

УДК 543.866;547.172;547.174

**ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ФЕРМЕНТАТИВНОМ
КАТАЛИЗЕ И ИХ ИССЛЕДОВАНИЕ
МЕТОДАМИ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ**

И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев и К. Мартинек

Реакции, катализируемые ферментами, включают, как правило, последовательное образование ряда промежуточных соединений (фермент-субстратные комплексы, ковалентно образованные промежуточные соединения, конформеры фермента или субстрата). В исследовании такого рода лабильных промежуточных соединений плодотворными оказались методы химической кинетики. В предлагаемом обзоре обобщены кинетические закономерности, наблюдаемые при протекании каталитических реакций с участием лабильных промежуточных соединений в условиях предстационарного и стационарного режима. Рассмотрена также релаксационная кинетика многостадийной каталитической реакции.

Исследование лабильных промежуточных соединений неразрывно связано с развитием методов «быстрой» кинетики. Поэтому в обзоре обсуждаются особенности и возможности применения для исследования ферментативных реакций «струевых» методов, «флеш»-метода, метода «температурного скачка». Несколько более детально рассмотрены формально-кинетические проявления промежуточных соединений в реакциях наиболее изученных к настоящему времени ферментов (α -химотрипсин, каталаза, пероксидаза, рибонуклеаза, аспартатаминотрансфераза).

Библиография — 236 наименований.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	835
II. Переходная фаза реакции	838
III. Стационарная фаза реакции	848
IV. Методы релаксационной кинетики	853

I. ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области каталитических реакций с участием биополимерных катализаторов привлекают все большее внимание со стороны физико-органической химии^{1, 2}. Это связано с тем, что познание движущих сил ферментативного катализа должно привести к выяснению специфических механизмов, с помощью которых ферменты ускоряют химические реакции. В итоге, использование принципов действия активных центров, работающих в ферментах, могло бы облегчить решение проблемы создания избирательных химических катализаторов с управляемыми свойствами³⁻⁵.

Благодаря усилиям ряда научных биохимических школ в исследовании катализа ферментами за последнее десятилетие достигнуты значительные успехи^{1, 2, 6}. Можно отметить два основных направления, по которым происходит развитие исследований в этой области: 1) изучение структуры ферментов и строения их активных центров — здесь наиболее ценную информацию дают рентгенографические исследования⁷⁻⁹; 2) изучение динамики ферментативного действия, то есть, исследование после-

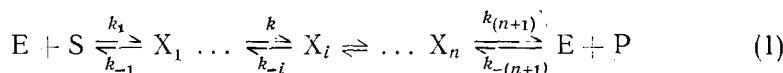
довательности превращений молекулы субстрата в активном центре фермента, приводящей к образованию молекулы продукта. Настоящий обзор в основном посвящен обсуждению достижений именно этого направления исследований ферментативных реакций.

К фундаметальным представлениям ферментативного катализа относится положение о многоступенчатом характере превращения веществ под действием белкового катализатора. Впервые на это указали Михаэлис и Ментен¹⁰, которые пришли к выводу, что механизм действия инвертазы включает образование промежуточного фермент-субстратного комплекса (комплекс Михаэлиса)*. Впоследствии детальное исследование других ферментативных систем подтвердило, что реакции с участием биологических катализаторов действительно включают последовательное образование ряда промежуточных соединений (фермент-субстратные нековалентные комплексы, ковалентно образованные промежуточные соединения, конформеры фермента или субстрата). Таким образом, изучение механизма действия ферментов сталкивается со специфической задачей выяснения числа и природы промежуточных соединений в реакции. Как правило, эти промежуточные соединения чрезвычайно лабильны, и в редком случае удается выделить их в индивидуальном виде¹. В исследовании такого рода лабильных промежуточных соединений весьма плодотворными оказались методы химической кинетики.

Цель настоящего обзора заключается в том, чтобы обобщить кинетические закономерности, наблюдаемые при протекании ферментативных реакций, причем главное внимание будет уделено прежде всего кинетическому проявлению промежуточных соединений как в переходной, так и в стационарной фазе реакции. Для более детального ознакомления с методическими особенностями используемых кинетических методов следует обратиться к обзорам^{1, 11-13}.

Следует отметить, что некоторые формально-кинетические аспекты исследования промежуточных соединений в ферментативном катализе могут оказаться полезными и при анализе других классов реакций, также протекающих с участием лабильных промежуточных соединений.

Рассмотрим кинетику многостадийной последовательной катализической реакции. Простейший общий механизм реакции, протекающей на активном центре фермента E с участием вещества S (субстрата) можно записать в виде:



где X_i ($i = 1, 2, 3 \dots n$) — промежуточные соединения, P — продукт реакции и k_i , k_{-i} — константы скорости прямой и обратной элементарной стадии. Эта схема включает как мономолекулярные (k_i , $i \neq 1, \dots (n+1)$), так и бимолекулярные (k_1 , $k_{-(n+1)}$) элементарные реакции. В соответствии с законами химической кинетики для каждого из $n+3$ участников реакции можно записать дифференциальное уравнение, описывающее изменение концентрации вещества во времени. Из полученных $n+3$ диф-

* Под термином «комплекс Михаэлиса» часто подразумевают первичный нековалентный комплекс фермента с субстратом. Это не совсем строго, поскольку «насыщение», наблюдаемое на зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, которое и указывает на существование «комплекса Михаэлиса», может отражать наличие в реакции любого другого, в том числе и ковалентно образованного промежуточного соединения. В общем смысле термин «комплекс Михаэлиса» характеризует совокупность промежуточных соединений в ферментативном катализе.

ференциальных уравнений лишь $n+1$ уравнение линейно независимо, поскольку переменные значения концентраций компонентов связаны двумя линейными алгебраическими уравнениями материального баланса:

$$[E]_0 = [E] + \sum_{i=1}^n [X_i] \quad (2)$$

$$[S]_0 = [S] + [P] + \sum_{i=1}^n [X_i]$$

Таким образом, протекание во времени всех элементарных реакций схемы (1) описывается системой $(n+1)$ дифференциальных уравнений типа (3) и двух алгебраических уравнений (2):

$$\begin{aligned} \frac{d[X_1]}{dt} + (k_{-1} + k_2)[X_1] &= k_1[E][S] + k_{-2}[X_2] \\ &\vdots \quad \dots \\ \frac{d[X_i]}{dt} + (k_{-i} + k_{i+1})[X_i] &= k_i[X_{i-1}] + k_{-(i+1)}[X_{i+1}] \\ &\vdots \quad \dots \\ \frac{d[X_n]}{dt} + (k_{-n} + k_{(n+1)})[X_n] &= k_n[X_{n-1}] + k_{-(n+1)}[E][P] \\ \frac{d[P]}{dt} + k_{-(n+1)}[P][E] &= k_{(n+1)}[X_n] \end{aligned} \quad (3)$$

Совместное решение системы уравнений (2)–(3) приводит к выражениям для всех компонентов реакции в виде функции от времени. Система дифференциальных и алгебраических уравнений (2)–(3) представляет собой нелинейную (из-за наличия в ней членов второго порядка, содержащих произведение переменных концентраций, $k_i[E][S]$ и $k_{-(n+1)}[E][P]$) систему уравнений с постоянными коэффициентами. Ее решение может быть найдено путем численного интегрирования на цифровой вычислительной машине¹⁴ или путем моделирования на аналоговой вычислительной машине¹⁵. Качественное исследование характера переходных процессов при различных начальных условиях для ферментативных реакций с участием промежуточных соединений дано в работе¹⁶. Однако наибольший интерес с точки зрения сопоставления механизма реакции с экспериментально получаемыми кинетическими результатами представляют возможности аналитического решения системы (2)–(3). Эту задачу можно существенно упростить, если использовать некоторые условия, которые позволяют превратить систему (2)–(3) в линейную систему. В настоящее время при кинетическом анализе механизма действия ферментов наибольшее развитие и применение нашли следующие три подхода, которые основаны на предпосылках, упрощающих формально-кинетическое рассмотрение: а) кинетика реакций в переходной фазе или «предстационарная» кинетика; б) кинетика ферментативного превращения в стационарном режиме; в) релаксационная кинетика. Ниже на примере реакции (1) детально рассматриваются эти подходы и приложения их к исследованию механизмов реакций.

II. ПЕРЕХОДНАЯ ФАЗА РЕАКЦИИ

1. «Предстационарная» кинетика ферментативной реакции

Нелинейную систему уравнений (2)–(3) можно упростить, если проводить бимолекулярные стадии реакции (1) в псевдомономолекулярном режиме, то есть при большом избытке одного из реагентов. В этом случае изменениями концентрации этого реагента во времени можно пренебречь и, следовательно, бимолекулярные члены в дифференциальных уравнениях (3) становятся линейно зависимыми лишь от переменной концентрации одного из реагентов. Этот подход используют обычно для аналитического рассмотрения так называемой «предстационарной» кинетики.

Для реакции (1) при $[S]_0 \gg [E]_0$ и небольшой глубине реакции ($[P] \approx 0$ формально эквивалентным является случай образования продукта Р на необратимой стадии реакции, $k_{-(n+1)} = 0$) в условиях, когда расходом субстрата можно пренебречь, $[S] = [S]_0$, система уравнений (2)–(3) принимает вид (5)–(4):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[X_1]}{dt} + (k_{-1} + k_2)[X_1] = k_1[S_0][E] + k_{-2}[X_2] \\ \vdots \quad \dots \\ \frac{d[X_i]}{dt} + (k_{-i} + k_{i+1})[X_i] = k_1[S_0][E] + k_{-2}[X_2] \\ \vdots \\ \frac{d[X_n]}{dt} + (k_{-n} + k_{n+1})[X_n] = k_n[X_{n-1}] \\ [E]_0 = [E] + \sum_{i=1}^n [X_i] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_{(n+1)}[X_n] \end{array} \right. \quad (4)$$

$$(5)$$

Существует несколько стандартных способов решения систем линейных дифференциальных уравнений: приведение к одному линейному дифференциальному уравнению более высокого порядка, метод преобразований Лапласа и др.¹⁷. Решение такого рода систем дифференциальных уравнений при анализе кинетики сложных химических реакций описано в работах^{18–22}. Некоторые подходы к решению систем линейных дифференциальных уравнений, описывающих протекание во времени многостадийных ферментативных реакций, обсуждаются в работах^{15, 23–26}. В работах^{27, 28} описано применение для этих целей теории графов.

Общее решение системы уравнений (4) имеет вид:

$$[X_n] = \sum_{j=1}^n A_j e^{\lambda_j t} + B \quad (6)$$

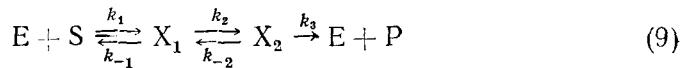
где λ_j представляют собой n однократных действительных корней соответствующего характеристического уравнения n -ого порядка. Величина $(-1/\lambda_j)$ имеет размерность времени и представляет собой сложную функцию элементарных констант скоростей реакции (1). Частные решения, описывающие изменения во времени концентраций каждого из про-

межуточных соединений X_i , можно получить из общего решения (6), вводя начальные условия.

Зависимость концентрации продукта реакции от времени следует из дифференциального уравнения (5), если подставить в него выражение (6) и проинтегрировать:

$$[P] = k_{n+1} \sum_{j=1}^n \frac{A_j}{\lambda_j} (e^{\lambda_j t} - 1) + k_{n+1} B t \quad (7)$$

Уравнения (6) и (7) обобщают для случая n промежуточных соединений известные в литературе уравнения, полученные ранее при анализе кинетики реакции, протекающей с участием одного (схема 8)²⁹⁻³³ или двух (схема 9)^{15, 34} промежуточных соединений



Остановимся более подробно на схеме (8). Зависимость концентрации промежуточного соединения X от времени дается уравнением (10)

$$[X] = \frac{k_1 [S]_0 [E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]_0} (1 - e^{-t/\tau}) \quad (10)$$

Графический вид функции (10) представлен на рис. 1A. Из анализа кривой можно определить величину характеристического времени τ (уравнение 11). Исследуя далее зависимость τ^{-1} от концентрации

$$\tau^{-1} = k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2 \quad (11)$$

субстрата можно найти константы скорости образования (k_1) и распада ($k_{-1} + k_2$) промежуточного соединения.

