



Federal Science Center  
for Animal Husbandry  
named after  
Academy Member L.K. Ernst



## **SUPRAMOLECULAR BIOCHEMICAL SYSTEMS BASED ON PROTEINS AND POLYMERS**

**Zaitsev S. Yu.**

**Head of the analytical biochemistry groups,  
Department of the physiology and biochemistry of farm animals,  
Federal Research Center for Animal Husbandry  
named after Academy Member L.K. Ernst;**

**[s.y.zaitsev@mail.ru](mailto:s.y.zaitsev@mail.ru)**

## **СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ И ПОЛИМЕРОВ**

**Зайцев С. Ю.**

**рук. группы аналитической биохимии,  
отд. физиологии и биохимии с/х животных,  
ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста; Россия**

Работы по разделам 1 и 2 выполнялись при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения гос. задания 2021 года; а по разделам 3 и 4 выполнялись при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-03-00717).

## Раздел 1

Научное направление по созданию, изучению и применению супрамолекулярных биохимических систем (СБС), представляющих собой высокоорганизованные комплексы белков, липидов и других биологически активных соединений, является одним из наиболее современных и находится «на стыке» биохимии с рядом биологических и химических наук; био- и нанотехнологии; фундаментальной медицины и ветеринарии. Отдельные элементы идеологии этого направления прослеживаются в работах ведущих российских и зарубежных ученых [Афонский С.И., 1966; Овчинников Ю.А., Иванов В.Т., Шкроб А.М., 1974; Березин И.В. 1985; Кабанов В.А., Зезин А.Б. 1982-1987; Friedrich P., 1986; Kuhn H., Moebius D., 1993; Cram J, Cram M., 1994; Алиев А. А., 1997; Лен Ж.-М., 1998; Lvov Y., Moehwald H., 2000-2005, Алфимов М.В., Громов С. П., 1997-2007, Коновалов А.И., Антипин И.С. и др. 1999-2007 и другие].

Авторами предложено разделять СБС как природного (в частности, животного), так и искусственного происхождения на группы по следующим признакам: I) по составу комплексов ( или строению):

1) мультисубъединично-белковые; 2) липид-белковые; 3) РНК-белковые; 4) ДНК-белковые и т.д.;

II) по функции комплексов: 1) ферментные; 2) транспортные; 3) гормонально-рецепторные; 4) медиаторно-рецепторные; 5) структурно-механические и т.д.; III) по происхождению: «эндогенные» и «экзогенные». Внутри каждой группы предложено выделять определенные уровни структурной организации.

Решение фундаментальных и прикладных аспектов этой проблемы имеет важное значение для биохимических исследований строения и функции биологических систем и т.д.

Авторами предложено разделять СБС как природного (в частности, животного), так и искусственного происхождения на группы по следующим признакам: I) по составу комплексов (или строению):

1) мультисубъединично-белковые; 2) липид-белковые; 3) РНК-белковые; 4) ДНК-белковые; II) по функции комплексов: 1) ферментные; 2) транспортные; 3) гормонально-рецепторные; 4) медиаторно-рецепторные; 5) структурно-механические и т.д.;

III) по происхождению: «эндогенные» и «экзогенные».

Внутри каждой группы предложено выделять определенные уровни структурной организации. Решение фундаментальных и прикладных аспектов этой проблемы имеет важное значение для биохимических исследований строения и функции биологических систем и т.д.

