментный препарат Протолихетерм Г20х, основную каталитическую роль в котором выполняет субтилизин, проявляет более высокую активность в католите по сравнению с питьевой водой. Это связано со спецификой распределения зарядов и электростатического потенциала молекулы субтилизина в католите, что является причиной повышения степени взаимодействия нуклеофильных и электрофильных функциональных групп в активном центре фермента.

Исследования показали, что субтилизин проявляет стабильные каталитические свойства в анолите, при этом можно ожидать увеличение протеолитической активности ферментного препарата Протолихетерм Г20х при использовании данного растворителя за счет повышения электронной плотности в области карбоксильных групп аминокислотных остатков активного центра молекулы субтилизина и ее взаимодействия с металлозависимой аминопептидазой и глутамил эндопептидазой, входящих в состав рассматриваемого фермента [16].

Таким образом, использование электрохимически активированной воды является возможным решением проблемы регулирования функциональных свойств ферментных препаратов и их эффективного применения для биомодификации сырья в пищевых технологиях.

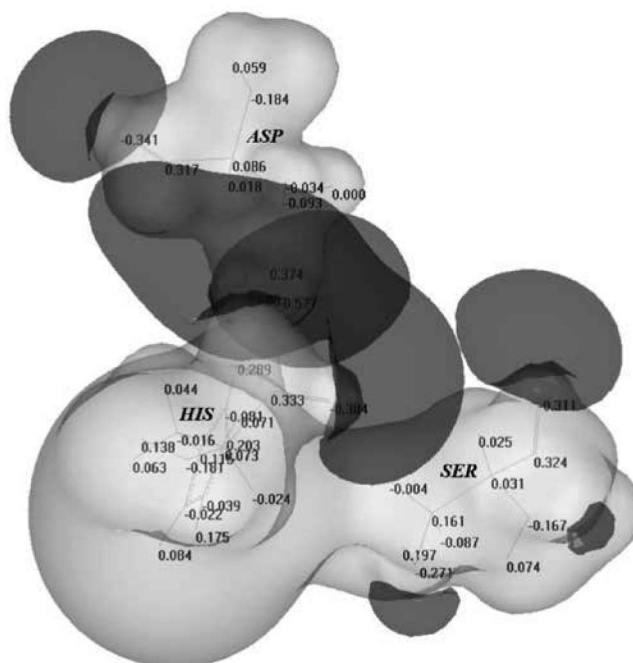


Рис. 3. Трехмерная карта распределения электростатического потенциала активного центра молекулы субтилизина в анолите

Литература

1. Холявка М. Г. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности / М. Г. Холявка, А. С. Беленова, Е. Л. Макарова, Т. А. Ковалева, В. Г. Артюхов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. Т. 11. № 7. С. 29–35.
2. Серба Е. М. Создание натуральных биокорректоров пищи для функциональных продуктов / Е. М. Серба, К. В. Рачков, Н. И. Игнатова, Л. В. Римарева, В. А. Поляков // Пищевая промышленность. 2013. № 9. С. 18–20.
3. Аникина О. М. Субтилизин Карлсберг, нативный и модифицированный, эффективный катализатор синтеза пептидной связи в органической среде / О. М. Аникина, Т. А. Семашко, Е. С. Оксенойт, Е. Н. Лысогорская, И. Ю. Филиппова // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32. № 2. С. 130–136.
4. Международная база данных последовательностей белков «Universal Protein Resource» / Европейский Институт Биоинформатики (Великобритания), Швейцарский Институт Биоинформатики, Джорджтаунский университет (США), 2002–2016. URL: <http://www.uniprot.org> (дата обращения: 11.05.2016).
5. Международный банк данных пространственных структур белков и нуклеиновых кислот «Protein Data Bank», 2013–2016. URL: <http://www.wwpdb.org> (дата обращения: 11.05.2016).
6. HyperChem Release 8.0 for Windows. Reference Manual. USA: Hypercube, Inc, 2013. 804 p.
7. Брацихин А. А., Борисенко А. А., Борисенко Л. А. Молекулярное моделирование процесса кавитационной дезинтеграции растворов NaCl // Хранение и переработка сельхозсырья. № 9. 2009. С. 10–13.
8. VMD User's Guid. Theoretical and Computational Biophysics Group, Beckman Institute for Advanced Science and Technology, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2014. 260 p.
9. NAMD User's Guid. Theoretical Biophysics Group, University of Illinois and Beckman Institute, 2015. 227 p.
10. Соловьев М. Е., Соловьев М. М. Компьютерная химия. М.: СОЛОН-Пресс, 2005. 536 с.
11. Варфоломеев С. Д., Гариев И. А., Упоров И. В. Каталитические центры гидролаз: структура и каталитический центр // Успехи химии. 2005. № 74(1). 67–83.
12. Dobson G., Wlodaver A. Catalytic triads and their relatives // Trends Biochem. Sci. 1998. № 23. P. 347–352.
13. Финкельштейн А. В. Физика белковых молекул. М.: Институт компьютерных технологий, 2014. 424 с.