В случае, если непосредственное экспериментальное наблюдение X затруднено, информацию о наличии такого промежуточного соединения в механизме реакции можно получить, исследуя кинетику образования конечного продукта реакции. Концентрация продукта P как функция времени дается³² следующим уравнением:

$$[P] = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_m} t - \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]_0}{k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2} (e^{-(k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2)t} - 1) \quad (12)$$

где $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$. Кривая $[P]$ асимптотически приближается к прямой с тангенсом угла наклона, равным стационарной скорости процесса (рис. 1Б, кривая a):

$$v_{\text{стаци.}} = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{\text{макс.}} = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_m} \quad (13)$$

Для наблюдаемого периода индукции τ справедливо выражение (11). Наличие индукционного периода на кривой продукт — время (при отсутствии цепного или автокаталитического характера реакции) надежно указывает на существование в реакции одного (или по крайней мере одного, см. ниже) промежуточного соединения. Из анализа зависимостей $\left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{\text{макс.}}$ и τ от концентраций фермента и субстрата можно определить константы скорости всех элементарных реакций.

Формально-кинетический анализ ферментативных реакций в предста- ционарном режиме позволяет различить механизмы последовательного

(Михаэлис — Ментен, схема (8)) и параллельного (Анри, схема (14)) образования фермент-субстратного комплекса



Как известно, схема Анри³⁵, которая предполагает образование нереакционноспособного комплекса ES и бимолекулярную реакцию субстрата

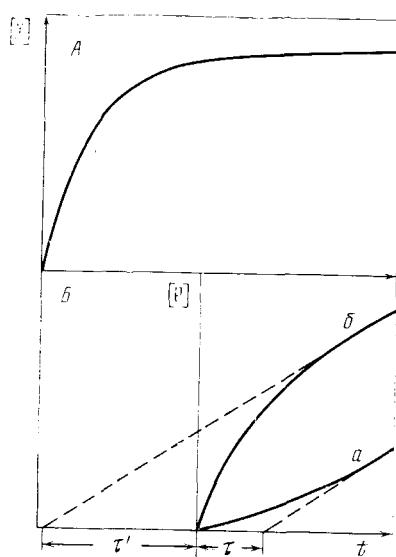


Рис. 1

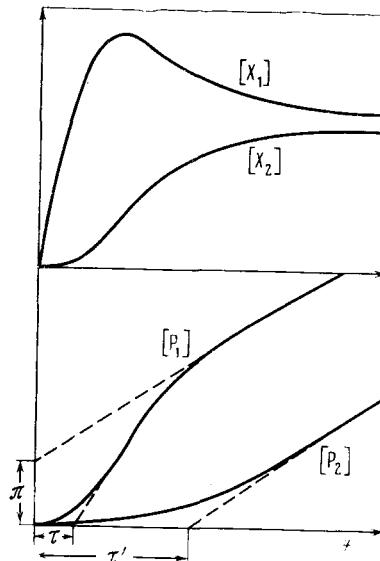


Рис. 2

Рис. 1. Кинетические закономерности протекания ферментативной реакции с участием одного промежуточного соединения в предстационарном режиме. А — зависимость концентрации промежуточного соединения X от времени для предстационарного протекания реакции по механизму (8). Б — Кинетическая кривая для случая предстационарного образования продукта (а) по механизму Михаэлиса — Ментен (схема 8) или (б) по механизму Анри (схема 14)

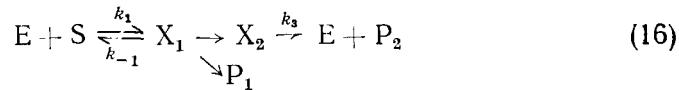
Рис. 2. Предстационарная кинетика образования промежуточных соединений и продуктов для трехстадийного механизма (16)

со свободным ферментом, приводит к уравнению стационарной скорости для схемы Михаэлиса — Ментен (уравнение 13). Однако, согласно³⁶, кинетические закономерности реакций (10) и (14) существенно различаются в предстационарном режиме. Кривая продукт — время для реакции (14) представлена на рис. 1Б, кривая б. Как видно на рисунке, в данном случае отсутствует период индукции и асимптотическая прямая, которая соответствует условиям стационарного режима, отсекает на оси абсцисс отрицательный отрезок, равный

$$\tau' = - \frac{[S]_0}{k_1 K_m (K_m + [S]_0)} \quad (15)$$

Различить механизмы (8) и (14) можно также при использовании методов релаксационной кинетики³⁷.

В приложении к механизму действия протеолитических ферментов детальное обсуждение в литературе нашла схема ферментативного превращения, учитывающая возможность образования двух промежуточных соединений и двух продуктов реакции (схема 16)



На рис. 2 представлен графический вид функций $[X_1]$, $[X_2]$. В аналитическом виде зависимость концентрации продукта P_1 от времени имеет³⁸ вид (рис. 2):

$$[P_1] = \frac{k_2 R}{Q} t + \frac{k_2 N}{G} (e^{Gt} - 1) + \frac{k_3 M}{F} (e^{Ft} - 1) \quad (17)$$

где R, Q, F, G, M, N — функции констант скоростей k_1, k_{-1}, k_2, k_3 . Приведя анализ стационарной скорости реакции, а также величин τ, τ' и π от концентрации фермента и субстрата (см. рис. 2 и уравнения (18) — (20)), авторы³⁸ указывают на возможность определения всех элементарных констант скоростей механизма (16).

$$\tau = \frac{1}{k_1 [S]_0 + K_m}; \quad K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (18)$$

$$\tau' = \frac{k_3^2 - k_1 k_2 [S]_0}{k_1 k_3 (k_2 + k_3) ([S]_0 + K_m')}; \quad K_m' = K_m \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad (19)$$

$$\pi = [E]_0 \left\{ \frac{k_2^2 [S]_0^2}{(k_2 + k_3)^2 ([S]_0 + K_m')^2} - \frac{k_2 k_3^2 [S]_0}{k_1 (k_2 + k_3)^2 ([S]_0 + K_m')^2} \right\} \quad (20)$$

В качестве обобщения следует подчеркнуть одну важную особенность кинетики многостадийной каталитической реакции типа (1), протекающей в предстационарном режиме. Как видно из уравнения (6) и (7), функциональная зависимость от времени концентрации промежуточных соединений реакции описывается суммой n экспоненциальных членов и постоянной, в то время как концентрация конечного продукта дана суммой n экспоненциальных членов ($e^{\lambda_j t} - 1$) и линейным членом от времени. Следовательно, число экспоненциальных членов в уравнениях (6) и (7) соответствует числу промежуточных соединений в реакции (1) (ср. в частности, механизмы (8), (16) и уравнения (10), (17)). Таким образом, для реакции, протекающей через n промежуточных соединений, в идеальном случае можно получить на опыте набор n характеристических времен. Однако реально в эксперименте может наблюдаться меньшее число экспоненциальных членов. Это связано прежде всего с методическими особенностями регистрации кинетической кривой. При использовании наиболее распространенного спектрофотометрического метода необходимы заметные спектральные различия компонентов реакции (1). Кроме того, существенные ограничения накладывает временная разрешающая способность установки. Экспериментально определить характеристическое время можно лишь при условии, что оно превышает «мертвое» время используемой аппаратуры. Эти ограничения приводят к тому, что наблюдаемое на опыте число экспоненциальных членов позволяет оценить лишь минимальное число промежуточных соединений, принимающих участие в реакции.

2. Экспериментальные методы

Кинетика предстационарного протекания ферментативных реакций (в том приближении, в котором она была изложена выше, то есть при условии избытка одного из реагентов и на небольшой глубине превращения субстрата) была изучена, в основном, «струевыми» методами. «Струевые» методы для измерения кинетики быстрых реакций в растворе впервые использовали Хартридж и Роутон³⁹⁻⁴¹ и позднее получили развитие благодаря работам Чанса⁴²⁻⁴⁷. Наиболее широко используемый в настоящее время метод «остановленной струи» в современном его виде описан в работах^{48-53, 181}. Принципиальная особенность «струевых» методов — быстрое смешивание растворов реагирующих веществ в специально сконструированной смесительной камере. Вопросу об эффективном смешивании уделено много внимания^{11, 54}. Основной вывод, который был сделан, заключается в том, что константы скорости, определенные при помощи «струевой» аппаратуры, можно считать надежными лишь для реакций с временами полупревращения более 0,2—1 мсек. «Мертвое» время современных «струевых» установок составляет примерно 0,1—0,3 мсек^{50, 51, 55}. Тем не менее, разработка достаточно простой и удобной аппаратуры привела к тому, что «струевые» методы (особенно метод «остановленной струи») нашли широкое применение для изучения промежуточных соединений в ферментативных реакциях. В табл. 1 приведены ферментативные системы, изученные «струевыми» методами.

Дальнейшее увеличение разрешающей способности аппаратуры для исследования нестационарной кинетики дает использование в энзимологии метода импульсного фотолиза (флеш-метод)¹⁰⁹⁻¹¹². В отличие от «струевых» методов флеш-метод не требует быстрого смешивания реагентов. При использовании светочувствительного пресубстрата, способного под действием света превращаться в субстрат, «мертвое» время метода определяется двумя параметрами: 1) временем импульсной вспышки, 2) временем фотохимического образования субстрата¹¹⁰. Ксеноновая импульсная техника позволяет получать мощные импульсы света продолжительностью 10—100 мсек¹¹³. Время вспышки может быть сокращено без уменьшения мощности при использовании лазерной техники¹¹¹. Время фотохимической реакции может быть достаточно коротким.

При использовании указанных выше методов наиболее детально изучены каталаза, пероксидаза и α -химотрипсин, и поэтому на механизмах действия этих ферментов ниже мы остановимся более подробно.

3. α -Химотрипсин

Протеолитический фермент α -химотрипсин катализирует гидролиз пептидных связей, а также гидролиз сложноэфирных и амидных связей модельных синтетических субстратов. Первым указанием на то, что в механизме катализа α -химотрипсином на стадии образования основного продукта P_1 (схема 16) образуется промежуточное соединение фермента с кислотной частью субстрата послужило наблюдение Хартли и Килби^{114, 115}, которые обнаружили, что выделение *p*-нитрофенола в реакции гидролиза *p*-нитрофенилацетата под действием α -химотрипсина протекает в две стадии — вначале наблюдается быстрый «выброс» *p*-нитрофенола в приблизительно стехиометрической концентрации по отношению к добавленному ферменту, затем следует стационарная, более медленная реакция дальнейшего гидролиза субстрата (критическое рассмотрение выводов этого исследования дано в 1). Кинетика обеих фаз реакции тщательно исследовалась методом «остановленной струи» в последующих

ТАБЛИЦА 1

Фермент	Субстрат или эффектор	Ссылки на литературу
Алкогольдегидрогеназа	Ароматические альдегиды; <i>p</i> -Нитрозо- <i>N</i> , <i>N</i> -диметиланилин	56 57
<i>α</i> -Амилаза	Бензальдегид, ацетальдегид	58—60
Гидроксилаза	<i>o</i> -Нитрофенил- <i>α</i> -мальтоза	61
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	<i>p</i> -Оксибензойная кислота	62
Глутаматдегидрогеназа	НАД	63
Енолаза	Глутаминовая кислота	64, 65
Карбаматкиназа	Взаимодействие субъединиц	66
Карбонгидраза	Карбамилфосфат, АДР	67
Карбоксинептидаза А	Сульфонамиды	68, 69
Каталаза	Zn^{2+}	70
Каталаза · H_2O_2	<i>N</i> -Дансилированные пептиды	71
Ксантиноксидаза	Перекись водорода	72
Лактатдегидрогеназа	Перекись водорода, этиловый спирт	72, 73
Оксидаза <i>D</i> -аминокислот	Ксантин, кислород	74
Папаин	НАД, молочная кислота	75—77
Пероксидаза	β -Хлораланин	78
Пероксидаза · H_2O_2	Нитрофениловые эфиры <i>κβ</i> -глицина	79
Стафиллококковая нуклеаза	<i>p</i> -Нитрофениловый эфир <i>κβ</i> - <i>L</i> -лизина	80
Трипсин	Перекись водорода, этилгидроперекись, метилгидроперекись	81
Триптофансинтетаза	Аскорбиновая кислота, гидрохинон	73
Фицин	Цитохром С	82
Химотрипсин	Ферроцианид	83
	Изомеризация (рН-скачок)	84
	Этиловый эфир <i>N</i> -бензоил- <i>L</i> -аргинина	31, 86
	<i>p</i> -Нитроанилид- <i>N</i> -бензоил- <i>L</i> -аргинина	87
	<i>p</i> -Нитрофенилацетат	108
	Структурные изменения	89
	<i>L</i> -серин, индол, триптофан	90
	Этиловый эфир <i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -аргинина	31, 86
	<i>p</i> -Нитрофениловый эфир гиппуровой кислоты	88
	<i>p</i> -Нитрофениловый эфир <i>κβ</i> - <i>L</i> -лизина	80
	<i>p</i> -Нитрофенилацетат	85, 91—94
	Метиловые и этиловые эфиры <i>N</i> -ацетилированных <i>L</i> -аминокислот	95—100
Цитохром С	Амид <i>N</i> -фуроилакрилоил- <i>L</i> -триптофана	98
Щелочная фосфатаза	Метиловый эфир <i>N</i> -фуроилакрилоил- <i>L</i> -триптофана	99
	<i>p</i> -Нитрофениловые эфиры <i>N</i> - <i>κβ</i> - <i>L</i> -аминокислот	101, 102
	<i>N</i> -Фуроилакрилоил- <i>L</i> -триптофан (рН-скачок)	103
	Циклические сульфонаты	104
	Профлавин	105
	Cr^{2+}	106
	О- <i>p</i> -Фенилазофенилфосфоротиоат	107