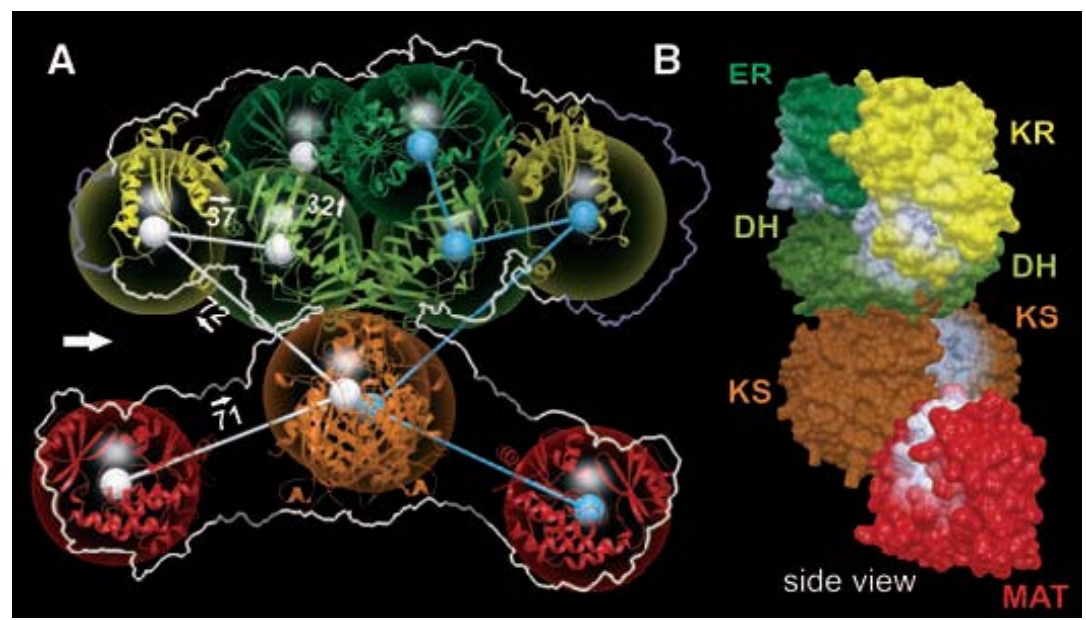


Рис. 1.3. Полиферментный комплекс FAS (синтазы жирных кислот), состоящий из двух частей по 7 белков: MAT (малонил-КоА/ацетил-КоА-АПБ-трансацилаза), KS (3-кетоацил-синтаза), KR (3-кетоацил-редуктаза), DH (дегидрогеназа или гидратаза), ER (2,3-еноил-редуктаза), ACP (ацилпереносящий белок), TE (тиоэстераза) - катализирующих синтез двух жирных кислот одновременно (яркий пример «фермент-липидной» СБС) [Maier T., Jenni S., Ban N. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution // Science - 2006. - Vol.311. - P.1258-1262].

# SUPRAMOLECULAR ENZYME ORGANIZATION

QUATERNARY STRUCTURE AND BEYOND

BY

PETER FRIEDRICH, M.D., D.Sc. (Biol.)

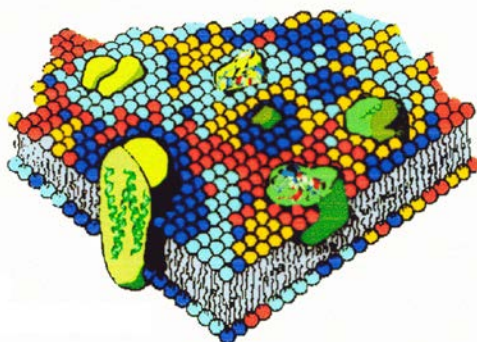
Institute of Enzymology, Biological Research Centre,  
Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary



PERGAMON PRESS, OXFORD



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST



Level / Уровень	Scheme / Схема	Name / Название
Globular proteins / Глобулярные белки		Monomeric enzymes / Мономерные ферменты
Quaternary structure / Четвертичная структура		Oligomeric enzymes / Олигомерные ферменты
		Complex enzyme / Комплексный фермент
Supramolecular organization / Надмолекулярная организация		Multienzyme complex / Мультиферментный комплекс
		Multienzyme conjugate / Мультиферментный конъюгат
		Scaffolded enzyme arrays: adsorptive / адсорбционный
		integral / интегральный

Таблица. 1.1. Уровни структурной организации ферментов: отдельные субъединицы (схема) соответствуют глобулам, состоящим обычно из одной полипептидной цепи; С и R показывают каталитические (catalytic) и регуляторные (regulatory) субъединицы соответственно; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> и E<sub>3</sub> являются ферментами, катализирующими три последовательные реакции в метаболическом пути; в мультиферментном конъюгате показана неразрывность полиферментной цепи E<sub>1</sub> → E<sub>3</sub>; (перевод из монографии Р. Фридрих "Supramolecular enzyme organization/ Quaternary structure and beyond" 1984, Akademiai Kiado, Budapest, p. 3 [202])

В биохимии отд. подходы к проблеме обозначены в монографии Фридриха, но осн. Достижения по СС – в хим.науках (работы ноб. лауреата Лена и др.). Рис. 1.4. Функциональные супрамолекулярные системы, осуществляющие связь между медико-биологическими науками (life sciences) и химическими науками о материалах (material sciences)

Жан-Мари Лен

# Супрамолекулярная ХИМИЯ

Концепции и перспективы

Перевод с английского кандидата химических наук *Е.В. Болдыревой* под редакцией члена-корреспондента РАН *В.В. Власова*, кандидата химических наук *А.А. Варнека*

*Best wishes,  
Jean-Marie Lehn  
3/6/05*



НОВОСИБИРСК  
"НАУКА"  
СИБИРСКОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ РАН  
1998

