

УДК 577.152 : 547.466

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ РАЦЕМАТОВ В ЭНАНТИОМЕРЫ АМИНОКИСЛОТ

Швядас В. К., Галаев И. Ю.

Рассмотрено современное состояние и перспективы использования ферментов для разделения рацематов аминокислот или превращения рацематов ряда химических соединений в оптически чистые аминокислоты. Приведен сравнительный обзор работ по использованию аминоацилаз, протеаз, гидантоиназ, α -аминокапролактамгидролазы и ряда других ферментов для получения *L*- и *D*-аминокислот. Приведены примеры процессов ферментативного разделения рацематов, реализованных в промышленном масштабе. Проведен подробный анализ кинетических и термодинамических особенностей используемых ферментативных реакций, обоснованы пределы использования того или другого фермента при превращении рацематов в оптически чистые аминокислоты. Библиография — 288 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	2039
II. Ферментативное превращение циклических производных аминокислот	2040
III. Энантиоселективное окисление и декарбоксилирование	2044
IV. Ферментативный синтез амидной связи	2045
V. Энантиоселективный гидролиз эфиров и амидов аминокислот	2047
VI. Использование ациламидогидролаз для разделения рацематов	2052

I. ВВЕДЕНИЕ

В последние годы получение оптически чистых аминокислот становится все более и более актуальной задачей современной биотехнологии. Решение задачи чисто химическими средствами наталкивается на ряд трудностей. Химический синтез оптически активных аминокислот реализован пока лишь при производстве *L*-3,4-диоксифенилаланина (*L*-ДОФА) путем энантиоселективного гидрирования α,β -ненасыщенного производного в присутствии комплексов родия с хиральными фосфинами [1]. Производство *L*-ДОФА представляет собой тот редкий пример, когда при получении дорогостоящего конечного продукта возможно пренебречь стоимостью весьма дорогого катализатора. В случае энантиомеров остальных аминокислот промышленный химический синтез в настоящее время является не более чем теоретической возможностью.

Производство *L*- и *D*-аминокислот путем физико-химического разделения рацемических смесей аминокислот, полученных крупнотоннажным химическим синтезом (по химическому синтезу аминокислот см. обзор [2]) также не лишено недостатков. Так, получение энантиомера селективной кристаллизацией пресыщенного раствора рацемата реализовано только для глутаминовой кислоты [3]. Высокоэффективная энантиоселективная хроматография, активно разрабатываемая в последнее время, нашла практическое применение пока лишь для получения оптически чистых меченых радиоактивными изотопами соединений [4]. Известные методы селективной кристаллизации диастереомеров аминокислот и каких-либо оптически активных соединений требуют поиска и получения последних, что ограничивает практическое использование этого метода.

С развитием методов генной инженерии новые возможности получения аминокислот связывают с созданием высокоэффективных промышленных производителей, в первую очередь для производства *L*-лизина, *L*-гистидина, *L*-аргинина, *L*-трониона, *L*-изолейцина и *L*-валина [5]. Сложности использования подобной технологии связаны, в первую очередь, с выделением целевого соединения из культуральной жидкости, содержащей другие продукты метаболизма, в том числе и многие физио-

логически активные соединения, а также с созданием и поддержанием свойств продукента.

Одним из перспективных путей получения оптически чистых аминокислот является использование отдельных ферментов. Существуют две принципиальные возможности ферментативного получения энантиомеров аминокислот. Первая из них включает катализируемые рядом ферментов (аспартатаммиаклиаза, *L*-тироzin-фенол-лиаза, *L*-триптофан-индол-лиаза, фенилаланин-аммиак-лиаза и др.) реакции синтеза *L*-аминокислот из оптически неактивных предшественников, например, *L*-триптофана и *L*-тироцина из аммиака, пирувата, индола или фенола [6]. В настоящем обзоре мы не будем обсуждать возможности использования этого подхода для получения аминокислот, так как он детально рассмотрен в работах [7, 8].

Вторая возможность использования отдельных ферментов заключается в ферментативном превращении простейших рацемических производных аминокислот в оптически чистые *L*- и *D*-аминокислоты. В результате подобной энантиоселективной ферментативной реакции образуется смесь одного непрореагировавшего антипода и химически модифицированного другого антипода. Возникшее различие в химических свойствах позволяет легко их разделить. Наличие в молекуле аминокислоты двух достаточно реакционноспособных групп (карбоксильная и аминогруппа), связанных с асимметричным атомом углерода позволяет осуществлять широкий набор подобных энантиоселективных модификаций молекулы аминокислоты под действием различного рода ферментов.

Первые попытки использования живых организмов для разделения рацематов аминокислот основывались на способности животных усваивать лишь один антипод. При скармливании или введении животному рацемической аминокислоты из его мочи удавалось выделить не усвоившийся *D*-энантиомер аминокислоты [9, 10]. Несмотря на очевидные недостатки: безвозвратную потерю половины исходного вещества, трудности выделения из смеси, содержащей целый ряд всевозможных органических соединений, получение в результате физиологически обычно менее активного, а следовательно, и менее ценного *D*-энантиомера аминокислоты,— этот метод не потерял до сих пор своего значения. Так, в 1976 г. в Японии был выдан патент на получение *D*-аминокислот и их эфиров после действия на рацемическую аминокислоту клеток микробов: *Mycoplasma*, *Proteaminobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Xanthomonas* и *Bacillus* [11]. В результате этой процедуры *L*-изомер ассимилировался бактериями, а *D*-изомер выделялся из культуральной среды после отделения клеток центрифугированием.

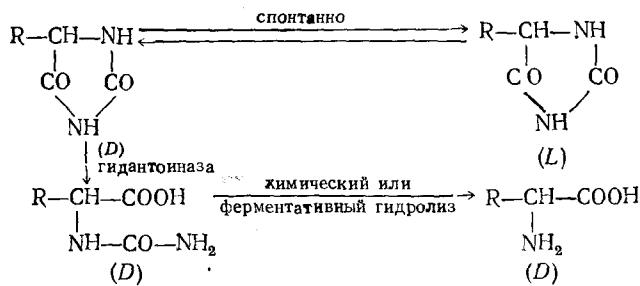
Гораздо больший успех достигнут при использовании отдельных ферментных препаратов различной степени очистки. В этом случае про текает только одна химическая реакция и удается выделить оба энантиомера аминокислоты. В настоящее время все ферментативные методы разделения рацематов аминокислот можно разделить на следующие группы, указанные в порядке возрастания их практической ценности и степени использования: 1) специфические методы разделения рацематов, пригодные лишь для отдельных аминокислот (лизин, цистеин, ароматические аминокислоты); 2) стереоселективное окисление и декарбоксилирование аминокислот; 3) энантиоселективный синтез амидной связи; 4) стереоселективный гидролиз амидов и сложных эфиров аминокислот; 5) энантиоселективный гидролиз *N*-ацилированных аминокислот.

II. ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

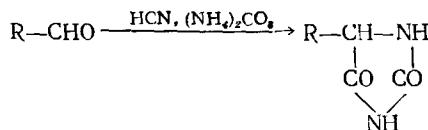
1. 5-Замещенные гидантоины

При использовании ферментов для разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы возникает проблема использования не вступившего в реакцию энантиомера. Обычно она решается с помощью хи-

мической рацемизации этого энантиомера и возвращения полученного рацемата вновь в процесс разделения. Однако в случае гидантоиновых производных аминокислот рацемизация протекает спонтанно с достаточно высокими скоростями даже в условиях ферментативного энантiosелективного гидролиза. Так, время полурацемизации 5-фенилгидантоина при pH 8,5 и 30° в 0,25-ном растворе составляет 19 минут [12]. Это позволило предложить следующую схему ферментативного разделения рацематов аминокислот, используя гидантоиназу (дигидропирамидиназу КФ 3.5.2.2) стереоселективно гидролизующую 5-замещенные D-гидантоины:

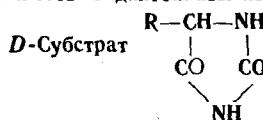


Хотя образование N-карбамоиламинокислот из гидантоинов в организме обнаружено в 1926 г. [13], а возможность ферментативного разделения рацематов показана еще в 1930 г. [14], только в последнее время получение оптически активных аминокислот таким путем приобрело практическое значение. 5-замещенные D, L-гидантоины могут быть синтезированы в одну стадию из соответствующих альдегидов по реакции Бухерера [15]:



Дигидропирамидиназа из печени теленка раскрывает кольцо дигидропирамидинов с образованием N-карбамоил-β-аминокислот [16] и идентична ферменту, осуществляющему превращение гидантоина в N-карбамоилглицин [17]. Интересно отметить, что раскрытие дигидропирамидинового или гидантоинового кольца — процесс обратимый, и в кислых условиях может быть осуществлена обратная реакция [16, 18]. Гидантоиназа из печени быка катализирует энантiosелективный гидролиз D-гидантоиновых производных α-аминофенилуксусной и n-хлор-α-аминофенилуксусной кислоты, лейцина, аланина, метионина, валина. D-производные глутаминовой, аспарагиновой кислот и триптофана устойчивы к действию фермента [12, 19]. Гидантоиназа найдена и в целом ряде микроорганизмов: *Klebsiella*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* [20]. Наиболее пригодным для практического использования оказался штамм *Pseudomonas striata* IFO 12996. Гидантоиназа индуцируется D, L-5-метилгидантоином (гидантоиновым производным аланина). Другие гидантоины инертны или даже подавляют биосинтез фермента [21]. Гидантоиназа из *Ps. striata* очищена до гомогенного состояния и получена в кристаллическом виде. Молекулярная масса фермента 190 000, он состоит из четырех идентичных субъединиц [22]. В табл. 1 и 2 представлена субстратная специфичность гидантоиназы из *Ps. striata*. 5,5-Дизамещенные гидантоины не расщепляются ферментом. Несколько отличаются от фермента из *Ps. striata* по своей субстратной специфичности гидантоиназа из *Corynebacterium sepedonicum* и *Aerobacter cloacae* [23]. Так, для первого из них лучшим субстратом является D, L-5-м-хлорфенилгидантоин, а для второго — D, L-5-n-хлорфенилгидантоин. Из микроорганизмов *Bacillus* sp. 121-3 удалось выделить гидантоиназу, эффективно гидролизующую гидантоиновые производные различных замещенных 5-фенилгидантоинов и особенно

ТАБЛИЦА 1

Субстратная специфичность гидантоиназы из *P.s. striata* [20];

R	Относительная скорость гидролиза *	R	Относительная скорость гидролиза *
H	13	<i>n</i> -HO-C ₆ H ₄	16
CH ₃	45	<i>m</i> -HO-C ₆ H ₄	5
(CH ₃) ₂ CH	15	<i>n</i> -Cl-C ₆ H ₄	19
CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂	48	<i>m</i> -Cl-C ₆ H ₄	10
(CH ₃) ₂ CH-CH ₂	48	<i>n</i> -CH ₃ O-C ₆ H ₄	7
C ₆ H ₅	25		

* Скорость расщепления дигидроурацила — $\begin{array}{c} \text{CO}-\text{NH} \\ | \quad | \\ \text{NH} \quad \text{CH}_2 \\ | \quad | \\ \text{CO}-\text{CH}_2 \end{array}$ принята за 100.

ТАБЛИЦА 2

Кинетические свойства гидантоиназы из *P.s. striata* [21]

Субстрат	K_M^* (мМ)	pH-Оптимум действия
Дигидроурацил	1,7	8,8—9,0
<i>D</i> , <i>L</i> -5-(2-Метилтио-этил)-гидантоин	28	8,3—8,5
<i>D</i> , <i>L</i> -5-Фенилгидантоин	50	8,0—8,3
Гидантоин	280	8,0—8,3

* K_M — константа Михаэлиса.

ТАБЛИЦА 3

Константы равновесия реакции гидролиза N-ацетильных производных аминокислот (25°; pH 7,5) [126]

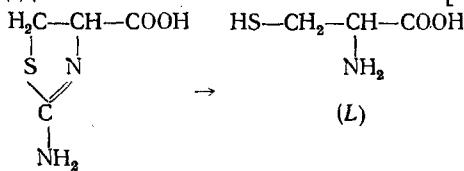
Аминокислота	$K_{\text{равн}} (M)$	
	гидролиз *	синтез *
Глицин	4,0±1,5	5±1
Аланин	5,4±0,5	5,9±0,7
Аминомасляная кислота	5,1±0,6	6±1
Норвалин	11±1	10±1
Норлейцин	13±2	12±2

* Путь достижения равновесия.

5-тиенилгидантоина [24, 25]. Штаммы почвенных микроорганизмов T-524 и T-639 и особенно T-523 эффективно превращают 4-5-индолилметилгидантоин в триптофан, обладая не только гидантоиназной, но и N-карбамоилгидролазной активностью. Оптическая чистота *L*-триптофана, получаемого таким путем из рацемического гидантоина, достигает 99,1% [26]. *L*-Глутаминовая кислота может быть получена из *D,L*-5-β-карбоксиэтилгидантоина с помощью микроорганизма *Bacillus brevis* ATCC 8185. При культивировании в слабощелочной среде, содержащей 1,0% *D,L*-5-β-карбоксиэтилгидантоина, удается превратить 90% рацемата в *L*-глутаминовую кислоту. Ферментная система, ответственная за эту реакцию, индуцируется добавлением в среду исходного субстрата [27]. На основе гидантоиназы из печени теленка, включенной в триацетатные волокна был создан реактор, способный перерабатывать до 3 кг гидантоина в день. Время полужизни катализатора при pH 8,5 и 30° составляло 20 дней [12].

2. 2-Амино-Δ²-тиазолин-4-карбоновая кислота

L-Цистein может быть получен из *D,L*-2-амино-Δ²-тиазолин-4-карбоновой кислоты под действием клеток *Pseudomonas* [28]:

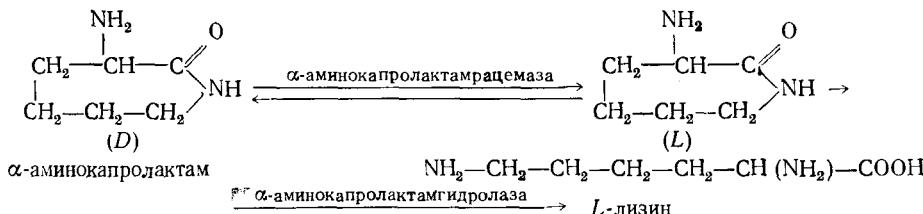


(*D,L*)

Выход реакции близок к 100%, поскольку в реакционной смеси одновременно с гидролизом тиазолинового кольца *L*-изомера происходит рацемизация *D*-энантиомера субстрата. Наибольшей активностью из 463 проверенных штаммов 37 видов обладал штамм *Pseudomonas thiazolinophyllum* AI3854. Фермент (или ферментная система), ответственный за превращение, является индуцируемым внутриклеточным ферментом, тесно связанным с ростом клеток. Дальнейшую деградацию цистеина (или цистина) можно предотвратить, вводя в среду гидроксиламин или семикарбазид и ингибируя тем самым пиридоксаль-5'-фосфатзависимую цистеиндесульфигидразу. Добавление ионов Mn^{2+} (5 мМ) и Fe^{2+} (25 мМ) в 5—7 раз увеличивает общую активность ферментативной системы, кроме того присутствие 1—10 мМ ионов Mn^{2+} оказывает стабилизирующее действие на активность. При использовании интактных клеток *Pseudomonas thiazolinophyllum* AI 3854 наблюдали сигмоидную зависимость накопления *L*-цистеина от времени, однако обработка клеток ультразвуком устранила этот эффект и приводила к линейной зависимости [29].