работах^{85, 91—94}. Оказалось, что кинетическая кривая выделения *p*-нитрофенола в этой реакции описывается уравнением (17) в предположении, что $k_1[S]_0 \gg k_2, k_3$. В этом случае зависимость $[P_1]$ от времени приобретает⁹¹ более простой вид:

$$[P_1] = At + B(1 - e^{-kt}) \quad (21)$$

$$A = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_m \frac{k_3}{k_2 + k_3}}; \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (22)$$

$$B = \frac{\left(\frac{k_2 [S]_0}{K_m + [S]_0} \right)^2 [E]_0}{\left(\frac{k_2 [S]_0}{K_m + [S]_0} + k_3 \right)^2} \quad (23)$$

$$k = \frac{k_2 [S]_0}{K_m + [S]_0} + k_3 \quad (24)$$

Действительно, при $[S]_0 \gg K_m$ и $k_2 \gg k_3$ имеем $B = [E]_0$, и, следовательно, начальный «выброс» *p*-нитрофенола соответствует исходной концентрации фермента (рис. 3) *. Эти результаты позволили установить наличие

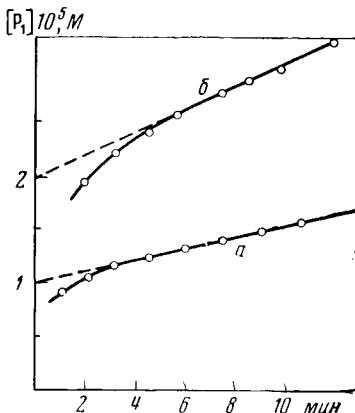


Рис. 3. Кинетика образования *p*-нитрофенола в реакции гидролиза *p*-нитрофенилацетата, катализируемой α -химотрипсином¹¹⁵. Концентрация фермента в случае *a* в два раза меньше, чем в случае *b*

в реакции промежуточного соединения X_2 (ацилфермент), которое, как было показано впоследствии, представляет собой эфир гидроксильной группы серина-195, входящего в активный центр фермента, и ацильной части субстрата^{117, 118 **}.

Кинетика ацилирования активного центра α -химотрипсина *p*-нитрофениловым эфиром 4-нитро-*транс*-коричной кислоты была изучена в работе¹¹⁰ методом импульсного фотолиза при использовании в качестве светочувствительного пресубстрата *цик*-изомера эфира. Стерические особенности строения активного центра фермента приводят к тому, что реакционная способность *транс*-стереоизомеров субстратов производных β -арилакриловых кислот в 10^3 — 10^4 раз выше, чем соответствующих *цик*-изомеров (*транс*-специфичность)¹²³. При действии импульса света на раствор α -химотрипсина с *p*-нитрофениловым эфиром 4-нитро-*цик*-коричной кислоты образуется высокореакционноспособный *транс*-стереоизомер, который ацилирует активный центр фермента. Кинетику реакции изучали спектрофотометрически по выделению *p*-нитрофенола.

p-Нитрофенилацетат и другие субстраты, использованные в описанных выше работах, являются малореакционными («неспецифическими») субстратами α -химотрипсина. Гутфрэйнд и Стэртевант^{91, 92} предположили, что катализ химотрипсином специфических эфирных субстратов, производных α -N-ацилзамещенных *L*-аминокислот, протекает по тому же механизму (16), что и гидролиз *p*-нитрофенилацетата. Доказательству этого предположения было уделено особое внимание^{96—100}.

* На этом принципе основаны современные методы определения концентрации активных центров многих ферментов¹¹⁶.

** Некоторые ацилферменты, стабильные в условиях низких значений pH, были выделены в индивидуальном виде (ацетилхимотрипсин¹¹⁷, гомологический ряд ацилферментов, образованных алифатическими карбоновыми кислотами от C_1 до C_7 ¹¹⁹, *цик*-и *транс*-изомеры циннаомилхимотрипсина^{120—122} и др.).

Указание на образование ацилфермента при гидролизе этилового эфира N-фурилакрилоил-L-тирофина следует из того факта, что выделение спирта опережает (как и в случае *p*-нитрофенилацетата) образование стационарной концентрации промежуточного соединения⁹⁵. Прямое кинетическое подтверждение образования промежуточных соединений X_1 и X_2 в катализе гидролиза эфиров N-ацилированных L-аминокислот получено в работах^{98, 124}. В последнем случае при анализе кинетики реакции на длинах волн поглощения промежуточных соединений (≈ 290 нм) было обнаружено, что кинетическая кривая описывается суммой, по крайней мере, двух экспоненциальных членов. Согласно уравнению (6)

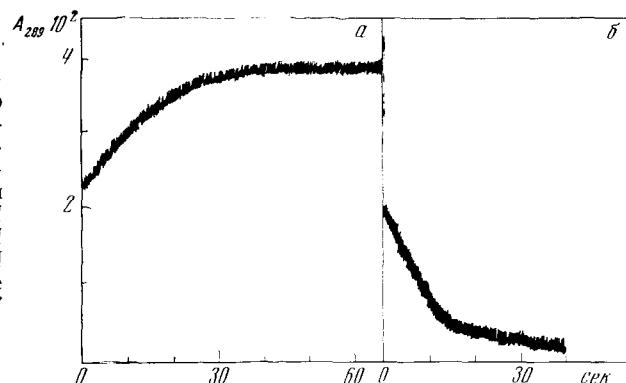
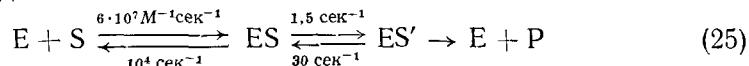


Рис. 4. Предстационарная кинетика гидролиза метилового эфира N-ацил-L-фенилаланина, исследованная методом «остановленной струи»⁹⁸: *a* — изменения оптической плотности при смешивании $3,7 \cdot 10^{-5}$ М α -химотрипсина и $1,7 \cdot 10^{-2}$ М субстрата при pH 3,2; *б* — pH раствора, полученного в опыте (*a*), поднимали от 3,2 до 5,7

это указывает на участие в механизме реакции, по крайней мере, двух промежуточных соединений. Так, при смешивании раствора α -химотрипсина с метиловым эфиром N-ацил-L-фенилаланина наблюдается быстрое, кинетически не разрешенное спектральное изменение (со временем полупревращения меньше 3 мсек, которое указывает, по-видимому, на образование первичного фермент-субстратного комплекса (X_1); далее следует медленная кинетика образования ацилфермента (рис. 4, кривая *a*). В стационарной фазе реакции, в условиях, когда расходом субстрата можно пренебречь, концентрация ацилфермента сохраняется постоянной; в конечном итоге расход субстрата приводит к исчезновению в растворе промежуточных соединений (рис. 4, кривая *б*). Аналогичная картина имеет место при химотрипсиновом гидролизе других специфических эфирных субстратов — метиловых эфиров N-ацил-L-тирофина, N-ацил-L-триптофана, N-ацил-L-лейцина, этилового эфира N-ацил-L-тирофина. Из анализа кинетической кривой ацилирования для всех этих субстратов были определены в соответствии с уравнением (24) константы скорости образования (k_2) и гидролиза (k_3) ацилферментов¹²⁴.

Как показано в работах^{97, 98}, в механизме гидролиза амидов стадия образования ацилферментов лимитирует скорость процесса ($k_2 \ll k_3$). Для этого класса субстратов удалось получить более детализированную картину образования фермент-субстратного комплекса X_1 . С использованием комбинированной установки «остановленная струя — температурный скачок» (см. ниже) показано⁹⁸, что в реакции гидролиза амида N-фурилакрилоил-L-триптофана образование реакционноспособного фермент-субстратного комплекса протекает через стадию метастабильного промежуточного соединения:



Из анализа кинетической кривой, описываемой суммой двух экспоненциальных членов, были определены константы скорости образования первичного комплекса ES и конформационного изменения $ES \rightleftharpoons ES'$ (схема 25).

Конформационная подвижность активного центра α -химотрипсина была кинетически обнаружена при анализе взаимодействия акридинового красителя профлавина с активным центром фермента. Проведенный в работе ¹⁰⁵ анализ кинетики комплексообразования показывает, что активный центр фермента в растворе существует в виде двух конформаций, которые способны с существенно различными скоростями связывать краситель. Соотношение концентраций конформеров зависит от pH среды.

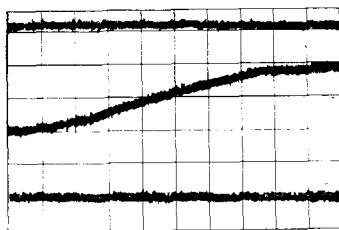


Рис. 5. Оциллограмма изменений пропускания после импульсного облучения раствора 4-нитро-цис-циннамоилхимотрипсина ($0,1 M$ KCl, $0,01 M$ KH_2PO_4 , 25° , pH 8,8). Горизонтальными линиями отмечены 0 и 100% пропускания, развертка 0,25 сек. на большое деление 10^9

На стадии гидролиза ацилфермента конформационное изменение активного центра зарегистрировано в реакции гидролиза *n*-нитро-*транс*-циннамоилхимотрипсина, индуцированной импульсным облучением *цис*-стереоизомера ¹⁰⁹. При импульсном облучении раствора ацилфермента (*p*-нитро-*цис*-циннамоилхимотрипсина) на длинах волн поглощения циннамоильного хромофора (320—360 nm) изменение оптической плотности складывается из трех кинетически разрешенных процессов (рис. 5). Механизм реакции включает три стадии и описывается схемой (26)



Проведенный спектрофотометрический анализ и анализ pH-зависимости показали, что первой быстрой стадией процесса является фотохимическая *цис*-*транс*-изомеризация циннамоильной группы в активном центре фермента, в то время как медленная завершающая стадия реакции представляет собой гидролиз образовавшегося *транс*-изомера. Наблюдаемый на кинетической кривой выделения *транс*-нитрокоричной кислоты период индукции (стадия $trans\text{-}EA' \rightarrow trans\text{-}EA$) связан, по-видимому, со специфическими конформационными изменениями активного центра, приводящими к образованию каталитически активной структуры активного центра.

Таким образом, проведенный к настоящему времени детальный кинетический анализ реакций, катализируемых α -химотрипсином, показывает, что в механизме действия фермента участвуют лабильные промежуточные соединения, которые представляют собой как ковалентнообразованные соединения (ацилфермент), так и нековалентные комплексы и конформеры фермента.

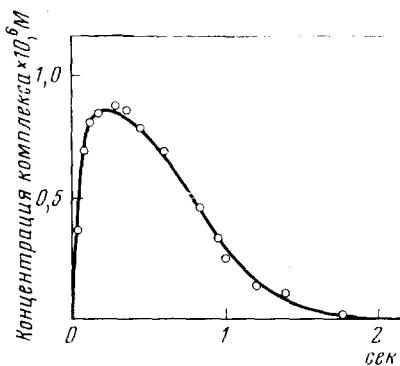
4. Каталаза и пероксидаза

Спектры поглощения в видимой области комплексов гемсодержащих ферментов каталазы и пероксидазы с перекисью водорода и органическими перекисями существенно отличаются от спектров поглощения исходных ферментов. Это позволило Чансу кинетически проследить непосредственно за образованием и расходом этих лабильных промежуточ-

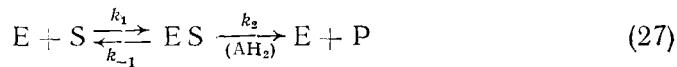
ных соединений методами «ускоренной» и «остановленной струи» с использованием высокочувствительной спектрофотометрической аппаратуры^{72, 73, 81, 82}.