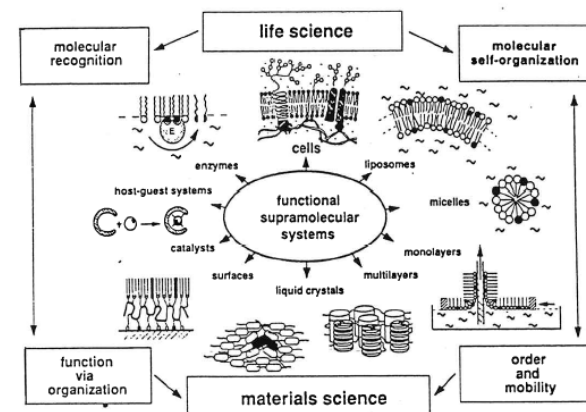


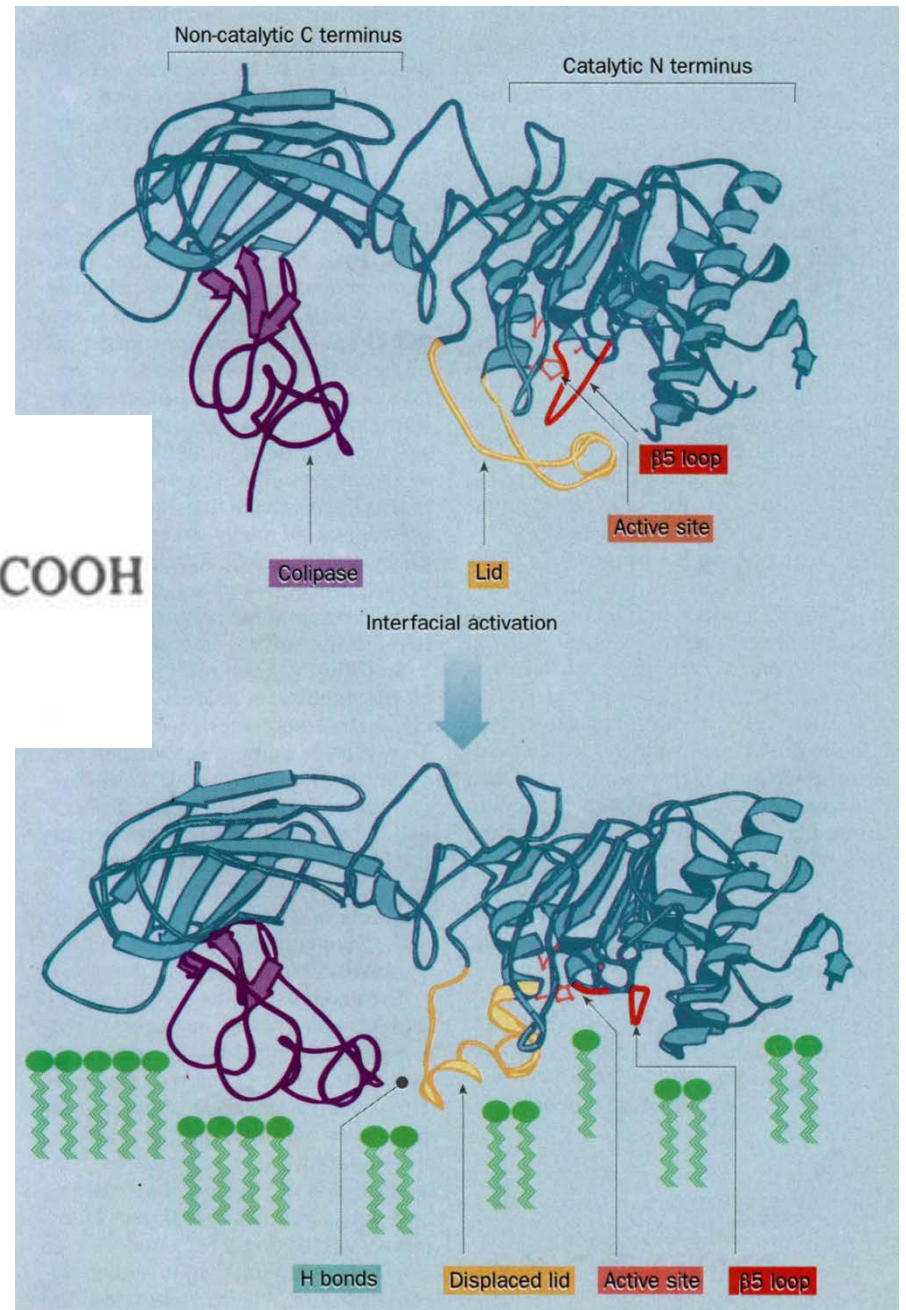
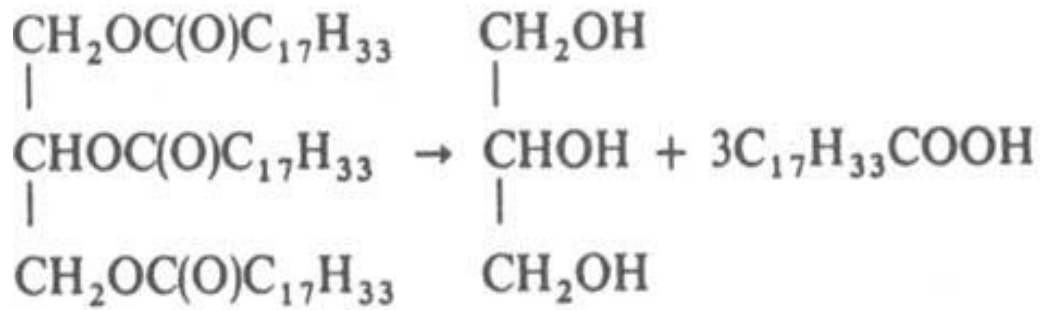
Fig. 1. Functional supramolecular systems—connecting link between life science and materials science.