3. α -Аминокапролактам

Очень перспективный способ получения *L*-лизина из *D,L*- α -аминокапролактама (*D,L*-АКЛ), предложенный японской фирмой «Торрей индастриз» [30, 31], основан на использовании биферментной системы *L*-аминокапролактамгидролаза — α -аминокапролактамрациемаза:



Капролактамаза выделена из различных микроорганизмов: *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus* [32], *Cryptococcus laurentii*, *Candida humicola*, *Trichosporon cutaneum*, *Achromobacter cycloclastes*, *Achromobacter obae*, *Flavobacterium arborescens*, *Alcaligenes faecalis* [33, 34]. Наиболее перспективными оказались штаммы *Cryptococcus laurentii*, *Candida humicola* и *Trichosporon cutaneum*, свойства которых и были детально изучены [35]. Капролактамаза очищена до гомогенного состояния. Фермент состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 67 000 и константой седиментации 4,4 S, изоэлектрическая точка pI 5,7 [36, 37]. Капролактамаза — металлофермент, ее активность полностью подавляется в присутствии 7 мМ о-фенантролина и вновь может быть восстановлена в присутствии ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} или Zn^{2+} (но не Co^{2+} и Ni^{2+}), вплоть до 30—70% исходной активности [31, 37]. При pH 8,5 и 37° катализическая константа ферментативного гидролиза *L*- α -аминокапролактама составляет 750 s^{-1} [31]. Фермент гидролизует *L*- α -амино- δ -валеролактам в три раза менее эффективно, а *D*- α -амино- ϵ -капролактам в 20 раз менее эффективно, чем *L*- α -аминокапролактам, и не обладает активностью по отношению к γ -бутиrolактаму, δ -валеролактаму, ϵ -капролактаму, циклическим олигомерам ϵ -капролактама, α,α -дихлор- ϵ -капролактаму и *D,L*-пирролидонкарбоновой кислоте [38]. Недавно обнаружена активность капролактамазы по отношению к *L*-лизинамиду, который гидролизуется ферментом в два раза хуже, чем *L*- α -аминокапролактам [36, 37]. Величина константы Михаэлиса для гидролиза *L*- α -аминокапролактама составляет 2,6 мМ, для гидролиза *L*-лизинамида — 14 мМ [37]. При высоких концентрациях субстрата наблюдается ингибирование фермента как субстратом, так и образующимся *L*-лизином. Скорость реакции может быть описана уравнением [39]

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_{\text{кат}} [E] [S]}{\left(K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_s} \right) \left(1 + \frac{[P]}{K_i} \right)}$$

где E, S и P — соответственно капролактамаза, L- α -аминокапролактам и L-лизин, $K_m = 0,023 \text{ M}$, константа ингибирования субстратом $K_s = 1,54 \text{ M}$, константа ингибирования продуктом $K_i = 3,23 \text{ M}$.

Путем селекции микроорганизмов, способных расти на средах, содержащих в качестве единственного источника азота и основного источника углерода только L- или D- α -аминокапролактам, были отобраны продукты α -амино- ϵ -капролактамрацемазы: *Achromobacter obae*, *Achromobacter cycloclastes*, *Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium arborescens*. Наибольшей активностью обладал штамм *Achromobacter obae* [30]. Рацемаза выделена и частично очищена. Молекулярная масса фермента 54 000, рН-оптимум действия 7,5—9,0. Активность рацемазы полностью ингибируется гидроксиламином (10^{-4} M) и вновь восстанавливается при добавлении пиридоксаль-5'-фосфата. В больших концентрациях ($>10^{-4} \text{ M}$) пиридоксаль-5'-фосфат является ингибитором рацемизации [40]. Для реакции рацемизации, катализируемой лиофилизованными клетками, характерно ингибирование субстратом. Кроме того, сильным бесконкурентным ингибитором этой реакции является L-лизин, неизбежно присутствующий при проведении реакции гидролиза L- α -аминокапролактама и рацемизации D- α -аминокапролактама в одном реакторе. В реальном процессе необходимо учитывать и инактивацию рацемазы в ходе реакции [39].

Оптимальное значение рН проведения процесса зависит от соотношения каталитических количеств рацемазы и капролактамазы и сдвигается к рН-оптимуму фермента, лимитирующего скорость всего процесса. Для периодического реактора, в котором соотношение ферментов можно изменять в течение процесса, основной характеристикой является соотношение:

$$f = \frac{[\text{рацемаза}]}{[\text{рацемаза}] + [\text{капролактамаза}]} (0 \leq f \leq 1)$$

Если концентрация выражена в мольных долях, а k_1 и k_2 — константы скорости реакций рацемизации и гидролиза, то состав реакционной смеси во времени описывается следующей системой уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d[D\text{-АКЛ}]}{dt} &= fk_1([L\text{-АКЛ}] - [D\text{-АКЛ}]) \\ \frac{d[L\text{-АКЛ}]}{dt} &= fk_1([D\text{-АКЛ}] - [L\text{-АКЛ}]) - (1-f)k_2[L\text{-АКЛ}] \\ [L\text{-АКЛ}]_0 &= [D\text{-АКЛ}]_0 = 0,5 \end{aligned}$$

Вначале оптимальным является протекание процесса при $f=0$, т. е. когда рацемаза отсутствует. В дальнейшем оптимальным является такое протекание реакции, когда $[D\text{-АКЛ}]/[L\text{-АКЛ}] = 1+\alpha$, где $\alpha = (k_2/k_1)^{1/2}$. В этих условиях оптимальное соотношение ферментов определяется выражением:

$$f = \frac{\alpha(1+\alpha)}{1+(1+\alpha)^2}$$

Оптимальный состав биокатализатора зависит только от соотношения α . Если оно остается постоянным в ходе реакции, то процесс может быть проведен оптимальным путем [39].

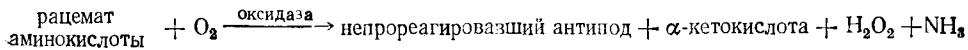
III. ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ

Строго говоря, энантиоселективное окисление и декарбоксилирование аминокислот — это не разделение рацематов аминокислот, поскольку в результате подобных реакций теряется половина исходного вещества. В этом и заключена причина того, что эти методы не нашли широкого применения для получения энантиомеров аминокислот из их рацематов.

Еще в начале столетия удалось получить с выходами 60—70% D-изомеры аланина, лейцина, валина [41], норвалина, серина, фенилаланина [42], алло-изолейцина, глутаминовой кислоты и гистидина [43].

обрабатывая рацематы аминокислот дрожжами, действие которых было обусловлено присутствующими в них декарбоксилазами. Позднее этот метод был использован для получения *D*-изомеров (метионина с помощью *Proteus vulgaris* [44], глутаминовой кислоты [45] и лизина [46] при действии соответственно, *E. coli* и *Bacillus cereus*). С другой стороны, исключительно специфичная к *D*-энантиомерам декарбоксилаза моноаминодикарбоновых кислот, выделенная из *Aspergillus ustus*, позволяет получать их *L*-энантиомеры [47].

Несколько более широкое применение нашло стереоселективное окисление аминокислот с использованием оксидазы *D*-аминокислот из почек млекопитающих и оксидазы *L*-аминокислот из змеиного яда:



Действием на рацематы оксидазы *D*-аминокислот удалось получить *L*-энантиомеры аланина, метионина [48] и пролина [49].

Возможности получения *D*-энантиомеров аминокислот действием оксидазы *L*-аминокислот из змеиного яда на рацематы ограничены специфичностью фермента. Так *L*-треонин, *L*-пролин, *L*-аланин, *L*-лизин, *L*-орнитин устойчивы к действию оксидазы из *Crotalus adamantis* [50, 51]. Однако *L*-аланин легко окисляется ферментом из яда *V. libetina* [52], а *L*-лизин — ферментом из яда *Bothrops ctrox* [53]. Ацилирование ω -аминогрупп *L*-лизина, *L*-орнитина и *L*-цитруллина делает их также подверженными окислению ферментом из яда *Crotalus adamantis* [50, 51]. Продукты реакции не ингибируют оксидазу *L*-аминокислот, однако α -кетокислоты, получающиеся при окислении ароматических аминокислот, ингибируют оксидазу *D*-аминокислот. Добавка цианида в реакционную смесь ингибирует каталазу, обычно содержащуюся в виде примесей в препаратах оксидазы *D*-аминокислот. В этих условиях образующаяся в ходе реакции перекись водорода уже не разрушается каталазой, а расходуется на окисление α -кетокислоты до ближайших низких гомологов жирных кислот, которые являются значительно более слабыми ингибиторами оксидазы *D*-аминокислот [53].