При быстром смешивании растворов каталазы с перекисью водорода была зарегистрирована кинетика образования комплексов каталазы — перекись водорода, каталаза — органические перекиси и более медленная кинетика его исчезновения в результате расхода перекисного соединения (рис. 6). Скорость исчезновения комплекса увеличивается в при-

Рис. 6. Изменение концентрации комплекса пероксидаза — перекись водорода при смешивании $1,0 \cdot 10^{-6} M$ пероксидазы и $4,0 \cdot 10^{-6} M H_2O_2$ (pH 4,0)¹²⁶



существии субстратов-доноров электронов (для этой цели были использованы алифатические спирты и гликоли)^{125, 128}. Эти результаты позволили представить механизм пероксидазного действия каталазы, который включает стадию образования промежуточного фермент-субстратного соединения и стадию бимолекулярного взаимодействия этого соединения с молекулой донора AH_2 (схема 27).



Формально-кинетическое описание двухсубстратной реакции с одним промежуточным соединением обсуждается в работах^{32, 125-127}. При условии, что концентрация второго субстрата практически не изменяется в процессе реакции ($[AH_2] \gg [E]_0, [S]_0$), кинетику реакции (27) описывает система уравнений (28—29):

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1([E]_0 - [ES])[S] \quad (28)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E]_0 - [ES])[S] - (k_{-1} + k_2[AH_2]_0)[ES] \quad (29)$$

Константа скорости k_1 была определена¹²⁵ в соответствии с уравнением (29) из начальной скорости образования промежуточного соединения в условиях небольшой глубины образования комплекса (уравнение (30))

$$k_1 \approx \frac{1}{([E]_0 - [ES])[S]_0} \cdot \frac{d[ES]}{dt} \quad (30)$$

Суммирование уравнений (28) и (29) приводит к соотношению (31):

$$\frac{d[S]}{dt} + \frac{d[ES]}{dt} = -k_4[AH_2]_0[ES] \quad (31)$$

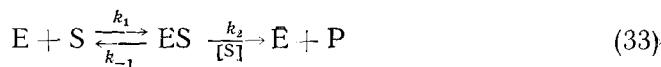
Интегрирование этого соотношения при условии полного расхода промежуточного соединения и субстрата ($t=0, [S]=[S]_0, [ES]=0; t \rightarrow \infty$,

$[S]=0$; $[ES]=0$) дает уравнение (32), которое позволяет найти величину константы скорости k_2 (схема 27). Интеграл $\int_0^\infty [ES] dt$ численно определяли по площади, которую

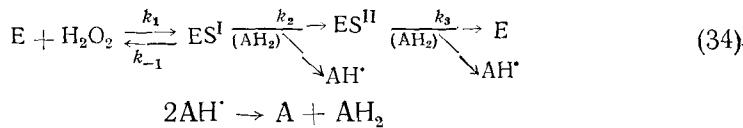
$$k_2 = \frac{[S]_0 \int_0^\infty}{[AH_2]_0 \cdot \int_0^\infty [ES] dt} \quad (32)$$

ограничивает кинетическая кривая образования и расхода фермент-субстратного комплекса (рис. 4). Реакция взаимодействия комплекса ES с донорной молекулой является бимолекулярной, а не идет через образование тройного комплекса фермент — перекись — молекула донора¹²⁹. Так, для системы каталазы — метилгидроперекись — метанол было найдено, что определяемая величина k_2 не зависит от концентрации метанола ($0,2$ — $0,08 M$).

Согласно Чансу¹²⁵, механизм каталазного действия каталазы существенно не отличается от механизма пероксидазного действия этого фермента. В качестве донорной молекулы в этом случае выступает вторая молекула перекиси водорода (схема 33)



Механизм катализа пероксидазой более сложен, чем механизмы реакций каталазы. Для этого фермента характерно соизмеримое по скоростям образование двух спектрально различных комплексов с перекисью водорода. Комплекс I образуется сразу при добавлении H_2O_2 ; это нестойкое соединение зеленого цвета быстро превращается в красный комплекс II. Превращение комплекса I в комплекс II происходит быстрее в присутствии донора водорода. Общая схема процесса, составленная на основе измерений быстрой кинетики, имеет следующий вид^{125, 130}:



III. СТАЦИОНАРНАЯ ФАЗА РЕАКЦИИ

1. Многостадийные катализитические реакции

Кинетическое описание реакции (1) можно существенно упростить в условиях ее стационарного протекания. На опыте стационарный режим устанавливается, как правило, после некоторого промежутка времени с начала реакции. Это следует из уравнений (6) и (7), поскольку при достаточно больших значениях t концентрация промежуточных соединений достигает постоянных (стационарных) значений, равных

$$[X_n]_{t \rightarrow \infty} = B \quad (35)$$

и концентрация продукта линейно возрастает во времени:

$$[P]_{t \rightarrow \infty} = k_{n+1} B t - k_{n+1} \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{\lambda_i} \quad (36)$$

при условии, что расходом субстрата в начальный период реакции можно практически пренебречь.

Анализ условий, ограничивающих справедливость использования уравнений стационарной кинетики для исследования механизмов ферментативных реакций, дан в ^{15, 131, 132}, в том случае, если скорость изменения концентрации промежуточных соединений X_i много меньше скорости изменения концентрации продуктов реакции или исходных веществ, каждую из производных концентраций промежуточных соединений можно приравнять нулю, $d[X_i]/dt=0$ (см. систему уравнений (3)). В итоге, задача сводится к совместному решению системы $n+2$ алгебраических уравнений и одного дифференциального уравнения. Решение такого рода системы уравнений приведено в ¹³³⁻¹³⁶. Для стационарной скорости реакции имеем в данном случае обычное уравнение Михаэлиса для обратимых реакций:

$$v = \frac{\frac{V_S}{K_S} [S]_0 - \frac{V_P}{K_P} [P]_0}{1 + [S]_0/K_S + [P]_0/K_P} \quad (37)$$

в котором, однако, входящие параметры, максимальные скорости V_S , V_P и константы Михаэлиса K_S , K_P — это функции констант скоростей элементарных стадий. Выражение этих величин через константы скоростей кинетической схемы (1) приведено в ¹³³.

Развитию теории стационарной кинетики и ее практическому применению к исследованию конкретных механизмов ферментативных реакций посвящено много работ ^{15, 131-145}. Необходимо, однако, отметить, что изучение стационарной кинетики ферментативной реакции имеет весьма ограниченное значение для понимания многостадийного механизма действия ферментов. Это связано прежде всего с тем, что в общем случае, без привлечения других дополнительных данных невозможно однозначно приписать экспериментально определяемые значения констант скоростей элементарным химическим стадиям, поскольку из зависимости скорости процесса от начальных концентраций S и P можно определить лишь четыре кинетических параметра K_S , K_P и V_S , V_P , в то время как число констант скоростей элементарных реакций процесса (1) равно $2(n+1)$. Очевидно, что при $n>1$ определение всех элементарных констант реакции (1) становится невозможным.

Тем не менее, на основании стационарной кинетики можно определить нижние пределы констант скоростей элементарных стадий. Это связано с тем, что параметры стационарной кинетики определяет лимитирующая стадия. Нижний предел константы скорости любой мономолекулярной стадии в прямом направлении реакции (1) дается ¹³³ выражением:

$$k_{i+1} \geq \frac{V_S}{[E]_0}; \quad i \neq 0 \quad (38)$$

Для обратной реакции аналогично имеем

$$k_{-i} \geq \frac{V_P}{[E]_0}; \quad i \neq n+1 \quad (39)$$

Полученные выражения позволяют проанализировать данные по стационарной кинетике ферментативных реакций и оценить скорости наиболее медленных стадий. Для этой цели в табл. 2 приведены значения $V_{\text{макс.}}/[E]_0$ для ряда ферментативных систем ¹².

ТАБЛИЦА 2

Фермент	$V_{\max}/[E]_0$, сек $^{-1}$	Фермент	$V_{\max}/[E]_0$, сек $^{-1}$
Ацетилхолинэстераза	10^3	Киназа	10^3
Химотрипсин	10^2 — 10^3	Уреаза	10^4
Трипсин	10^2 — 10^3	Фумараза	10^3
Рибонуклеаза	10^2	Альдолаза	10^2
Папаин	10	Дегидрогеназа	10^3
Карбоксипептидаза	10^2	Катализ	10^7
Миозин-АТФ-аза	10^2	Пероксидаза	10

Данные, приведенные в табл. 2, характеризуют эффективность ферментативного катализа. Как видно из этой таблицы, для большинства ферментов константы скорости лимитирующих процессов мономолекулярного превращения промежуточных соединений лежат в интервале 10^2 — 10^3 сек $^{-1}$.

Нижние пределы констант скорости можно определить¹³² также и для бимолекулярных стадий реакции (1), k_1 и $k_{-(n+1)}$. Они соответственно равны:

$$k_1 \geq \frac{V_S + V_P}{[E]_0 K_S} \quad (40)$$

$$k_{-(n+1)} \geq \frac{V_S + V_P}{[E]_0 K_P} \quad (41)$$

Анализ предельных значений констант скоростей ряда конкретных ферментативных реакций проделан в работах^{12, 133}. Результаты этого анализа приведены в табл. 3. Для некоторых реакций (фумараза) мини-

ТАБЛИЦА 3

Фермент	Субстрат	Минимальное значение k_1 , м $^{-1}$ ·сек $^{-1}$
β-Амилаза	Амилоза	$5 \cdot 8 \cdot 10^7$
Уреаза	Мочевина	$5 \cdot 0 \cdot 10^6$
АТФ-аза	АТФ	$8 \cdot 10^6$
Цитохром-Суредуктаза	Цитохром С	$9 \cdot 10^7$
Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин	10^9
Фумараза	Фумаровая кислота	$0,5 \cdot 10^8$
	L-малоновая кислота	$1,6 \cdot 10^8$
	Фумаровая кислота в от- сутствие ионной силы	$3 \cdot 10^{10}$

мальное значение бимолекулярной константы скорости k_1 приближается к пределу, предсказанному теорией реакций, контролируемых диффузией реагентов.

Помимо оценки нижних пределов реакционной способности промежуточных соединений, изучение стационарной кинетики может быть полезным также и для получения более детальных сведений об их свойствах. При этом, однако, механизм реакции должен быть достаточно хорошо известным. В качестве примера рассмотрим некоторые итоги исследования катализа α -химотрипсином.

2. Изучение ацилферментного промежуточного соединения в катализе α -химотрипсином методами стационарной кинетики

В результате исследования предстационарной кинетики реакций, катализируемых α -химотрипсином, было установлено, что механизм катализа включает стадии образования и гидролиза промежуточного ацилфермента (схема 16). Стационарная скорость такой реакции описывается¹⁴⁶ следующим уравнением:

$$v = \frac{k_{\text{кат.}} [E]_0 [S]_0}{K_{m(\text{каж.})} + [S]_0} \quad (42)$$

где

$$k_{\text{кат.}} = k_2 k_3 / k_2 + k_3 \quad (43)$$

$$K_{m(\text{каж.})} = K_S k_3 / k_3 + k_2; \quad K_S = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (44)$$

Из уравнений (42—44) видно, что определяемые на опыте параметры $k_{\text{кат.}}$ и $K_{m(\text{каж.})}$ — это сложные функции констант скоростей обеих химических стадий ферментативного процесса. Следовательно, при соизмеримых значениях величин k_2 и k_3 определяемые параметры не характеризуют реакционную способность какого-либо индивидуального промежуточного соединения. Тем не менее в настоящее время из данных стационарной кинетики удалось получить богатый экспериментальный материал, описывающий реакционную способность как фермент-субстратного комплекса, так и промежуточного ацилфермента. Помимо некоторых косвенных методов¹⁴⁶ для анализа реакционной способности в катализе α -химотрипсином использовались два основных подхода.