## Раздел 2

Актуальность работы связана с тем, что около 20% мирового рынка ферментов занимают СБС-препараты на основе различных липаз.



## Схема действия липазы



### Раздел 3

#### Структурная организация и свойства СБС на основе ферментов.

Ферментативный гидролиз липидоподобных субстратов в монослоях под действием липаз является примером функционирования простейшей по структурной организации супрамолекулярной биохимической системы (**ферментной СБС<sub>ф</sub> 1<sup>го</sup> уровня**). Ранее гидролиз в монослоях под действием липаз изучался фрагментарно, причем только традиционных липидов и кинетические параметры определены в «двумерных» величинах, неприемлимых для сравнительного анализа. Нами предложена комплексная модель межфазного ферментативного гидролиза новых липидоподобных субстратов (Вал-ПГ, Лей-ПГ, Фен-ПГ) в монослое липазой (Л-1).

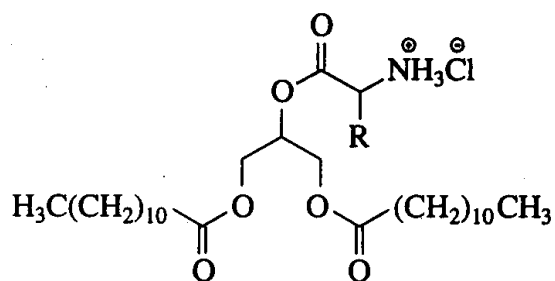


Рис. 1.1. Строение липазы из *P.fluorescens* (справа) и новых липидоподобных субстратов – псевдоглицеридов (слева), производных глицерина, жирных и аминокислот (Вал-ПГ, Лей-ПГ и Фен-ПГ ).

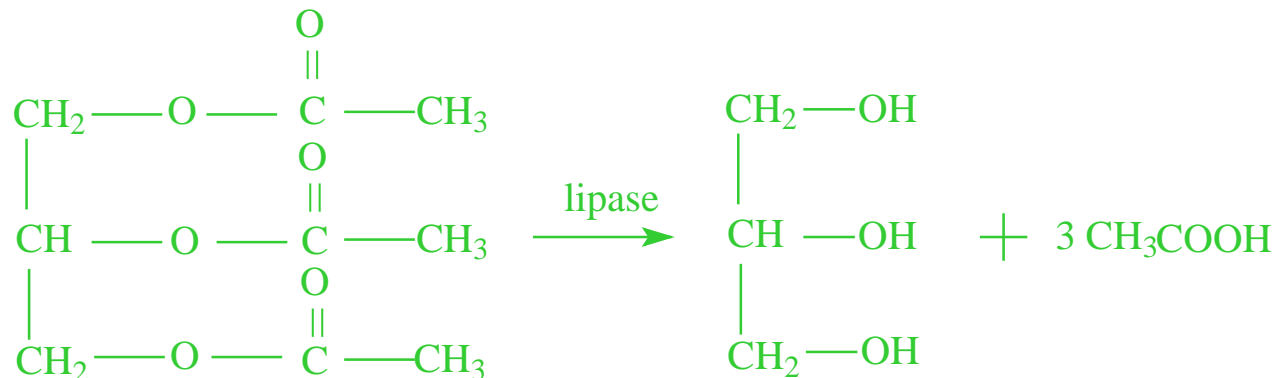
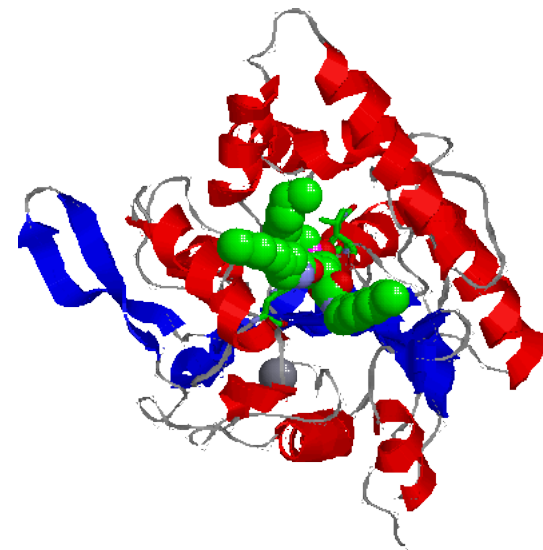


Рис. 1.2. Схематическое изображение ферментативной реакции.