Легкость контроля за протеканием реакции по выделению амиака или перекиси, а также исключительно низкое сродство оксидаз к нерасщепляемому изомеру позволяет использовать стереоселективное окисление как метод анализа оптической чистоты стереоизомеров аминокислот. Таким путем можно определять 0,1—0,01% примеси другого изомера [54, 55].

Разделение рацематов путем стереоселективного окисления, так же как и стереоселективным декарбоксилированием, не нашло широкого применения, во-первых, из-за потери половины исходного вещества при реакции и, во-вторых, из-за дороговизны змеиного яда — источника оксидазы *L*-аминокислот.

IV. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ АМИДНОЙ СВЯЗИ

Интересным методом разделения рацематов аминокислот является энантиоселективный синтез амидной связи, катализируемый различными протеолитическими ферментами. Хорошо известно, что гидролиз амидной связи, образованной N-ацилированными производными аминокислот, идет до равновесного уровня, и при определенных условиях может быть осуществлена обратная реакция синтеза [56—58]. Если в качестве донора аминогруппы для синтеза амидной связи применяется анилин или фенилгидразин, то, как правило, образующиеся анилиды или фенилгидразиды N-ацилированных аминокислот плохо растворимы в воде и выкристаллизовываются из реакционной смеси. Это сдвигает равновесие реакции в сторону синтеза и позволяет почти количественно провести стереоселективный синтез. Впервые на энантиоселективность подобного синтеза, катализируемого папаином, обратили внимание при исследовании синтеза анилида ацетил-*D-L*-фенилаланилглицина [58].

Подобная методика была применена для разделения рацемата карбобензокси-*D,L*-глутаминовой кислоты [59], диастереомера, ацетил-*D,L*-фенилаланил-*L*-лейцина [60]. Позднее эта методика была улучшена [61] и, таким образом, удалось разделить рацематы аланина, лейцина, изолейцина, норлейцина, валина, лизина, серина, треонина, фенилаланина.

Для того, чтобы реакция синтеза анилида проходила практически до конца, N-ациламинокислота должна быть хорошо растворима, а соответствующий анилид плохо растворим. Выбор подходящей N-ацильной группы по соображениям растворимости может в свою очередь вызвать трудности, связанные со стереоспецифичностью используемого фермента [60]. Подробнее этот вопрос изучен на примере катализируемого папаином стереоселективного синтеза фенилгидразидов N-ацилированных аминокислот [62–64]. Замена анилина на фенилгидразин обусловлена тем, что фенилгидразидную группу легко удалить мягким окислением. Было обнаружено, что синтезированный продукт имел практически полностью *L*-конфигурацию, если ацильной группой служили ацетил или бензоил. Если ацильная группа представляла собой карбометокси-, карбэтокси- или карбобензоксиостатки, то образовывалось значительное количество *D*-гидразида, почти сравнимое по величине с количеством образовавшегося *L*-гидразида. Это явление наблюдали независимо от природы аминокислотного остатка, хотя на скорость образования продукта влияет природа как N-ацильной группы, так и боковой цепи самой аминокислоты [65–67]. К сожалению, количественные выводы в этой системе затруднены из-за непрерывной инактивации папаина под действием фенилгидразина [63].

Несмотря на ряд очевидных достоинств: простота проведения реакции энантиоселективного синтеза анилида или фенилгидразида, исключительное удобство при отделении непрореагировавшего *D*-изомера — этот метод не получил широкого применения для разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы и лишь в отдельных работах указывается на его возможное препаративное использование [68]. Это связано, во-первых, со сложностью выбора подходящего ацильного производного аминокислоты, удовлетворяющего всем необходимым требованиям, во-вторых, с необходимостью тщательного выбора и постоянного контроля условий проведения процесса разделения и, в-третьих, с тем, что в качестве исходных веществ и продуктов реакции используются не сами аминокислоты, а довольно сложные их производные. Это приводит к необходимости дополнительных стадий получения, а затем и гидролиза этих соединений. Поскольку анилиды ацилированных аминокислот являются довольно устойчивыми соединениями, то для получения свободной аминокислоты приходится применять многочасовое кипячение в 6 M HCl [59]. Поэтому, если *L*-соединение вначале и не содержит примесей другого изомера, то подобная обработка может приводить к частичной рацемизации [66, 69], а в случае некоторых аминокислот, например метионина [70] и триптофана [71], и к химической деструкции.

Несмотря на то, что катализируемый различными протеолитическими ферментами стереоселективный синтез почти не применяется для разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы, реакции подобного типа интенсивно изучаются. Они уже нашли применение для стереоселективного синтеза различных N-ацилированных олигопептидов. Кроме папаина катализаторами синтеза амидной связи могут служить α -химотрипсин [72], нагараза, пепсин, термолизин [73]. Использование протеолитических ферментов различной специфичности позволяет включать в синтезируемые олигопептиды разнообразные аминокислоты. Детально изучена кинетика как непосредственного синтеза амидной связи, например, катализируемый папаином синтез гиппуриланилида из анилина и гиппуровой кислоты [74] и образование дипептида из N-бензоил-*L*-тирозина и анилида глицина, катализируемое α -химотрипсином [75], так и «синтез с переносом», когда в качестве донора карбоксильной

группы для образования амидной связи выступает не свободная N-ацилированная аминокислота, а ее более реакционноспособное производное, обычно сложный эфир. Катализаторами подобных реакций служат такие протеолитические ферменты, как трипсин [76] и α -химотрипсин [77]. Так как гидролиз амидных и эфирных субстратов для этих ферментов протекает через образование ацил-фермента, то по принципу микрообратимости и синтез¹ должен идти через те же промежуточные состояния. Использование в качестве донора карбоксильной группы эфиров аминокислот облегчает стадию ацилирования по сравнению с ацилированием свободной аминокислотой, что ускоряет весь процесс, поскольку стадия деацилирования не является лимитирующей [78] и делает возможным использование в качестве донора карбоксильной группы эфиров аминокислот со свободной аминогруппой [79]. Кроме того, при определенном соотношении кинетических параметров реакций гидролиза и синтеза при «синтезе с переносом» возможно достижение выходов, превышающих термодинамические [80, 81].

Исследование констант равновесия реакций гидролиза — синтеза амидной или пептидной связи [82—85] позволило сделать вывод, что в расчете на неионизированные формы исходных веществ и продуктов реакции свободная энергия синтеза, как правило, величина отрицательная, т. е. равновесие сдвинуто в сторону синтеза. Однако при проведении реакций в водных растворах подавляющая часть одного или обоих исходных веществ находится в ионизированной форме (так как рК_а карбоксильных групп подобных соединений находится в пределах 2—3,5, а рK_а аминогрупп — в пределах 6—9,5), синтез амидной и пептидной связи уже не является таким термодинамически выгодным процессом [56, 57].

В последнее время активно разрабатываются различные методы, позволяющие сдвигать равновесие реакции в сторону целевого продукта [86—88]. Подобные методы основаны на изменении констант ионизации реагентов и уменьшении концентрации воды в системе, использовании двухфазных систем «вода — несмешивающийся с водой органический растворитель» или создании условий кинетически контролируемого равновесия в результате иммобилизации фермента на заряженном носителе. Правда, при этом заметно падает скорость синтеза и в систему вводятся дополнительные компоненты, затрудняющие выделение целевого продукта.

Подводя итог, можно сказать, что хотя метод стереоселективного синтеза амидов, гидразидов или пептидов под действием протеолитических ферментов не нашел применения как метод разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы, изучение таких реакций позволило понять ряд закономерностей термодинамики такого важного процесса, как синтез пептидной связи и дало в руки химиков — синтетиков удобный метод, позволяющий стереоселективно, в мягких условиях и с хорошим выходом осуществлять синтез различных олигопептидов [89—91].

V. ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЭФИРОВ И АМИДОВ АМИНОКИСЛОТ

Стереоселективный гидролиз эфиров аминокислот для разделения рацематов на оптические антиподы впервые был применен в 1906 г. [92], т. е. по времени он может соперничать с классическими методами диастереомерной кристаллизации. Общим недостатком описанных методов являлась их длительность и трудоемкость, так как использование малоочищенных препаратов фермента требовало большого времени проведения реакции гидролиза и приводило к загрязнению продуктами побочных реакций.