а. Исследование субстратов с известной лимитирующей стадией

Из данных по стационарной кинетике ($k_{\text{кат.}}$, $K_{m(\text{каж.})}$) можно определить константу скорости лимитирующей стадии лишь в том случае, когда реакционные способности промежуточных частиц ES и EA различаются достаточно сильно. Это видно из уравнений (42—44), откуда при $k_2 \gg k_3$ следует, что:

$$k_{\text{кат.}} = k_3; \quad K_{m(\text{каж.})} = K_S k_3 / k_2 \quad (45)$$

При $k_3 \gg k_2$ справедливы другие соотношения:

$$k_{\text{кат.}} = k_2; \quad K_{m(\text{каж.})} = K_S \quad (46)$$

Этот подход был использован^{147—150} при анализе взаимосвязи между структурой и реакционной способностью (k_3) ацилферментных промежуточных соединений, образующихся при гидролизе *p*-нитрофениловых эфиров алифатических карбоновых кислот (C₁—C₇).

б. Определение элементарных констант путем селективного воздействия на скорость отдельных стадий ферментативной реакции

Использование этого метода рассмотрено на примере реакции с одним промежуточным соединением^{151—153}. Для случая трехстадийного механизма катализитической реакции (16) данный подход анализировался в работах^{154—161}. Так, в приложении к α -химотрипсину для этой цели было использовано явление обратимого ингибирующего влияния катионов тяжелых металлов на стадию ацилирования (k_2) фермента^{162—165} или же влияние на ту же стадию реакции ионной силы раствора¹⁵⁵.

На рис. 7 в качестве примера приведены данные по влиянию ионной силы раствора на стационарный гидролиз этилового эфира N-бензоил-L-тирозина под действием α -химотрипсина. Согласно¹⁶⁵ абсцисса точки пересечения дает значение $-1/K_s$, ордината $-1/k_s$.

Однако наибольшего развития и последовательного применения в реакциях с участием переноса ацильной группы нашел метод конкури-

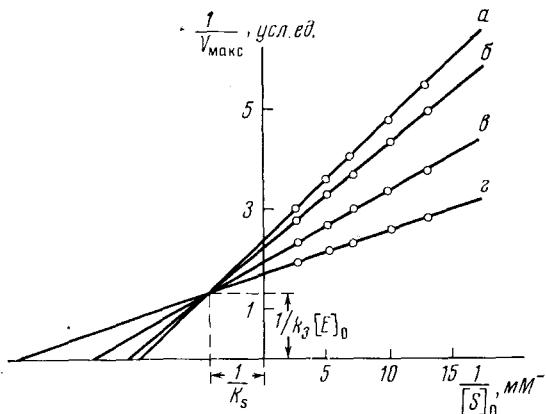
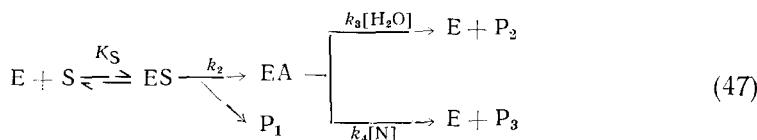


Рис. 7. Зависимость начальной стационарной скорости α -химотриптического гидролиза этилового эфира N -бензойл- L -тирозина от ионной силы (KCl моль/л):
 $a = 0,1$; $b = 0,2$; $c = 0,5$; $d = 1,0$; pH 7,8 (pH-стат), 25°, 6 об. % ацетонитрила¹⁵⁵

ирующих реакций, основанный на конкуренции между водой и добавленным нуклеофильным реагентом за реакцию с ацилферментом^{156-159, 166}



В соответствии со схемой (47) экспериментально определяемые параметры связаны с концентрацией добавленного нуклеофила следующими соотношениями:

$$k_{\text{KAT.}(1)} = \frac{k_2 (k_3 + k_4 [\text{N}])}{k_2 + k_3 + k_4 [\text{N}]} \quad (48)$$

$$k_{\text{kat.}(2)} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3 + k_4 [N]} \quad (49)$$

$$K_{m(\text{как.})} = K_S \frac{k_3 + k_4 [\text{N}]}{k_2 + k_3 + k_4 [\text{N}]} \quad (50)$$

где $k_{\text{кат.}(1)}$, $k_{\text{кат.}(2)}$ — определяемые из уравнения (42) кинетические параметры при анализе стационарной скорости реакции по образованию продуктов P_1 и P_2 , соответственно. Анализируя зависимости $k_{\text{кат.}}$ и K_m (наж.) от концентрации добавленного нуклеофила в соответствии с уравнениями (48—50) можно определить раздельно константы скоростей стадий ацилирования и гидролиза ацилферментов, а также константу равновесия K_S .

К недостаткам этой методики следует отнести неопределенность в механизме влияния нуклеофила на ацилфермент, а также необходимость учитывать ингибирующий эффект добавленного нуклеофила¹⁵⁸.

При исследовании реакционной способности промежуточных ацилферментов этот подход нашел последовательное применение в работах^{158, 159} с использованием 1,4-бутандиола в качестве добавленного нуклеофила. В работе¹⁵⁹ определены константы скорости образования и

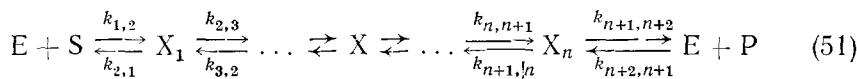
гидролиза гомологического ряда ацилферментов, образованных N-ацилированными производными *L*-аминокислот. Полученные результаты позволили сделать определенные выводы о структуре активного центра и механизме специфичности α -химотрипсина^{147, 160}.

IV. МЕТОДЫ РЕЛАКСАЦИОННОЙ КИНЕТИКИ

1. Многостадийные каталитические реакции

Релаксационные методы исследования кинетики химических реакций основаны на том принципе, что при быстром внешнем воздействии на систему (изменение температуры, давления, электрического поля) время, которое нужно системе для достижения нового равновесного (или стационарного) состояния, зависит от скорости химической реакции (или, иногда, от скорости диффузии реагентов). Переход системы к новым равновесным концентрациям реагентов называют «химической релаксацией»¹⁶⁷. Внешнее влияние, возмущающее систему, может быть как однократным (скажок температуры, давления, электрический импульс), так и периодическим (поглощение ультразвука). Разрешающая способность релаксационных методов находится в пределах от 10^{-5} сек. (температурный скачок) до 10^{-10} сек. (поглощение ультразвука)^{11-13, 26}.

Формально-кинетические аспекты анализа релаксационной кинетики сложных химических реакций рассмотрены в работах^{12, 26, 168, 182}.



Релаксационную кинетику ферментативной реакции, протекающей через n промежуточных соединений (реакция 1), анализировали Хаммес и Альберти¹⁶⁹, а также Эйген и Хаммес¹². Для системы, находящейся в состоянии равновесия, концентрации всех веществ постоянны и, соответственно, равны $[\bar{E}]$, $[\bar{S}]$, $[\bar{X}_1] \dots [\bar{X}_n]$, $[\bar{P}]$. При быстром внешнем воздействии концентрации реагентов примут новые значения, соответствующие новому равновесию. Текущую концентрацию каждого из компонентов можно записать в следующем виде: $([\bar{E}] + \Delta[E])$, $([\bar{S}] + \Delta[S])$, $([\bar{X}_1] + \Delta[X_1]) \dots ([\bar{X}_n] + \Delta[X_n])$, $([\bar{P}] + \Delta[P])$, где знаком Δ обозначены изменения концентраций реагентов. Для того, чтобы найти функциональную зависимость концентрации каждого из компонентов реакции от времени, необходимо решить систему уравнений (2—3). Эта система уравнений будет линейной, если смещение равновесия невелико. Действительно, в этом случае бимолекулярные члены $k_1[E][S]$ и $k_{(n+1)}[E][P]$, которые приводят к нелинейности системы, можно представить в виде $k_1([\bar{S}] + \Delta[S])([\bar{E}] + \Delta[E]) = k_1([\bar{E}][\bar{S}] + + [\bar{E}]\Delta[S] + + [\bar{S}]\Delta[E] + \Delta[S]\Delta[E])$ и, соответственно, $k_{(n+1)}([E][P] + + [\bar{E}]\Delta[P] + [\bar{P}]\Delta[E] + \Delta[P]\Delta[E])$. При малом смещении равновесия можно пренебречь членами, содержащими Δ^2 . В результате систему уравнений (2—3) можно упростить, приведя к следующему виду:

$$\frac{d \Delta[S]}{dt} = a_{1,1} \Delta[S] + \sum_{i=1}^n a_{i,i+1} \Delta[X_i] \quad (52)$$

$$\frac{d \Delta[X_i]}{dt} = a_{i,1} \Delta[S] + \sum_{j=1}^n a_{i,j} \Delta[X_j]$$

где постоянные $a_{i,j}$ — функции констант скорости элементарных химических реакций и исходных равновесных концентраций компонентов реакции (51). Аналогично, как и для вышеописанной системы уравнений (4), общее решение (с точностью до постоянной) может быть найдено в виде:

$$\Delta[S] = \sum_{j=1}^{n+1} A_j e^{\lambda_j t} \quad (53)$$

$$\Delta[X_j] = \sum_{j=1}^{n+1} B_{i,j} e^{\lambda_j t}$$

где λ_j — корни характеристического уравнения $n+1$ степени.

Важный вывод, который следует из проведенного рассмотрения, заключается в том, что в случае n промежуточных соединений реакции число экспоненциальных членов равно $n+1$. Таким образом, наблюдаемое на опыте число экспонент можно рассматривать как критерий минимального числа промежуточных соединений, принимающих участие в реакции. Экспериментально определяемые величины времен релаксаций ($-1/\lambda_j$) — это функции всех констант скоростей элементарных реакций и равновесных концентраций реагентов.

ТАБЛИЦА 4

Фермент	Субстрат или эффектор	Ссылки на литературу
Алкогольдегидрогеназа	НАД — имидазол	176
Аспартатамиотрансфераза	Аспарагиновая, глутаминовая, щавелевоуксусная, кетоглутаровая кислоты	177
	α -Метиаспарагиновая кислота	178
	Эритро- β -оксиаспарагиновая кислота	179
	5-Бромцигидрофосфат	180
Аспартаттранскарбамилаза	Карбамилфосфат, <i>L</i> -малоновая, янтарная кислоты	183—185
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	НАД	186—192
Кислотная фосфатаза	<i>p</i> -Нитрофенилфосфат	193
Креатинкиназа	Креатинфосфат	194
Лактатдегидрогеназа	НАДН	195—196
Лизоцим	Сахариды	197, 198
Малатдегидрогеназа	Альб. Бибриха	199
Пищеварительная киназа	НАДН, малоновая кислота	200, 201
Рибонуклеаза	Ионы двухвалентных металлов, АДР	202
Сериндегидрогеназа	Нуклеотиды	202—209
Серинтрансоксиметилаза	Изомеризация	210—213
Трипсин	Изомеризация	214
Триптофансинтетаза	Глицин	215
Уреаза	Изомеризация	210, 211
Флаводоксин	Профлавин-бензамидин	174, 216
Химотрипсин	<i>L</i> -Серин, индол, триптофан	217, 218
	Мочевина	219
	Взаимодействие кофермента с апопротеином	220—222
	Профлавин	175, 223, 224
	Профлавин и метиловый эфир N-тозил- <i>L</i> -аргинина	225
Цитохром С	Альб. Бибриха	226
	Изомеризация	211
	Феррицианид	175

Частные случаи схемы (51) (случай одного и двух промежуточных соединений) и конкретные подходы к определению констант скорости элементарных стадий описаны в работах^{13, 167–173}.

В работах^{13, 26, 174} показано, что помимо кинетических данных (времен релаксации) при анализе механизмов реакций могут оказаться полезными данные по амплитудам релаксаций.

К настоящему времени с использованием релаксационных методов изучено большое число ферментативных систем. Приведенные в табл. 4 ферментативные системы изучены в основном методом температурного скачка. Быстрое изменение температуры обычно достигается разрядом высоковольтного конденсатора через реакционную ячейку, которая содержит, в добавление к реагентам, определенное количество инертного электролита для понижения электрического сопротивления. Температурное изменение на 3–10° происходит за 10^{–6} сек^{11–13}. Для изучения кинетики быстрых обратимых стадий, предшествующих *необратимой* лимитирующей стадии, была предложена аппаратура, которая представляет собой комбинацию установки «остановленной струи» и «температурного скачка»¹⁷⁵. Температурный скачок может быть осуществлен в интервале от миллисекунды до нескольких секунд после остановки струи.