## СБС<sub>ф</sub> 1-го уровня

Начальная скорость реакции, в пределах 10% конверсии субстрата:

На основе предложенной модели ферм. гидролиза в монослое (на схеме - рис. 2) и общих уравнений материального баланса, получены след. кинетич. Уравнения:

$$\begin{aligned} V[E]_0 &= V[E] + I[ES], \\ I[S]_0 &= I[S] + I[ES] + V[P], \\ k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{cat}[ES] &= \frac{d[ES]}{dT} = 0, \\ v_0 &= k_{cat}[ES]. \end{aligned}$$

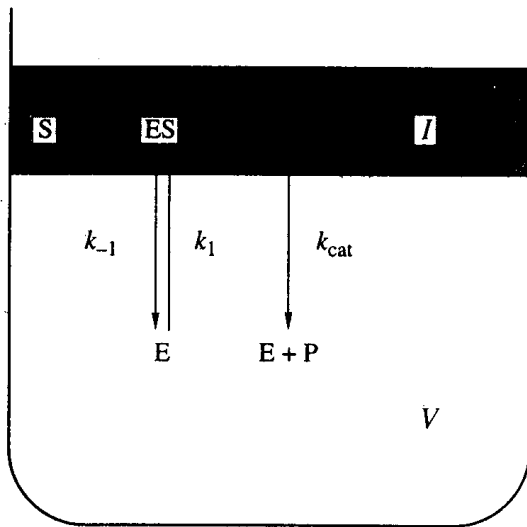


Рис. 2. Модель ферментативного гидролиза триглицеридов и псевдоглицеридов в монослое.  $I$  – объем субстрата в монослое,  $V$  – объем водной фазы.

$$v_0 = \frac{\text{количество прореагировавшего субстрата в монослое (моль)}}{\text{время его превращения (с)} \cdot \text{объем монослоя (л)}}.$$

Для начальной скорости реакции гидролиза нами было выведено следующее уравнение, из которого можно определить отношение констант:

$$v_0 = k_{cat}[ES] = \frac{k_{cat}[E]_0[S]_0}{\frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} + [E]_0 + [S]_0} \frac{I}{V}.$$

Для определения индивидуальных констант применен экспериментальный подход, проводящий к новым уравнениям материального баланса для схемы 2:

$$\begin{aligned} \frac{I[ES]}{V[E]_0} &= \frac{[E]_0 - [E]_1}{[E]_0} = 1 - k \\ v_0 &= k_{cat}[E]_0(1 - k) \frac{V}{I}. \end{aligned}$$

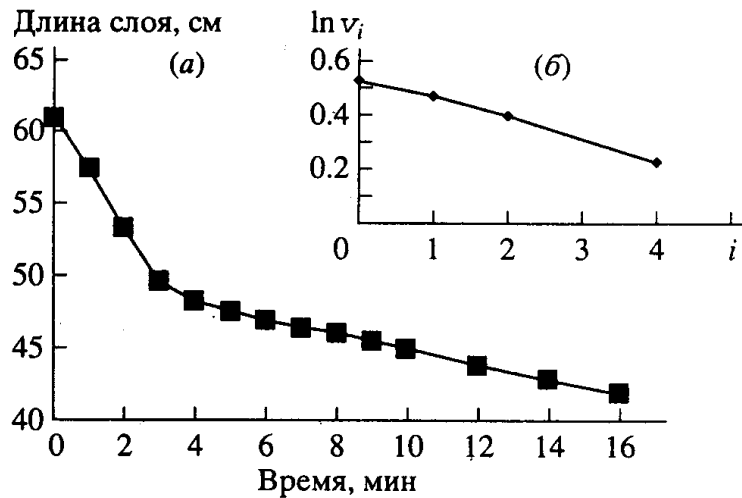
и  $[ES] = [E]_0(1 - k) \frac{V}{I}$ .

Конечное уравнение для определения значений  $K_{m(\text{каж})}$  (констант Михаэлиса для новых субстратов):

$$K_{m(\text{каж})} = \frac{[S]_0 - [S]_0(1 - k)}{(1 - k) \frac{V}{I}} = \frac{k[S]_0 I}{1 - k V}.$$



# СБС<sub>ф</sub> 1-го уровня

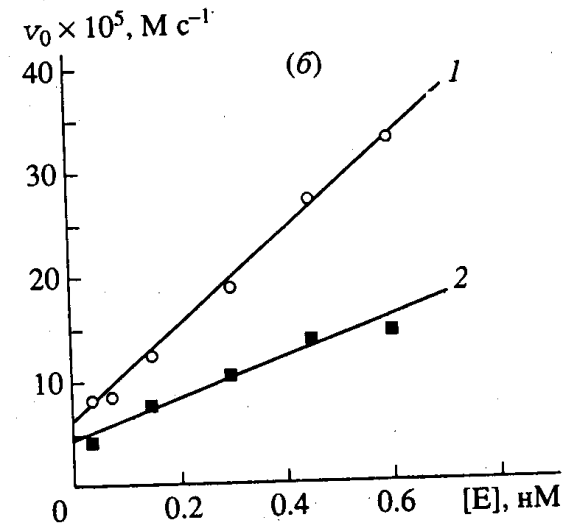
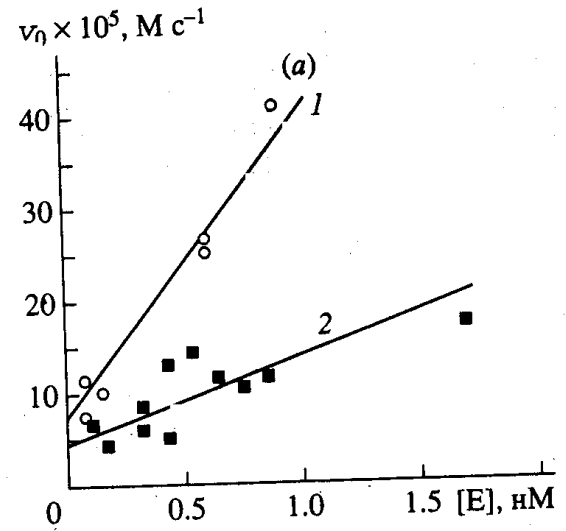