Несмотря на эти трудности стереоселективным гидролизом эфиров под действием ферментов поджелудочной железы были разделены рацематы триптофана [93—97], фенилаланина [98—100], норлейцина [100], метионина [94], валина [98, 99] и ряд замещенных в бензольном кольце фенилаланинов [98, 99, 101, 102].

Рассмотренные выше работы носили сугубо эмпирический характер. Выделение протеолитических ферментов поджелудочной железы в чистом виде, открытие и выделение большого числа протеаз из различных микроорганизмов и появление удобного метода слежения за кинетикой реакций подобного рода (рН-статирование) вновь привлекло интерес к стереоселективному гидролизу эфиров как к методу разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы.

1. Особенности действия α -химотрипсина на эфиры аминокислот

Несмотря на то, что α -химотрипсин является одним из наиболее изученных ферментов [103], механизм гидролиза сложных эфиров аминокислот еще не выяснен до конца. Как и для эфиров N-ацилированных аминокислот в случае эфиров со свободной аминогруппой во всех работах предполагается образование промежуточного ацил-фермента, однако вопрос о том, какая стадия, ацилирование или деацилирование, является лимитирующей, остается до сих пор открытым [104—109].

В настоящее время можно считать убедительным предположение, что при гидролизе сложных эфиров аминокислот под действием α -химотрипсина реакционноспособной формой комплекса Михаэлиса является комплекс фермента с протонированным по аминогруппе субстратом [104, 105, 109—112]. В пользу такого предположения свидетельствует более высокая реакционная способность протонированной по аминогруппе формы сложных эфиров аминокислот в реакциях гидролиза [113], а также возможность образования водородной связи NH_3^+ -группы с карбонильной группой Ser^{14} [112]. Образование водородной связи в комплексе Михаэлиса обеспечило бы более благоприятное связывание субстрата и согласно принципу «лучшее связывание — лучший катализ» [103] могло быть реализовано на каталитической стадии химотрипсинового катализа. Данные кристаллографического исследования α -химотрипсина указывают на наличие в активном центре фермента рядом с гидрофобной областью остатка аспарагиновой кислоты — Asp^{194} , участвующего в образовании солевого мостика, необходимого для поддержания каталитически активной третичной структуры [114, 115], и способного к электростатическому взаимодействию с протонированной аминогруппой субстрата. Предложенная на основе этих соображений схема ферментативной реакции химотрипсинового гидролиза эфиров аминокислот со свободной аминогруппой хорошо описывает рН-зависимости всех кинетических параметров [109].

Характерным свойством α -химотрипсина является его высокая стереоспецифичность по отношению к L-изомерам эфиров аминокислот со свободной аминогруппой, что позволяет использовать эту реакцию для разделения рацематов аминокислот. Представляет интерес рассмотреть факторы, определяющие высокую стереоспецифичность α -химотрипсина. Представление о том, что стереоспецифичность определяется структурой субстрата, а не есть инвариантное свойство фермента, было подтверждено при изучении гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров N-ацетилированных аминокислот [116, 117]. С увеличением гидрофобности боковой цепи субстратов деацилирование L-ацил-ферментов ускоряется, а соответствующих D-ацил-ферментов — замедляется.

По твердо установленному сейчас мнению [103], движущей силой химотрипсинового катализа является гидрофобное взаимодействие между боковой цепью (R^2) субстрата общей формулы $R^2-\text{CH}(\text{NHR}^1)-\text{COR}^3$ и группами, расположенными в гидрофобной области активного центра фермента. При этом выполняется правило: «лучшее связывание — лучший катализ». Однако это правило применимо только к вариации R^2 . В работе [118] показано, что при изменении N-ацильной группы сложноэфирных производных L-аланина наблюдается зависимость «лучшее связывания — худшая реакция». Для интерпретации этого эффекта была предложена гипотеза «непродуктивного связыва-

ния» молекулы субстрата ферментом. Схематически связывание молекул *L*- и *D*-субстратов можно изобразить на основе модели трехточечного связывания субстрата активным центром α -химотрипсина (рис. 1). Видно, что в случае *L*-субстрата «правильное» связывание является в то же время и продуктивным. Поэтому увеличение гидрофобности боковой цепи аминокислоты (группа R^2) приводит к повышению эффективности катализа (рис. 1 a). Непродуктивное связывание в этом случае объясняется тем, что N-ацильный радикал R^1 , обладающий достаточной гидрофобностью, сам может занять место в гидрофобной области активного центра и карбонильная группа разрываемой связи в субстрате не будет ориентирована правильным образом по отношению к обобщенному нуклеофилу активного центра (рис. 1 b).

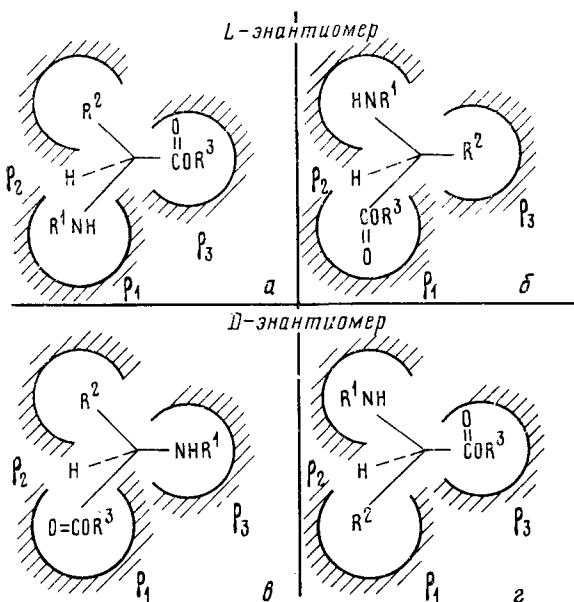


Рис. 1. Варианты трехточечного связывания молекулы субстрата активным центром α -химотрипсина; P_1 — акцептор водородной связи, P_2 — гидрофобная область активного центра, P_3 — обобщенный нуклеофил активного центра

Гидролиз производных *D*-аминокислот происходит прямо противоположным образом: «правильное» связывание субстрата, т. е. такое, при котором группа R^2 находится в гидрофобной области активного центра, приводит к непродуктивному фермент-субстратному комплексу (рис. 1 b), так как образование продуктивного комплекса в этом случае стерически затруднено и требует, чтобы N-ациламидная группа заняла место, предназначенное в активном центре для атома водорода [119]. Продуктивной же (рис. 1 c) является как раз «неправильная» ориентация N-ациламидной группы в гидрофобной области P_2 . Из сказанного ясно, что увеличение гидрофобности аминокислотного радикала R^2 ведет к увеличению стереоспецифичности фермента, а увеличение гидрофобности N-ацильной группы R^1 , напротив, должно ее снижать. Подобный вывод был подтвержден экспериментально [120, 121].

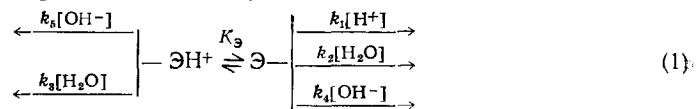
Для разделения рацематов аминокислот важно знать, как изменится стереоспецифичность действия α -химотрипсина при переходе к субстратам со свободной аминогруппой. Как оказалось, характер влияния гидрофобности радикала R^2 на стереоспецифичность химотрипсинового гидролиза метиловых эфиров аминокислот одинаков для субстратов со свободной и ацетилированной аминогруппой, однако отношение констант скоростей второго порядка ферментативного гидролиза *L*- и *D*-субстратов для ацетилированных аминокислот примерно в десять раз

больше, чем для аминокислот со свободной аминогруппой. D-Субстрат, имеющий свободную аминогруппу, гидролизуется α -химотрипсином быстрее, чем его ацилированный аналог [112].

2. Проблема спонтанного гидролиза эфиров α -аминокислот

При стереоселективном гидролизе сложных эфиров аминокислот под действием протеолитических ферментов спонтанный (неферментативный) гидролиз сложного эфира аминокислоты становится одним из сопутствующих процессов, мешающих эффективному разделению рацемической смеси. В связи с этим необходим поиск оптимальных условий, которые бы соответствовали как относительно невысоким скоростям спонтанного гидролиза, так и достаточной активности используемого биокатализатора. Наиболее чувствительными параметрами такой оптимизации являются значения pH раствора и температура проведения реакции. Поэтому сопоставление pH-профиля каталитической активности фермента и pH-зависимости скорости спонтанного гидролиза является весьма актуальной задачей.