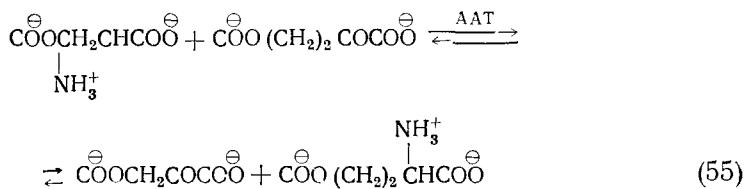
Дальнейшее уменьшение «мертвого» времени методики «температурный скачок» связано с применением лазерного излучения для импульсного подогрева реакционной ячейки^{227, 228}.

В работах^{229–231} обсуждаются возможности использования методики импульсного фотолиза для изучения релаксационной кинетики ферментативных реакций. Изменение равновесия в этом случае достигается за счет протекания быстрой сопряженной фотохимической реакции. Особого внимания заслуживают индуцированные светом быстрые изменения pH (флеш-индуцируемый pH-скачок)²²⁹.

2. Аспартатаминотрансфераза, рибонуклеаза

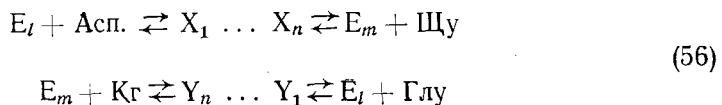
В обзоре²³², посвященном изучению ферментативных реакций релаксационными методами, обсуждаются механизмы следующих ферментативных реакций: 1) реакции аспартатаминотрансферазы с амино- и кетокислотами; 2) реакция цитохрома С с ферроцианидом; 3) реакция алкогольдегидрогеназы с НАД-имидаэол и связывание НАДН с малатдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой; 4) гидролиз *p*-нитрофенилфосфата кислотной фосфатазой; 5) реакции панкреатической рибонуклеазы А. Как видно из табл. 4, наиболее детально изучены механизмы реакций аспартатаминотрансферазы и рибонуклеазы. Эти примеры дают представление как о возможностях релаксационной кинетики, так и о достижениях энзимологии в исследовании механизмов ферментативного катализа.

Аспартатаминотрансфераза (ААТ) катализирует обратимую реакцию переноса аминогруппы между аспарагиновой и кетоглутаровой кислотами с образованием щавелевоуксусной и глутаминовой кислот (схема 55).



В качестве кофермента в этой реакции участвует пиридоксальфосфат, который в процессе реакции претерпевает существенные спектральные

изменения, что обеспечивает удобный метод наблюдения за кинетикой реакции. В общих чертах механизм реакции заключается в переносе аминогруппы с аминокислоты на пиридоксальфосфат с образованием пиридоксаминфосфата и кетокислоты, после чего следует перенос аминогруппы к другой кетокислоте с образованием новой аминокислоты²³³ (схема 56).



На схеме (56) E_l — фермент в форме пиридоксала, E_m — фермент в форме пиридоксамина, Асп — аспарагиновая кислота, Щу — щавелевоуксусная кислота, Глу — глутаминовая кислота, X_i , Y_i — промежуточные соединения реакции, Кг — кетоглутаровая кислота.

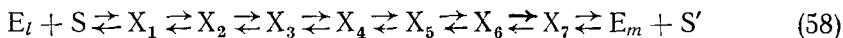
Изучение этой системы методом температурного скачка¹⁷⁷ позволило обнаружить в каждой из реакций (превращение аспарагиновой кислоты в щавелевоуксусную и кетоглутаровой в глутаминовую, по крайней мере, по два промежуточных соединения (при исследовании каждой реакции были обнаружены три времени релаксации, лежащие в интервале 50 мксек — 20 мксек). Были изучены зависимости времен релаксации от концентраций субстратов и фермента и определены (или оценены) константы скорости, характеризующие отдельные стадии. Исследование спектральных характеристик промежуточных соединений показало, что они представляют собой, по-видимому, ковалентные соединения субстратов с пиридоксальфосфатом, включающие шиффовы основания.

Помимо изученных стадий, в реакции аспартатаминонтрansферазы наблюдали более быстрые спектральные изменения, кинетику которых нельзя было проанализировать при использовании методики температурного скачка. С целью замедления скорости этих стадий реакции было исследовано взаимодействие с ферментом некоторых модифицированных субстратов. Аналог субстратов, *L*- α -метиляспарагиновая кислота, является конкурентным ингибитором аминокислотных субстратов и способна образовывать на ферменте альдимин с пиридоксальфосфатом. Однако, из-за наличия метильной группы в α -положении, трансаминирование протекать не может. Кинетическое изучение этой системы комбинированным методом «остановленной струи — температурного скачка» обнаружило, что реакция протекает в три стадии¹⁷⁸:



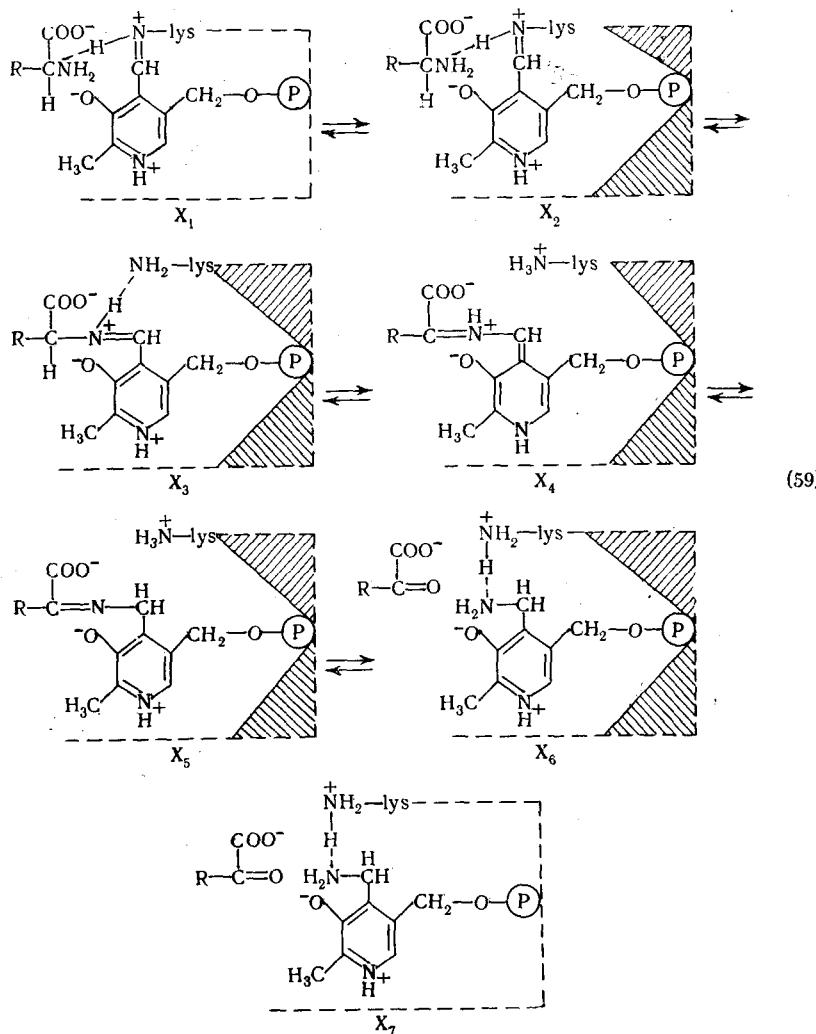
Были определены все константы скорости этого механизма и изучены спектральные свойства промежуточных соединений. Согласно¹⁷⁸, реакция включает образование первичного комплекса X_1 , за которым следует конформационное изменение ($X_1 \rightleftharpoons X_2$) и образование альдимина (X_3).

Эритроизомер *L*- β -оксиаспарагиновой кислоты представляет собой субстрат фермента, однако реакция трансаминирования протекает очень медленно. При изучении реакции этого субстрата с аспартатаминонтрansферазой было обнаружено восемь времен релаксаций¹⁷⁹. В соответствии с этим простейший механизм реакции имеет вид:

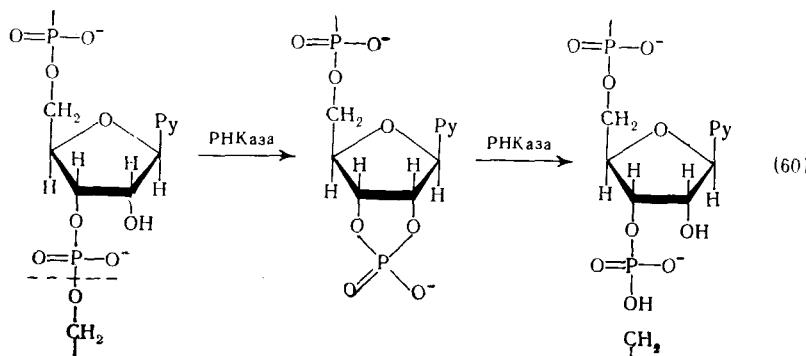


где S' — кетоформа субстрата. Детальный анализ зависимости времен релаксаций и констант равновесий от концентраций позволил вычислить 14 и 16 кинетических констант, описывающих механизм (58). Кроме того, были определены спектральные характеристики промежуточных

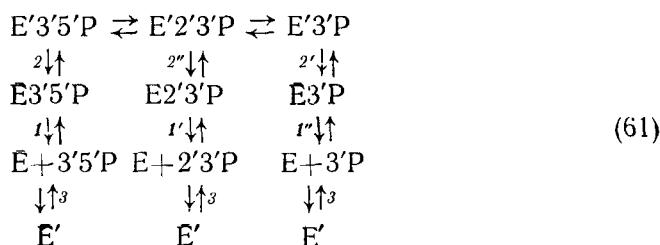
соединений. Предполагаемый механизм реакции, согласующийся с полученными результатами, представлен на схеме (59)²³⁴. Первые три промежуточные соединения имеют спектральные характеристики, аналогичные соединениям X_1 , X_2 , X_3 в реакции L - α -метиласпартатаминотрансферазы, и реакция, на этих стадиях, по-видимому, также заканчивается образованием альдимина (X_3). Промежуточное соединение X_4 имеет максимумы поглощения при 460 и 490 nm , причем молярное поглощение при 490 nm превышает $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. По мнению авторов¹⁷⁹, это соединение имеет хиноидную структуру, остальные три соединения имеют максимумы поглощения в районе 330 nm и представляют собой кетимины (схема 59).



Так же детально, как механизм катализа аспартатаминотрансферазой, Хаммесом был изучен механизм действия рибонуклеазы А²⁰³⁻²⁰⁹. Реакция, катализируемая этим ферментом, включает переэтерификацию 3',5'-динуклеотида с образованием циклического 2',3'-циклофосфата, после чего следует гидролиз циклического фосфата с образованием 3'-нуклеотида (схема 60).



При исследовании релаксационной кинетики использовались синтетические субстраты, что существенно упрощает кинетический анализ. Изучено взаимодействие с ферментом всех трех классов субстратов. На основе этих исследований предложен «минимальный» механизм, который представлен на схеме (61).



Для каждого класса субстратов ($3',5'$ -динуклеотид, $2',3'$ -циклофосфат, $3'$ -нуклеотид) реакция включает бимолекулярную стадию образования первичного комплекса (стадии 1 , $1'$, $1''$), за которой следует его изомеризация (стадии 2 , $2'$, $2''$). Кроме того, исследование свободного фермента показало, что фермент существует в двух конформациях (стадия 3). Эти кинетические результаты были сопоставлены с данными рентгеноструктурного анализа^{235, 236}, что позволило постулировать детальный механизм действия фермента^{209, 232}.

Исследования механизмов действия аспартатаминотрансферазы и рибонуклеазы А прекрасно иллюстрируют возможности и достижения методов «быстрой» кинетики при изучении механизмов ферментативного катализа. Итоги этих исследований могут быть поучительными для выбора подходов к изучению и других катализитических систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Дженкс, Каталит в химии и энзимологии, «Мир», М., 1972.
2. Т. Брюс, С. Бенкович, Механизмы биоорганических реакций, «Мир», М., 1970.
3. И. В. Березин, А. К. Яцимирский, К. Мартинек, Усп. химии, 42, 1729 (1973).
4. В. А. Кабанов, ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 16, 446 (1971).
5. А. Е. Шилов, Там же, 16, 450 (1971).
6. И. В. Березин, К. Мартинек, Там же, 16, 411 (1971).
7. А. Е. Браунштейн, М. Я. Карпейский, Там же, 16, 362 (1971).
8. Н. С. Андреева, Там же, 16, 368 (1971).
9. М. F. Perutz, European J. Biochem., 8, 455 (1969).
10. L. Michaelis, M. L. Menten, Biochem. Ztschr., 49, 333 (1913).
11. Е. Колдин, Быстрые реакции в растворе, «Мир», М., 1966.
12. M. Eigen, G. G. Hammes, Adv. Enzymology, 25, 1 (1963).