14. Schmitke J. L., Stern L. J., Klivanov A. M. Comparison of x-ray crystal structures of an acyl-enzyme intermediate of subtilisin Carlsberg formed in anhydrous acetonitrile and in water // Proc Natl Acad Sci USA. 1998. № 95(22). P. 12918–12923.
15. Большаков А. С. Технологические свойства активированной воды / А. С. Большаков, Л. А. Сарычева, А. А. Борисенко, Т. П. Шаганова // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 1992. № 2. С. 56–58.
16. Дарвиш Д. М. Выделение коллагена из отходов телячьих шкур / Д. М. Дарвиш, Л. В. Кухарева, И. И. Шамолина, Н. В. Цурикова, А. П. Сеницын // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология. Вода и пищевые продукты». М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2008. С. 247.

УДК 621.382:621.315.592

**Девицкий Олег Васильевич, Сысоев Игорь Александрович,
Батищев Виталий Викторович, Васильев Виктор Александрович,
Касьянов Иван Владимирович**

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОСТРУКТУРЫ GaP / Si МЕТОДОМ ИМПУЛЬСНОГО ЛАЗЕРНОГО НАПЫЛЕНИЯ¹

Методом импульсного лазерного напыления получены гетероструктуры GaP / Si. Проанализированы методы снижения величины механических напряжений в полученных пленках, методом комбинационного рассеяния света установлено, что, применяя метод импульсного лазерного напыления при 300 °C для гетероструктуры GaP / Si, можно добиться снижения величины механических напряжений. Установлена зависимость глубины залегания p-n перехода в гетероструктуре GaP / Si при различных температурах от времени отжига, а также оптимальные параметры получения СЭ на основе гетероструктуры GaP / Si. Исследовано приборное применение гетероструктур GaP / Si в качестве кремниевого солнечного элемента с широкозонным окном GaP. Показано, что максимальное значение напряжения холостого для полученного СЭ достигает 900 мВ при значении внешней квантовой эффективности около 74,5 %.

Ключевые слова: солнечный элемент, гетероструктуры A^3B^5 / Si, импульсное лазерное напыление, широкозонное окно.

**Oleg Devitsky, Igor Sysoev, Vitaliy Batishchev, Viktor Vasiliev, Ivan Kasyanov
PREPARATION AND RESEARCH OF HETEROSTRUCTURES
GaP / Si BY PULSED LASER DEPOSITION**

Pulsed laser deposition method was heterostructure GaP / Si. The methods of reducing the magnitude of the mechanical stresses in the resulting film, Raman scattering found that using the method of pulsed laser deposition at 300 °C for heterostructure GaP / Si is possible to reduce the value of the mechanical stresses. Installed depth dependence of occurrence p-n transition in the heterostructure GaP / Si at different temperatures of the annealing time and also obtaining optimum parameters based heterostructure solar cell GaP / Si. Investigated the use of instrumentation GaP/Si heterostructures as a silicon solar cell c wide-window GaP. It is shown that the maximum open circuit voltage obtained solar cell reaches 900 mV at a value of the external quantum efficiency of about 74,5 %.

Key words: solar cell, A^3B^5 / Si heterostructures, pulsed laser deposition, wide-screen.

Широкозонные полупроводниковые соединения типа A^3B^5 на подложке GaAs являются одним из базовых материалов современной фотовольтаики, они обладают множеством неоспоримых достоинств, основным из которых является высокая эффективность (до 47 %) солнечных элементов (СЭ)

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания по проекту №2014/216, код проекта: 2516.