До недавнего времени изучение гидролиза сложных эфиров аминокислот проводилось лишь в узком интервале в щелочной области pH 9–12, что не позволяло оценить кинетику протекания процесса в нейтральных и слабокислых средах [122–125]. На основе детального изучения pH-зависимости гидролиза этилового эфира D, L-триптофана в области pH 4,5–10,5 предложена следующая кинетическая схема [113]:



и соответствующее ей уравнение скорости гидролиза:

$$V = k_1[\text{ЭН}^+] [\text{H}^+] + k_2[\text{ЭН}^+] [\text{H}_2\text{O}] + k_3[\text{ЭН}^+] [\text{H}_2\text{O}] + \\ + k_4[\text{ЭН}^+] [\text{OH}^-] + k_5[\text{ЭН}^+] [\text{OH}^-] = k_{\text{набл}}[\text{Э}]_{\text{общ}}$$

где ЭН⁺ и Э — протонированная и непротонированная по аминогруппе формы сложного эфира аминокислоты, k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 — константы скорости их кислотного, нейтрального и щелочного гидролиза. На схеме (1) не отражена возможность протекания реакции кислотного гидролиза протонированной формы субстрата, которая является маловероятной из-за электростатического отталкивания взаимодействующих частиц. Анализ полученной pH-зависимости $k_{\text{набл}}$ и литературных данных по гидролизу сложных эфиров N-ацилированных аминокислот позволил найти или, по крайней мере, оценить все кинетические параметры схемы (1):

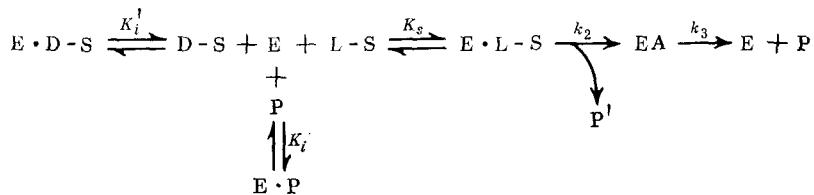
$$k_1 \sim 10^{-5} \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}, \quad k_2 \sim 10^{-7} \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}, \quad k_3 = 2,7 \cdot 10^{-7} \text{M}^{-1}\text{c}^{-1},$$

$$k_4 = 1,2 \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}, \quad k_5 = 79 \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}.$$

На основании изученной pH-зависимости гидролиза этилового эфира D, L-триптофана можно сделать некоторые практические важные выводы. Так, для того, чтобы уменьшить вклад побочного спонтанного гидролиза при ферментативном разделении рацематов аминокислот в результате стереоселективного гидролиза их эфиров, необходимо использовать протеолитические ферменты с pH-оптимумом каталитического действия в области кислых и нейтральных значений pH (нейтральные и кислые протеазы). Возможности использования щелочных протеаз в значительной степени ограничены, поскольку в области щелочных значений pH скорость спонтанного гидролиза столь высока, что трудно избежать загрязнения конечного продукта даже при использовании высоких концентраций фермента и проведении процесса за короткий промежуток времени.

При исследовании возможности использования того или иного протеолитического фермента для разделения рацематов аминокислот энантiosелективным гидролизом сложных эфиров аминокислот важно знать

особенности протекания реакции при концентрациях субстрата, близких к насыщающим, т. е. в условиях препартивного разделения рацематов аминокислот. Как показано [126, 127], полные кинетические кривые энантиоселективного гидролиза этилового эфира *D*, *L*-триптофана, катализируемого α -химотрипсином, описываются схемой:



где E — α -химотрипсин, L - S и D - S — этиловые эфиры *L*- и *D*-триптофана соответственно, P — *L*-триптофан, P' — этиловый спирт, K_i' — константа конкурентного ингибирования этиловым эфиром *D*-триптофана, равная $(1,8 \pm 0,3)$ мМ, K_i — константа конкурентного ингибирования *L*-триптофаном, равная (25 ± 5) мМ, $k_{\text{кат}} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$ — каталитическая константа, равная (100 ± 10) с⁻¹ и $K_m = K_s k_3 / (k_2 + k_3)$ — константа Михаэлиса, равная $(2,4 \pm 0,1)$ мМ (все константы определены при 37° и pH 6,3).

Подводя итог рассмотрению α -химотрипсина как потенциального катализатора энантиоселективного гидролиза сложных эфиров ароматических кислот можно сделать следующие выводы: во-первых, α -химотрипсин обладает очень высокой стереоспецифичностью, во-вторых, pH-оптимум каталитической эффективности действия α -химотрипсина на эфиры аминокислот со свободной аминогруппой лежит в области pH 6,5—7,0, где неферментативный гидролиз субстрата протекает лишь в незначительной степени; скорости ферментативного гидролиза *L*-изомера субстрата, ферментативного гидролиза *D*-изомера и спонтанного гидролиза рацемата в pH-оптимуме действия α -химотрипсина относятся, примерно, как 10 000 : 1 : 0,0001, что приводит лишь к очень незначительному загрязнению конечного продукта другим изомером. В-третьих, оптимальная с точки зрения соотношения ферментативного и неферментативного гидролиза область pH оказывается и наиболее удобной для выделения продукта реакции из реакционной смеси, поскольку именно в этой области pH аминокислоты обладают наименьшей растворимостью, а гидролизуемый субстрат достаточно хорошо растворим. В-четвертых, *L*-триптофан и этиловый спирт, образующиеся в ходе ферментативной реакции, незначительно влияют на кинетику процесса, что позволяет быстро достигать высоких степеней превращения субстрата.

Таким образом, α -химотрипсин является исключительно удобным катализатором для процесса разделения рацематов ароматических аминокислот гидролизом их сложных эфиров. Однако существенным недостатком α -химотрипсина оказывается его животное происхождение и, следовательно, относительно высокая стоимость. Возможным путем преодоления этого недостатка может быть использование иммобилизованных препаратов фермента с достаточно высокой стабильностью, что позволило бы использовать их для многократного проведения процесса. Иммобилизация α -химотрипсина хорошо изучена [6], и не вызывает сомнения возможность получения активных препаратов иммобилизованного фермента с высокой стабильностью и хорошими механическими свойствами, необходимыми для практического применения. Другой путь решения проблемы — поиск протеолитических ферментов микробного происхождения, близких по своим свойствам α -химотрипсину.

3. О стереоспецифичности протеолитических ферментов

Систематическое исследование бактериальных протеаз с точки зрения их пригодности для разделения рацематов аминокислот было проведено лишь недавно [126—129]. К сожалению, все исследованные

ферменты или ферментные комплексы бактериального происхождения заметно уступают по активности и, что самое важное, по энантиоселективности α -химотрипсину. Наиболее подходящими для стереоселективного гидролиза сложных эфиров ароматических аминокислот являются протеазы из *Bacillus subtilis* и внеклеточная протеаза из *Actinomyces*. Каталитические константы гидролиза этилового эфира *L*-триптофана в рН-оптимуме составляют для этих ферментов ($6,5 \pm 0,5$) и ($3,2 \pm 0,4$) с^{-1} , а энантиоселективность, т. е. отношение каталитических констант реакций ферментативного гидролиза *L*- и *D*-изомеров этилового эфира триптофана, равна 200 и 150 соответственно. Для α -химотрипсина эти величины составляют 100 с^{-1} и 10 000 [126, 129]. Кроме того, рН-оптимум каталитического действия этих субстратов приходится на слабощелочную область, где мала растворимость субстрата и увеличивается вклад неферментативного гидролиза.