13. *P. B. Chock*, *Biochimie*, **53**, 151 (1971).
14. Применение вычислительной математики в химической и физической кинетике, сб. статей под ред. Л. С. Полак, «Наука», М., 1969.
15. Ч. Уолтер, Кинетика ферментативного катализа, «Мир», М., 1969.
16. С. М. Гордей, Ю. Г. Остапов, Мол. биол., **7**, 475 (1973).
17. Л. С. Понtryagin, Обыкновенные дифференциальные уравнения, «Наука», М., 1970.
18. *B. J. Zwolinski, H. Eyring*, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2702 (1947).
19. Б. В. Ерофеев, *ЖФХ*, **24**, 721 (1950).
20. *F. A. Matsen, J. L. Franklin*, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 3337 (1950).
21. *H. M. Rodigin, Э. Н. Родигина*, Последовательные химические реакции (математ. анализ и расчет), изд. АН СССР, М., 1960.
22. *C. Бенсон*, Основы химической кинетики, «Мир», М., 1964, стр. 40.
23. *I. G. Darvey, S. J. Prokhorovnik, J. F. Williams*, *J. Theoret. Biol.*, **13**, 90 (1966).
24. *I. G. Darvey*, Там же, **19**, 215 (1968).
25. *E. Magar*, Там же, **25**, 343 (1969).
26. *M. Eigen, L. De Mayer*, в книге *Technique of Organic Chemistry* (eds. S. L. Friess, E. S. Lewis, A. Weisberger), Part II, Intersc., N. Y., 1963.
27. *M. B. Волькенштейн*, Физика ферментов, «Наука», М., 1967.
28. *M. B. Волькенштейн, Б. Н. Гольдштейн, В. Е. Стефанов*, Мол. биол., **1**, 52 (1967).
29. *M. F. Morales, D. E. Goldman*, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6069 (1955).
30. *R. J. W. Roughton*, *Disc. Faraday Soc.*, **17**, 116 (1955).
31. *H. Gutfreund*, Там же, **20**, 167 (1955).
32. *K. J. Laidler*, *Canad. J. Chem.*, **33**, 1614 (1955).
33. *P. A. T. Swoboda*, *Biochim. biophys. acta*, **23**, 70 (1957).
34. *L. Quellet, K. J. Laidler*, *Canad. J. Chem.*, **34**, 146 (1956).
35. *V. Henry*, *C. r.*, **135**, 916 (1902).
36. *R. O. Viale*, *J. Theoret. Biol.*, **27**, 377 (1970).
37. *G. H. Czerlinski*, *J. Biol. Chem.*, **32**, 373 (1971).
38. *L. Quellet, J. A. Stewart*, *Canad. J. Chem.*, **37**, 737 (1959).
39. *H. Hartridge, F. J. W. Roughton*, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **104A**, 376 (1923).
40. *H. Hartridge, F. J. W. Roughton*, Там же, **104A**, 395 (1923).
41. *H. Hartridge, F. J. W. Roughton*, Там же, **107A**, 654 (1925).
42. *B. Chance*, *J. Franklin Inst.*, **229**, 455 (1940).
43. *B. Chance*, Там же, **229**, 613 (1940).
44. *B. Chance*, Там же, **229**, 737 (1940).
45. *B. Chance*, *Rev. Sci. Instr.*, **22**, 619 (1951).
46. *B. Chance*, Там же, **22**, 634 (1951).
47. *B. Chance, V. Legallais*, Там же, **22**, 627 (1951).
48. *Q. H. Gibson, L. Milnes*, *Biochem. J.*, **91**, 161 (1964).
49. *R. L. Berger, B. Balko, W. Borchardt, W. Frian*, *Res. Sci. Instr.*, **39**, 486 (1968).
50. *K. Hiromi, S. Ono, S. Iton, T. Nakamura*, *J. Biochem.*, **64**, 897 (1968).
51. *T. Nakamura*, Там же, **70**, 961 (1971).
52. *K. Kustin*, *Methods in Enzymology*, vol. XVI, Acad. Press, N. Y., 1969.
53. *A. С. Шаломеев, Т. И. Смолянинов, Э. М. Гоникберг, Е. К. Руссиян, В. М. Андреев*, Изв. АН СССР, сер. хим., **1970**, 1035.
54. *E. J. W. Roughton*, в книге *Technique of Organic Chemistry* (eds. S. L. Friess, A. Weisberger), vol. 8, N. Y., 1953, стр. 669.
55. *B. Chance, D. Devault, V. Legallais, L. Mela, T. Jonetani*, *Fast Reactions and Primary Processes in Chemical Kinetics* (ed. S. Claesson), Intersc. N. Y., 1967, стр. 437.
56. *S. A. Bernhard, M. F. Dunn, P. L. Luisi, P. Schack*, *Biochemistry*, **9**, 185 (1970).
57. *M. F. Dunn, S. A. Bernhard*, Там же, **10**, 4569 (1971).
58. *P. L. Luisi, R. Favilla*, Там же, **11**, 2303 (1972).
59. *H. Dutler*, *Proc. Plenary Sess. Int. Congr. Biochem. 8th*, 1973, стр. 85.
60. *J. D. Shore, H. Gutfreund*, *Biochemistry*, **9**, 4655 (1970).
61. *H. Suetsugu, K. Hiromi, S. Ono*, *J. Biochem.*, **69**, 421 (1971).
62. *S. Nakamura, Y. Ogura, K. Yano, N. Higashi, K. Arima*, *Biochemistry*, **9**, 3235 (1970).
63. *W. G. Gelb, E. Y. Oliver, J. F. Brandts, J. H. Nordin*, Там же, **9**, 3228 (1970).
64. *A. H. Colen, R. A. Prough, H. F. Fisher*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 7905 (1972).
65. *M. Iwatsubo, D. Pantaloni*, *Bull. soc. chem.-biol. (Paris)*, **49**, 1561 (1967).
66. *J. M. Brewer, R. J. De Sos*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 7941 (1972).
67. *T.-T. Wang, S. H. Bishop, A. Hinoe*, Там же, **247**, 4437 (1972).
68. *P. W. Taylor, R. W. King, A. S. W. Burgen*, *Biochemistry*, **9**, 2638 (1970).
69. *P. W. Taylor, R. W. King, A. S. W. Burgen*, Там же, **9**, 3894 (1970).
70. *R. W. Henkens, J. M. Sturtevant*, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 2669 (1968).
71. *D. S. Huld, S. A. Latt, B. L. Valle*, *Biochemistry*, **11**, 4994 (1972).
72. *B. Chance*, *Currents in Biochemical Research* (ed. D. E. Green), Intersc., N. Y., 1956, стр. 308.
73. *F. J. W. Roughton, B. Chance*, в книге *Technique of Organic Chemistry* (ed. S. L. Friess, A. Lewis, A. Weisberger), vol. 2, N. Y., 1963, стр. 22.

74. *H. Gutfreund, J. M. Sturtevant*, Biochem. J., **73**, 1 (1959).
75. *H. d'A Heck, C. H. McMurray, H. Gutfreund*, Там же, **108**, 793 (1968).
76. *H. Gutfreund*, Ann. Rev. Biochem., **40**, 315 (1971).
77. *J. J. Holbrook, H. Gutfreund*, FEBS-Letters, **31**, 157 (1973).
78. *G. Judith, D. J. T. Porter, H. J. Bright*, Naturforsch., **27**, 1054 (1972).
79. *C. D. Hoffard, J. F. Kirsch*, Biochemistry, **7**, 255 (1968).
80. *M. R. Hollaway, M. J. Hardman*, Eur. J. Biochem., **32**, 537 (1973).
81. *B. Chance*, Arch. Biochem., **22**, 224 (1949).
82. *B. Chance, Enzymes and Enzyme Systems* (ed J. T. Edsall), Harvard University Press, Cambridge, 1951, стр. 93.
83. *B. B. Hasinoff, H. B. Dunford*, Biochemistry, **9**, 4930 (1970).
84. *A. N. Schechter, R. F. Chen, C. B. Anfinsen*, Science, **167**, 886 (1970).
85. *F. J. Kézdy, M. L. Bender*, Biochemistry, **1**, 1097 (1962).
86. *H. Gutfreund*, Disc. Faraday Soc., **17**, 220 (1971).
87. *G. Johannin, J. Jon*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **25**, 320 (1966).
88. *M. R. Hollaway, E. Antonini, M. Bruhori*, FEBS-Letters, **4**, 299 (1969).
89. *B. R. Bellau, M. Delaage*, Eur. J. Biochem., **17**, 43 (1970).
90. *S. S. York*, Biochemistry, **11**, 2733 (1972).
91. *H. Gutfreund, J. M. Sturtevant*, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **42**, 719 (1956).
92. *H. Gutfreund, J. M. Sturtevant*, Biochem. J., **63**, 656 (1956).
93. *L. Faller, J. W. Sturtevant*, J. Biol. Chem., **241**, 4825 (1966).
94. И. В. Березин, Г. Я. Коломийцева, А. В. Левашов, К. Мартинек, Мол. биол., **1**, 67 (1967).
95. *H. Gutfreund, B. R. Hammond*, Biochem. J., **73**, 526 (1959).
96. *A. Himoe, K. G. Brandt, K. J. DeSos, G. P. Hess*, J. Biol. Chem., **244**, 3483 (1969).
97. *K. G. Brandt, A. Himoe, G. P. Hess*, Там же, **242**, 3973 (1967).
98. *G. P. Hess, J. McConn, E. Ku, G. McConkey*, Phil. Trans. Roy. Soc., **B257**, 89 (1970).
99. С. Бернхард, Структура и функции ферментов, «Мир», М., 1971.
100. *J. McConn, E. Ku, A. Himoe, K. G. Brandt, G. P. Hess*, J. Biol. Chem., **246**, 2918 (1971).
101. *M. J. Gilleland*, Fed. Proc., **30**, 1130 abs (1971).
102. *M. J. Gilleland, M. L. Bender*, Там же, **32**, 436 abs (1973).
103. *C. G. Miller, M. L. Bender*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 6850 (1968).
104. *J. H. Heideman, E. T. Kaiser*, Там же, **90**, 1860 (1968).
105. *A. R. Fersht, Y. Reguena*, J. Mol. Biol., **60**, 279 (1971).
106. *J. K. Yandell, D. P. Fay, N. Sutin*, J. Am. Chem. Soc., **95**, 1131 (1973).
107. *J. F. Chlebowski, J. E. Coleman*, J. Biol. Chem., **247**, 6007 (1972).
108. *J. A. Stewart, L. Quellet*, Canad. J. Chem., **37**, 151 (1959).
109. С. Д. Варфоломеев, Канд. диссерт., МГУ, М., 1971.
110. *I. V. Berezin, S. D. Varfolomeyev, K. Martinek*, FEBS Letters, **8**, 173 (1970).
111. *H. Staerk, B. Chance*, Там же, **3**, 287 (1969).
112. Е. Е. Фесенко, В. П. Кулаков, А. Л. Любарский, М. В. Волькенштейн, Биохимия, **205**, 485 (1972).
113. *J. W. Boag*, Photochem. Photobiol., **8**, 565 (1968).
114. *B. S. Hartley, B. A. Kilby*, Biochem. J., **50**, 672 (1952).
115. *B. S. Hartley, B. A. Kilby*, Там же, **56**, 288 (1954).
116. *M. L. Bender, M. L. Beque-Canton, R. L. Blakeley, L. J. Brubacher, J. Feder, C. R. Gunter, F. J. Kézdy, I. V. Killhoffer, мл. T. H. Marshall, C. G. Miller, R. W. Roseske, J. K. Stoops*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 5890 (1966).
117. *L. Cunningham*, Comprehensive Biochem., **16**, 85 (1965).
118. *M. L. Bender*, Ann. Rev. Biochem., **34**, 49 (1965).
119. *W. P. Cane, Ph. D. Thesis*, University of Minnesota, 1967.
120. *M. L. Bender, G. R. Schonbaum, B. Zerner*, J. Am. Chem. Soc., **84**, 2540 (1962).
121. И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, ДАН, **193**, 932 (1970).
122. *K. Martinek, S. D. Varfolomeyev, I. V. Berezin*, Eur. J. Biochem., **19**, 242 (1971).
123. *K. Martinek, С. Д. Варфоломеев, М. Н. Преображенская, Л. А. Савельева, И. В. Березин*, Биохимия, **37**, 614 (1972).
124. *G. P. Hess*, The Enzymes, vol. 3, 3d edition, Academic Press, N. Y., 1971.
125. *B. Chance*, см. ⁵⁴, стр. 627.
126. *B. Chance*, J. Biol. Chem., **151**, 533 (1943).
127. *R. F. Beers, I. W. Sizer*, J. Phys. Chem., **57**, 290 (1953).
128. *B. Chance, D. S. Greenstein, F. J. W. Roughton*, Arch. biochem. biophys., **37**, 311 (1952).
129. *B. Chance*, J. Biol. Chem., **182**, 643 (1950).
130. *B. Chance*, Arch. biochem. biophys., **41**, 416 (1952).
131. *K. J. Laidler*, Kinetics of Enzymes Action, Clarendon Press, Oxford, 1958.
132. *J. T. F. Wong*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 1788 (1965).
133. *L. Peller, R. Albery*, Там же, **81**, 5907 (1959).
134. *V. Bloomfield, L. Peller, R. A. Albery*, Там же, **84**, 4367 (1962).