**Рис. 3.** Изменение длины монослоя субстрата в процессе ферментативного гидролиза трилаурина при концентрации липазы  $1.7 \times 10^{-10}$  М (а) и зависимость начальной скорости гидролиза ( $v_i$ ) от количества последовательных нанесений трилаурина ( $i$ ) в монослой над раствором фермента (б).

Кинетические параметры ферментативного гидролиза липазой трилаурина и псевдоглицеридов в монослоях

Субстрат	$[S]_0$ , М	$k_{\text{cat}}$ , $\text{с}^{-1}$ *	$K_{\text{m(каж)}}$ $10^6$ , М
Трилаурин	0.97	4	1.9
Phe-PG	0.81	11	1.7
Leu-PG	0.94	7	1.9
Val-PG	0.97	13	2.0

\* Ошибка измерений  $\pm 2 \text{ с}^{-1}$ .



**Рис. 4.** Зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза липофильных субстратов в монослой при поверхностном давлении 10 мН/м от концентрации липазы. Субстраты: Phe-PG (1), трилаурин (2) (а); Val-PG (1) и Leu-PG (2) (б).

Из получ. данных впервые определены значения  $k_{\text{кат}}$  и  $K_{\text{м(каж)}}$  для новых субстратов, которые выше, чем для станд. Сустратов в монослое и, тем более для всех субстратов в растворах (т.е. неорганизованное состояние).

## Раздел 4 $\text{СБС}_\phi$ 2-го уровня: комплексы липазы с ПАВ

Рис.2.5. Изотермы поверхностное давление - площадь на молекулу для N-алкилацетамидов