Относительно невысокая стереоспецифичность микробных протеолитических ферментов может быть связана с тем, что для подобных ферментов исключительно важны в отличие от, скажем, α -химотрипсина, контакты с аминокислотными остатками вдали от расщепляемой связи при гидролизе олиго- и полипептидных субстратов [130]. Так переход от амида ацетиламинокислоты к олигопептиду, полностью покрывающему активный центр фермента, приводит к увеличению эффективности действия химотрипсина в 4 000 раз [131], трипсина — в 300 раз [132], а для микробных ферментов эластазы, протеазы из *Streptomyces griseus* подобное увеличение эффективности гидролиза составляет 10^7 [130, 133—135]. По-видимому, подобное увеличение эффективности гидролиза обусловлено более прочным связыванием олигопептидных субстратов по сравнению с амидом ацетиламинокислоты и, следовательно, более «точной» их ориентацией, что должно приводить к увеличению стереоспецифичности действия этих ферментов. Однако вполне возможно, что и среди большого числа микробных протеаз найдется фермент, отвечающий самым высоким требованиям, предъявляемым к катализатору стереоселективного гидролиза эфиров аминокислот для разделения рацемата на оптические изомеры, а добавление ионов металлов позволит увеличить стереоспецифичность бактериальных протеаз [128, 136, 137].

Энантиоселективным гидролизом амидов под действием протеолитических ферментов были разделены на оптические антиподы рацематы ацетиллейцина [138], метионина и α -аминофенилуксусной кислоты [139]. Важно, однако, отметить, что стереоселективный гидролиз амидов аминокислот не нашел широкого применения из-за низких скоростей гидролиза амидных субстратов по сравнению с эфирными производными аминокислот.

VI. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЦИЛАМИДОГИДРОЛАЗ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ РАЦЕМАТОВ

Стереоселективный гидролиз N-ацилированных аминокислот в настоящее время получил наибольшее распространение из всех методов разделения рацематов. Начало применению этого метода было положено в 1922 г., когда было обнаружено, что препараты тканей животных катализируют гидролиз только N-бензоил-*L*-аминокислот [140]. Впоследствии была показана возможность гидролиза не только бензоильных производных, но и других N-ациламинокислот [141—144]. Широкое практическое применение стереоселективного гидролиза ацилированных аминокислот стало возможным лишь после появления цикла работ Гринштейн и сотр., которым удалось разделить рацематы практически всех природных и ряда синтетических аминокислот используя гомогенат свиных почек или частично очищенные препараты ацилазы аминокислот [145].

Фермент, катализирующий гидролиз N-ацилированных аминокислот, получил название ацилаза аминокислот (КФ 3.5.1.14). Ацилазы аминокислот относят к группе ферментов, гидролизующих связь, отлич-

ную от пептидной (КФ 3.5.). Однако близость свойств С — N-связи в ацилированных аминокислотах и пептидах, а также необходимость свободной карбоксильной группы для проявления ацилазной активности роднит ацилазу с рядом ферментов, гидролизующих пептидную связь (КФ 3.4.), например с карбоксипептидазами (КФ 3.4.2.), отщепляющими С-концевую аминокислоту от пептидов и способными гидролизовать N-ацилированные аминокислоты с ароматической боковой цепью. Кроме того, ацилазы аминокислот обладают дипептидазной активностью [146], что роднит их с группой ферментов дипептидаз (КФ 3.4.3.). Подобная близость субстратной специфичности ацилаз с другими ферментами приводит иногда к путанице. Так, в некоторых работах предлагалось использовать определение ацилазной активности в печени для диагностики вирусного гепатита, хотя на самом деле следили за гидролизом N-бутирил- γ -L-глутамил- β -нафтиламида, определяя выделявшийся в ходе реакции β -нафтиламин [147, 148]. В данном случае определяемая активность является не ацилазной, а амидазной (КФ 3.5.1.4).

Помимо ацилазы I из животных тканей выделено еще по крайней мере два ферmenta, способных осуществлять гидролиз N-ацилированных аминокислот. Первый из них, катализирующий гидролиз ацильных производных аспарагиновой кислоты, получил название — ацилаза II свиной почки (КФ 3.5.1.15). Второй фермент гидролизует N-ацилированные ароматические аминокислоты: тирозин, фенилаланин, триптофан, β -фенилсерин и получил название — ацилаза III [149, 150]. Оба эти фермента практически не исследованы, а существование ацилазы III вообще ставилось под сомнение и ее активность приписывалась карбоксипептидазе. Лишь в последние годы появились работы, подтверждающие наличие специального фермента, гидролизующего N-ацильные производные ароматических аминокислот [151, 152]. В литературе есть указания и на наличие специального фермента, ответственного за гидролиз N-формилметионина [153].

Биологическая роль ацилаз до конца не выяснена. Предполагается, что они участвуют в катаболизме N-ацетиламинокислот, образующихся при гидролизе N-ацетилированных белков [154, 155].

1. Ацилаза свиной почки

Ацилаза аминокислот I свиной почки выделена в гомогенном состоянии и изучены ее физические и химические свойства [156—162]. Это — двусубъединичный фермент с молекулярным весом 86 000, состоящий из 772 аминокислотных остатков. Каждая субъединица фермента содержит две SH-группы, одна из которых существенно более активна к различным SH-реагентам. Модификация двух SH-групп на молекулу фермента приводит к его полной инактивации. Каждая субъединица содержит две S — S-связи. Восстановление двух S — S-связей на молекулу фермента приводит к его полной инактивации [158]. Ацилаза полностью инактивируется также при фотоокислении или химической модификации четырех остатков гистидина [160] и двух остатков триптофана [159] на молекулу фермента.

Недавно появилось сообщение о том, что ацилаза I является цинк-зависимым металлоферментом [161], содержащим один атом цинка на субъединицу.

Рассматривая субстратную специфичность ацилазы аминокислот I свиной почки следует выделить два момента: а) специфичность фермента к природе аминокислотного остатка и б) специфичность к природе ацильной группы.

Ацилаза I обладает достаточно широкой специфичностью и гидролизует с высокой скоростью производные большинства алифатических аминокислот [161, 163]. Каталитическая константа гидролиза ацетил-L-метионина при pH 7,0 и 37° составляет 330 с^{-1} (определенна на электрофоретически гомогенном ферменте) [157]. Константа Михаэлиса для гидролиза большинства ацетильных производных L-аминокислот составляет несколько миллимоляр. С увеличением длины цепи в неразвет-

вленном остатке аминокислоты растет эффективность гидролиза. Если представить полученные данные в рамках корреляции «структура — реакционная способность».

$$\lg \frac{V_{\max}}{K_m} = \alpha \pi + \text{const}$$

где V_{\max} — максимальная скорость ферментативной реакции, K_m — константа Михаэлиса, π — константа гидрофобности Ганша для заместителя, варьирующегося в данном ряду (π характеризует свободную энергию переноса углеводородного остатка из воды в стандартную гидрофобную фазу — *n*-октанол и для CH_2 -группы в неразветвленном радикале составляет 0,51), α — коэффициент пропорциональности, то оказывается, что полученные данные описываются линейной зависимостью с коэффициентом пропорциональности $\alpha \approx 0,7$. При переходе от линейного аминокислотного остатка к разветвленному с таким же числом атомов углерода (норвалин — валин, норлейцин — лейцин) эффективность гидролиза падает в 5—10 раз. Таким образом, полученная корреляция между кинетической эффективностью и гидрофобностью субстрата свидетельствует о том, что для ацилазы свиной почки справедлива простая «экстракционная» модель реализации энергии связывания субстрата в ходе ферментативной реакции (детальное пояснение моделей реализации энергии связывания в ходе ферментативной реакции дано, например, в работе [103]). Гидрофобный участок активного центра ацилазы представляет собой узкую «щель» длиной не менее четырех метиленовых звеньев [163]. Полученные результаты согласуются с данными по ингибиции ацилазы свободными аминокислотами [164] и с тем фактом, что производные ароматических аминокислот гидролизуются на два-три порядка медленнее производных метионина. Наличие в ароматическом кольце боковой цепи аминокислоты электронодонорных заместителей приводит к еще большему снижению скорости гидролиза [165]. Ацильные производные пролина и оксипролина устойчивы к действию ацилазы I [149]. Что касается специфичности ацилазы I к природе ацильной части субстрата, то фермент гидролизует различные ацильные производные аминокислот. Среди производных незамещенных алифатических кислот лучшими субстратами являются ацетиламинокислоты [166]. Формил- и пропионил-производные гидролизуются хуже ацетил-производных. Появление в ацильной части электроноакцепторных заместителей приводит к увеличению скорости гидролиза. Реакционная способность субстратов растет в ряду иодацетил-<<бромоцетил-<хлорацетил-<фторацетил-производных [149]. Бензоильные производные аминокислот являются плохими субстратами. Наличие электроноакцепторных заместителей в *пара*-положении бензоильных производных аминокислот ускоряет, а электронодонорных — замедляет гидролиз, катализируемый ацилазой I [165].