135. *V. Bloomfield, L. Peller, R. A. Alberly*, Там же, 84, 4375 (1962).
136. *R. A. Alberly, V. Bloomfield, L. Peller, E. R. King*, Там же, 84, 4381 (1962).
137. *I. A. Christiansen*, *Acta chem. Scand.*, 3, 493 (1949).
138. *J. L. Hearon*, *Physiol. Rev.*, 32, 499 (1952).
139. *R. Lumry*, *Disc. Faraday Soc.*, 20, 257 (1955).
140. *I. A. Christiansen*, *Ztschr. Phys. Chem.*, 28B, 303 (1935).
141. *I. A. Christiansen*, Там же, 33B, 145 (1936).
142. *М. Диксон, Э. Уэбб*, Ферменты, «Мир», М., 1966.
143. *E. L. King, C. Altman*, *J. Phys. Chem.*, 60, 1375 (1956).
144. *M. V. Volkenstein, B. N. Goldstein*, *Biochim. biophys. acta*, 115, 471 (1968).
145. *M. V. Volkenstein, B. N. Goldstein*, Там же, 115, 478 (1968).
146. *B. Zerner, M. L. Bender*, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 3669 (1964).
147. *В. Н. Доровска*, Канд. диссерт., МГУ, М., 1972.
148. *V. N. Dorovska, S. I. Varfolomeyev, N. F. Kazanskaya, A. A. Klyosov, K. Martinek*, *FEBS Letters*, 23, 122 (1972).
149. *K. Martinek, В. Н. Доровска, С. Д. Варфоломеев*, *Биохимия*, 37, 662 (1972).
150. *K. Martinek, V. N. Dorovska, S. D. Varfolomeyev, I. V. Berezin*, *Biochem. biophys. acta*, 372, 80 (1972).
151. *В. Я. Яковлев*, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», М., 1965, стр. 50.
152. *E. Slater*, *Disc. Faraday Soc.*, 20, 231 (1955).
153. *A. Main*, *Biochem. J.*, 79, 246 (1961).
154. *И. В. Березин, Х. Вильль, К. Мартинек, А. К. Яцимирский*, *ДАН*, 179, 214 (1968).
155. *К. Мартинек, А. К. Яцимирский, И. В. Березин*, *Мол. биол.*, 5, 96 (1971).
156. *M. L. Bender, G. E. Clement, C. R. Gunter, F. J. Kezdy*, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 3697 (1964).
157. *S. Rajender, M. Han, R. Lumry*, Там же, 92, 1378 (1970).
158. *А. А. Клесов*, Канд. диссерт., МГУ, М., 1972.
159. *I. V. Berezin, N. F. Kazanskaya, A. A. Klyosov*, *FEBS Letters*, 15, 121 (1971).
160. *I. V. Berezin, N. F. Kazanskaya, A. A. Klyosov, K. Martinek*, Там же, 15, 125 (1971).
161. *H. Kaplan, K. J. Laidler*, *Canad. J. Chem.*, 46, 539 (1967).
162. *И. В. Березин, Х. Вильль, К. Мартинек, А. К. Яцимирский*, *ДАН*, 179, 214 (1968).
163. *И. В. Березин, Х. Вильль, К. Мартинек, А. К. Яцимирский*, *М. С. Хлудова, Мол. биол.*, 1, 843 (1967).
164. *И. В. Березин, Х. Вильль, К. Мартинек, А. К. Яцимирский*, Там же, 1, 719 (1967).
165. *К. Мартинек, Х. Вильль, З. А. Стрельцова, И. В. Березин*, Там же, 3, 554 (1969).
166. *S. A. Bizzozero, A. W. Kaiser, H. Dutler*, *Eur. J. Biochem.*, 38, 292 (1973).
167. *G. H. Czerlinski*, Chemical Relaxation (An Introduction to Theory and Application of Stepwise Perturbation), Marcel Dekker, N. Y., 1966.
168. *K. Kustin, D. Shear, D. Kleitman*, *J. Theoret. Biol.*, 9, 186 (1965).
169. *G. G. Hammes, R. A. Alberly*, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1564 (1960).
170. *M. Eigen*, *Disc. Faraday Soc.*, 17, 194 (1954).
171. *M. Eigen*, Там же, 24, 25 (1957).
172. *M. Eigen*, *Quart. Rev. Biophys.*, 1, 1 (1968).
173. *G. G. Hammes, L. E. Erickson*, *J. Chem. Ed.*, 35, 64 (1958).
174. *D. Thusius*, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 356 (1972).
175. *B. H. Havsteen*, Instrumentation in Biochemistry, Academic Press, vol. 4, 1967, стр. 53.
176. *G. H. Czerlinski*, *Biochim. biophys. acta*, 64, 199 (1967).
177. *P. Fasella, G. G. Hammes*, *Biochemistry*, 6, 1798 (1967).
178. *G. G. Hammes, J. L. Haslam*, Там же, 7, 1519 (1968).
179. *G. G. Hammes, J. L. Haslam*, Там же, 8, 1591 (1969).
180. *J. Eckflelett, G. G. Hammes, S. C. Mohr, C.-W. Wu*, Там же, 9, 3353 (1970).
181. *J. Grimaldi, J. Baldo, C. McMurray, B. D. Sykes*, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 7641 (1972).
182. *J. L. Haslam*, *J. Phys. Chem.*, 76, 366 (1972).
183. *G. G. Hammes, R. W. Porter, G. R. Stark*, *Biochemistry*, 10, 1046 (1971).
184. *G. G. Hammes, C.-W. Wu*, Там же, 10, 1051 (1971).
185. *G. G. Hammes, C.-W. Wu*, Там же, 10, 2150 (1971).
186. *K. Kirschner, M. Sigen, R. Bittman, B. Voigt*, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 56, 1661 (1966).
187. *K. Kirschner*, Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interaction (eds E. Hyamme, A. Pihl), University Press, Oslo, 1967.
188. *K. Kirschner*, *Current Topics in Microbiology*, 44, 123 (1968).
189. *K. Kirschner, I. Schuster*, Puridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases (eds H. Sund), University Press, Oslo, 1970, стр. 220.
190. *K. Kirschner*, *J. Mol. Biol.*, 58, 51 (1971).
191. *K. Kirschner, E. Gallego, I. Schuster, D. Goodall*, *J. Mol. Biol.*, 58, 29 (1971).
192. *G. G. Hammes, P. J. Lilbford, T. Simplicio*, *Biochemistry*, 10, 3686 (1971).
193. *D. B. Shear, K. Kustin*, *J. Biophys.*, 8, 139 (1968).
194. *G. G. Hammes, J. K. Hust*, *Biochemistry*, 8, 1083 (1969).

195. G. H. Czerlinski, G. Schreck, *J. Biol. Chem.*, **239**, 913 (1964).
196. H. d'A. Heck, Там же, **244**, 4375 (1969).
197. D. M. Chipman, P. R. Schimmel, Там же, **243**, 3771 (1968).
198. E. Haller, J. R. Rupley, G. P. Hess, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 42 (1969).
199. G. P. Hess, *Brookhaven Symposium in Biology*, **21**, 155 (1968).
200. G. H. Czerlinski, G. Schreck, *Biochemistry*, **3**, 89 (1963).
201. E. J. Del Rosario, G. G. Hammes, Там же, **10**, 716 (1971).
202. G. G. Hammes, T. K. Simplicio, *Biochem. biophys. acta*, **212**, 428 (1970).
203. R. E. Cathon, G. G. Hammes, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3240 (1964).
204. R. E. Cathon, G. G. Hammes, Там же, **87**, 4674 (1965).
205. T. C. French, G. G. Hammes, Там же, **87**, 4669 (1965).
206. J. E. Erman, G. G. Hammes, Там же, **88**, 5607 (1966).
207. J. E. Erman, G. G. Hammes, Там же, **88**, 5614 (1966).
208. G. G. Hammes, F. G. Watz, мл. Там же, **91**, 7179 (1969).
209. E. Del Rosario, G. G. Hammes, Там же, **92**, 1750 (1970).
210. F. M. Pohl, *FEBS Letters*, **3**, 60 (1969).
211. F. M. Pohl, *Eur. J. Biochem.*, **7**, 146 (1968).
212. T. Y. Tsong, R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.*, **69**, 149 (1972).
213. T. Y. Tsong, R. L. Baldwin, P. McPhil, E. Elson, Там же, **63**, 453 (1972).
214. J. Jahn, W. Twatsubo, *Eur. J. Biochem.*, **4**, 530 (1960).
215. C.-F. Cheng, J. L. Haslam, *Biochemistry*, **11**, 3512 (1972).
216. F. Guillain, D. Thusius, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3534 (1970).
217. E. J. Faeder, G. G. Hammes, *Biochemistry*, **9**, 4023 (1970).
218. E. J. Faeder, G. G. Hammes, Там же, **10**, 1041 (1971).
219. M. Pauchol, T. K. Saksena, *J. Accust. Soc. Am.*, **44**, 639 (1968).
220. B. G. Barman, G. Tollin, *Biochemistry*, **11**, 4746 (1972).
221. B. G. Barman, G. Tollin, Там же, **11**, 4755 (1972).
222. B. G. Barman, G. Tollin, Там же, **11**, 4760 (1972).
223. B. H. Havsteen, *J. Biol. Chem.*, **242**, 769 (1967).
224. L. D. Faller, R. E. La Fond, *Biochemistry*, **10**, 1033 (1971).
225. G. H. Czerlinski, C. Odell, *Canad. J. Biochem.*, **50**, 257 (1972).
226. D. N. Hague, J. S. Henshaw, V. A. John, M. J. Pooley, P. V. Chock, *Nature*, **229**, 190 (1971).
227. R. Rigler, A. Jost, L. DeMayer, *Exp. Cell Res.*, **62**, 197 (1970).
228. J. V. Beitz, G. W. Flynn, D. H. Turner, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4130 (1970).
229. С. Д. Варфоломеев, К. Мартичек, И. В. Березин, Сб. Межфакультетской лаборатории биоорганической химии, изд. МГУ, М., 1971.
230. Q. H. Gibson, *Biochem. J.*, **76**, 46P (1960).
231. Q. H. Gibson, L. Greenwood, Там же, **86**, 541 (1963).
232. G. G. Hammes, *Adv. Protein Chem.*, **23**, 1 (1968).
233. P. Fasella, *Am. Rev. Biochem.*, **36**, 185 (1967).
234. G. G. Hammes, Application and Significance of Modern Methods for the Investigation of Fast Reaction Kinetics, 8th Intern. Congress in Chemistry of Natural Products, Riga, 1970.
235. G. Kartha, J. Bello, D. Harken, *Nature*, **213**, 82 (1967).
236. H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allwell, T. Inagami, L. N. Johnson, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.*, **242**, 3984 (1967).

МГУ, каф. химической кинетики,
Межфакультетская лаборатория
биоорганической химии, Москва