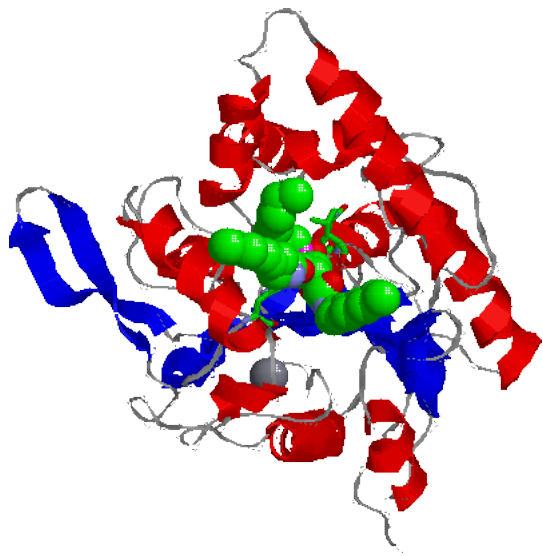
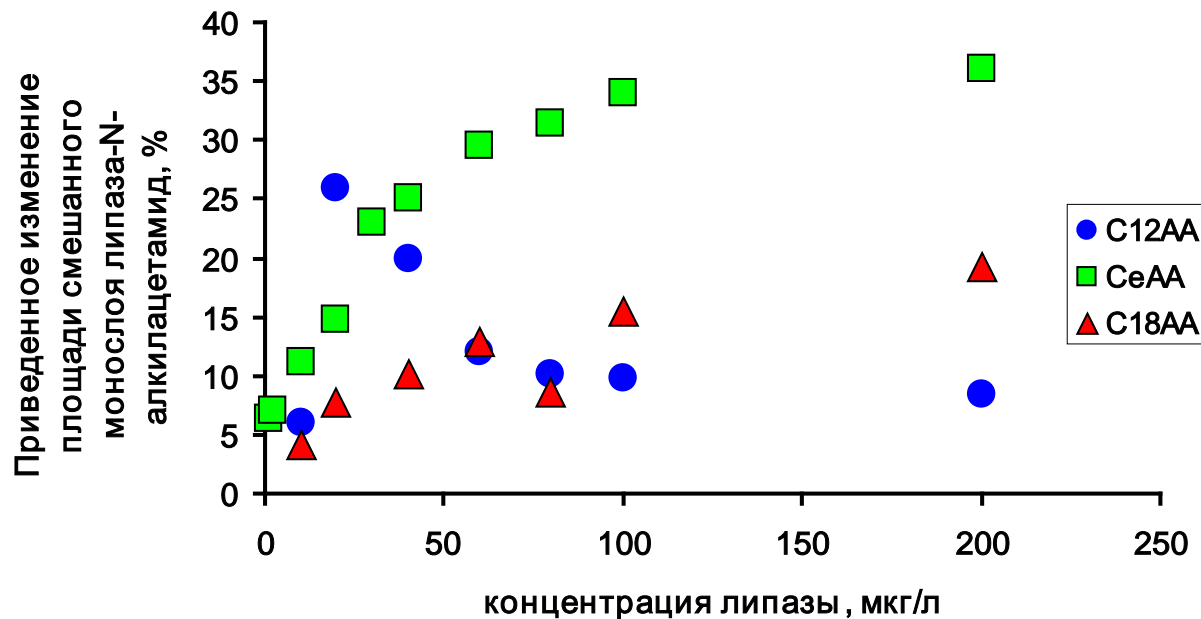
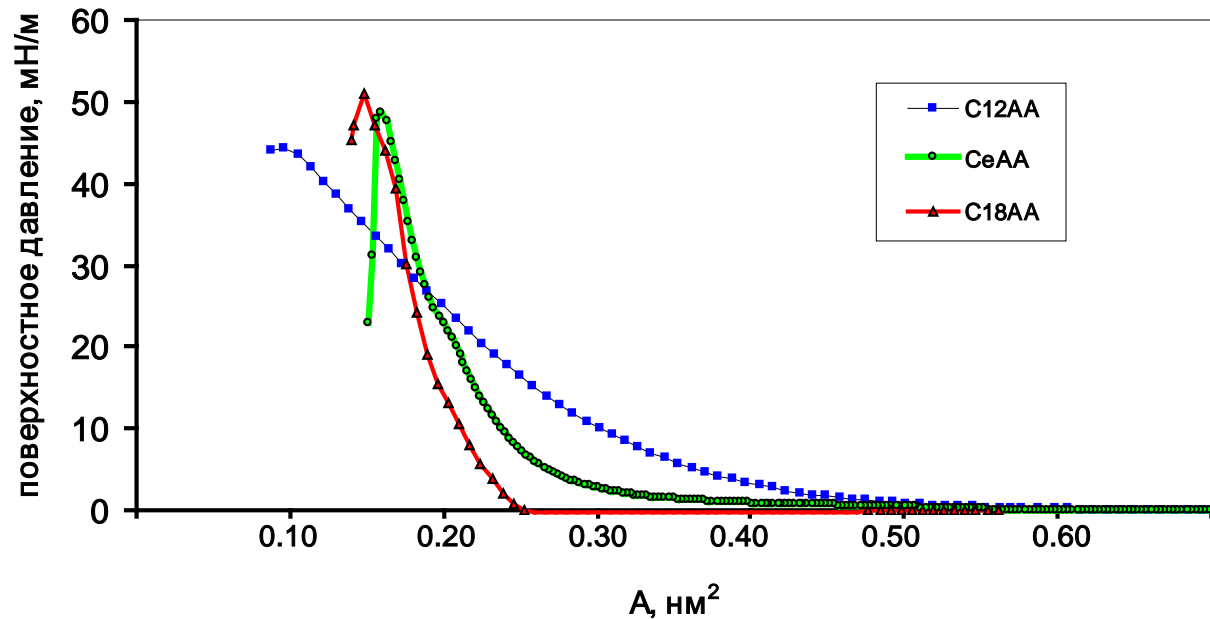
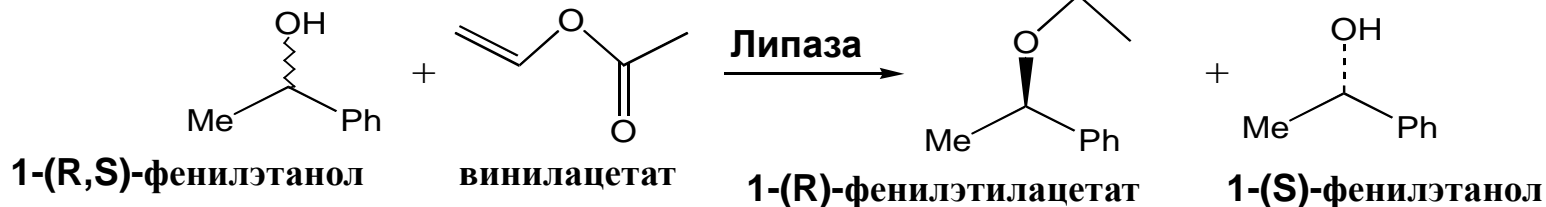


Рис.2.6. Изменение площади смешанного монослоя липазы с N-алкилацетамидами в зависимости от концентрации липазы



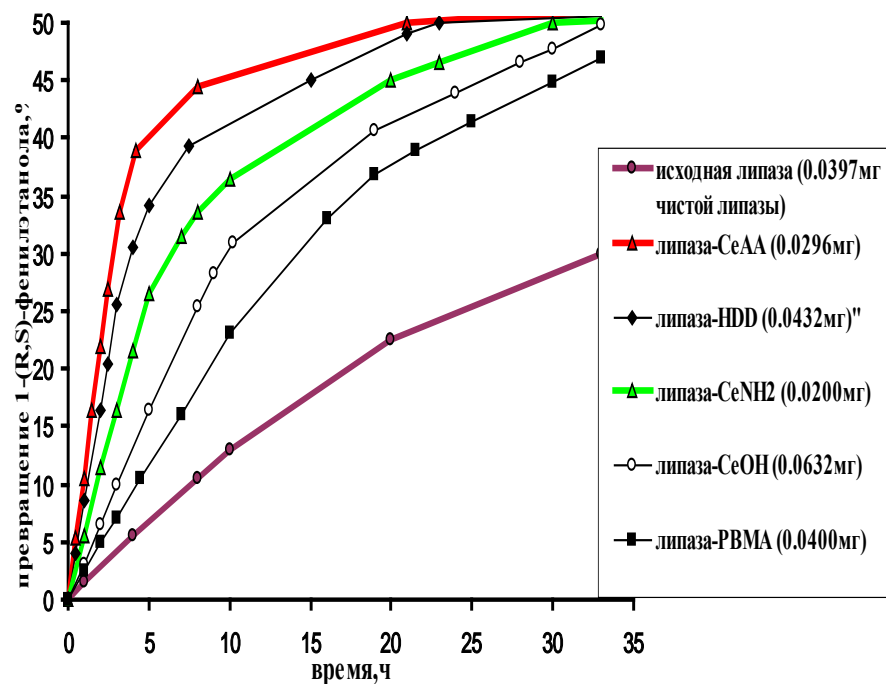
## СБС<sub>ф</sub> 2-го уровня



**Табл. 2.3. Каталитическая активность комплексов липазы с ПАВ с различной длиной гидрофобного радикала.**

ПАВ	Включение липазы в комплекс, %	Активность в мкмоль продукта ч <sup>-1</sup> (мг фермента) <sup>-1</sup>	
		Гидролитическая	Этерификационная
-	-	52000	1530
<b>N-алкилацетамид</b>			
C <sub>12</sub> AA	87.4*	23900*	3500*
<b>CeAA</b>	<b>87.0*</b>	<b>24000*</b>	<b>19000*</b>
C <sub>18</sub> AA	86.5*	21800*	4700*
<b>n-алкиламин</b>			
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NH <sub>2</sub>	>99*	21800*	3520*
<b>CeNH<sub>2</sub></b>	<b>&gt;99*</b>	<b>30000*</b>	<b>9500*</b>
C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NH <sub>2</sub>	80*	83200*	11400*

**Рис. 2.9. Кинетические кривые накопления продукта 1-фенилэтилацетата в реакции этерификации с комплексами липаза-ПАВ**



**Зайцев Сергей Юрьевич (Zaitsev Sergei Yurievich)**

**доктор биологических наук, доктор химических наук, профессор [s.y.zaitsev@mail.ru](mailto:s.y.zaitsev@mail.ru)**

**Избранные статьи (Selected publications) 2015-2020**

**Papers in “Web of Science Core Collection” or “Scopus” Q1:**

- **Zaitsev S.Yu., Savina A.A., Volnin A.A., Voronina O.A., Bogolyubova N.V. Comparative Study of the Water-Soluble Antioxidants in Fodder Additives and Sheep Blood Serum by Amperometric and Biochemical Methods. *Animals*, 2020, 10, 1186. (Q1 WoS и Scopus).**
- **Zaitsev S.Yu., Bogolyubova N.V., Zhang Xuying, Brenig Bertram. Biochemical parameters, dynamic tensiometry and circulating nucleic acids for cattle blood analysis: a review. *PeerJ* 2020. v.8, e8997 <https://peerj.com/articles/8997/#>. (Q1 WoS Scopus).**
- **Zaitsev S. Yu., Savina A.A., Zaitsev I. S. Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology *Advances in Colloid and Interface Science* 2019, v.272, p.1-14. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102016> (Impact Factor: 8.243, Q1).**
- **Zaitsev S.Y., Solovyeva D.O., Zaitsev I.S. Multifunctional membranes based on photosensitive crown-ether derivatives with advanced properties. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015, V. 222, P. 755-764. doi: 10.1016/j.cis.2014.09.007. (Impact Factor: 8.243, Q1).**
- **Zaitsev S. Yu. Dynamic surface tension measurements as general approach to the analysis of animal blood plasma and serum. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2016, V.235, P.201–213 doi:10.1016/j.cis.2016.06.007 (Impact Factor: 8.243, Q1).**
- **Zaitsev S.Y., Solovyeva D.O., Supramolecular nanostructures based on bacterial reaction center proteins and quantum dots. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015, V.218, P. 34–47. DOI: 10.1016/j.cis.2015.01.006 (Impact Factor: 8.243, Q1).**