Имеются сведения, что ацилаза I способна катализировать гидролиз дипептидов [146, 164, 167], правда, скорости гидролиза на два-три порядка ниже, по сравнению с хлорацетильными производными аминокислот. Интересно отметить, что исследованный препарат фермента расщеплял дипептиды *L-L*-конфигурации, но не расщеплял дипептиды *D-D* и *D-L*-конфигурации [146]. Был сделан вывод, что для проявления каталитической активности ацилазы I необходимо, чтобы не только С-концевая, но и N-концевая аминокислота были в *L*-конфигурации. В то же время известно, что ацилаза одинаково хорошо гидролизует оба диастереомера *D*, *L*- α -хлорпропионил-*L*-аланина [167].

Необходимо отметить, однако, что в работах [146, 167] использовали коммерческие препараты ацилазы I без дополнительной очистки. Можно полагать, что обнаруженная активность по отношению к дипептидам, которая, по крайней мере, на два порядка ниже активности ацилазы I к N-ацетил-*L*-метионину, является следствием примеси другого фермента — дипептидазы. Авторы работы [164] использовали электрофоретически гомогенный препарат ацилазы I, однако вряд ли и в этом случае

использованный критерий гомогенности может гарантировать отсутствие менее 1% примесного белка. Таким образом, вопрос о наличии дипептидазной активности ацилазы I следует считать открытым.

Показано, что величины константы Михаэлиса для неспецифических субстратов (ацетильных производных ароматических аминокислот и производных алифатических аминокислот с объемной ацильной частью) приблизительно равны константам конкурентного ингибирования гидролиза специфических субстратов в присутствии неспецифических субстратов [165]. В случае, если для ацилазы I справедлива трехстадийная схема ферментативной реакции, то подобное равенство будет означать, что скорости гидролиза неспецифических субстратов ацилазы I лимитирует стадия ацилирования фермента [165]. Однако справедливость трехстадийной схемы в случае гидролиза, катализируемого ацилазой, пока никак не доказана.

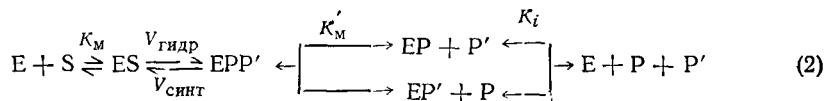
При кислых значениях pH кинетически и с помощью седиментационного равновесия удалось обнаружить диссоциацию ацилазы I на неактивные субъединицы [168]. Константа диссоциации составляет $2,0 \cdot 10^{-7} M$ при pH 7,2 и $1,1 \cdot 10^{-3} M$ при pH 5,8. Диссоциация на неактивные мономеры под действием субстрата объясняет ингибирование субстратом активности ацилазы I при кислых pH и тот факт, что на кривой накопления продукта в этих условиях имеется «всплеск» [168, 169].

pH-Оптимум каталитической активности находится в области pH 7,0—7,5 [164]. Константа Михаэлиса при гидролизе ацетил-L-метионина, катализируемом ацилазой I, не зависит от pH, а pH-зависимость максимальной скорости имеет колоколообразный вид и описывается ионизацией двух ионогенных групп, имеющих pK_a 6,7 и pK_b 8,9 [170].

Следует отметить, что в присутствии высоких концентраций продуктов реакции гидролиза, катализируемой ацилазой I, — ацетат иона и аминокислоты — реакция гидролиза N-ацетиламинокислот протекает не до конца, а до установления равновесия в системе [171—173]. Однако о кинетике синтеза N-ацетильных производных аминокислот, катализируемого ацилазой I свиной почки, до недавнего времени имелись лишь качественные данные.

2. Кинетические и термодинамические особенности действия ацилазы

Недавно разработанный метод количественного определения аминокислот, основанный на спектрофотометрической регистрации продукта взаимодействия аминокислоты с o-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола и его использование для изучения ацилаз [177] позволило провести детальное исследование кинетики реакции гидролиза — синтеза ацетил-L-метионина, катализируемой ацилазой I свиной почки, предложить кинетическую схему действия фермента и определить кинетические параметры реакции [126, 170, 178]:



где E — ацилаза, S — ацетил-L-метионин, P — ацетат натрия, P' — L-метионин, K_M и K'_M — константы Михаэлиса в реакции гидролиза и синтеза, соответственно равные (25 ± 3) и (140 ± 20) mM; K_i — константа связывания ацетат-иона, равная (43 ± 5) mM; $V_{\text{гидр}}$ и $V_{\text{синт}}$ — максимальные скорости реакций гидролиза и синтеза, соответственно равные $(17 \pm 2) \cdot 10^{-5}$ и $(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} M \cdot s^{-1}$ при концентрации ацилазы 1 мг/мл. Кинетические параметры связаны соотношением Холдейна:

$$K_{\text{равн}} = \frac{K'_M K_i V_{\text{гидр}}}{K_M V_{\text{синт}}}$$

где $K_{\text{равн}}$ — константа равновесия реакции гидролиза — синтеза аце-

тил-*L*-метионина, равная $(3,6 \pm 0,4)$. Эмпирическое уравнение (3) [179] для описания действия мембранных реакторов с ацилазой I в условиях, когда начинает сказываться равновесие реакции, по сути дела подтверждает кинетическую схему (2)

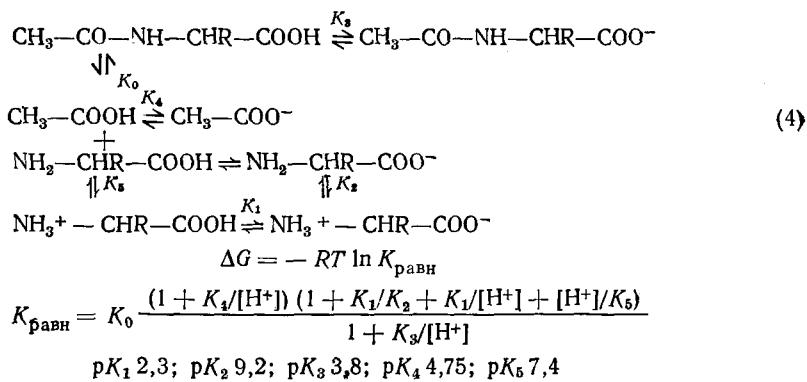
$$v = \frac{V_{\max}}{1 + (S_L + S_{0D})/K_1} \cdot \frac{S_L - (S_{0L} - S_L)^2/K_{\text{равн}}}{K_m [1 + (S_{0L} - S_L)/K_2] + S_L} \quad (3)$$

где S_L , S_D — концентрации ацетил-*L*- и ацетил-*D*-метионина соответственно (с индексом 0 — начальные концентрации) K_1 и K_2 — константы ингибиции, равные $(1,45 \pm 0,08)$ М и (3 ± 1) мМ соответственно, V_{\max} — максимальная скорость $3,37 \cdot 10^{-5}$ М·с⁻¹ при концентрации ацилазы I, равной 1 мг/мл, K_m — константа Михаэлиса, равная $(0,8 \pm 0,5)$ мМ и $K_{\text{равн}}$ — константа равновесия, равная 2,75.

Поскольку величины констант равновесия реакций гидролиза — синтеза N-ацетиламинокислот мало зависят от природы аминокислоты (табл. 3), то предложенный кинетико-термодинамический подход пригоден для описания взаимодействия ацилаз с субстратами различной структуры.

Несомненно, определенные константы равновесия реакции гидролиза — синтеза N-ацетильных производных аминокислот не являются термодинамическими константами в строгом смысле слова, поскольку концентрации реагентов в реакционной смеси намного выше, чем в разбавленных растворах, для которых коэффициент активности равен единице. Отсутствие в литературе данных по коэффициентам активности подобного рода соединений, обусловленное исключительной трудностью и неоднозначностью измерения этих величин, привело к тому, что в настоящее время общепринято использование констант равновесия, рассчитанных по концентрациям реагирующих веществ, в качестве оценки для истинных термодинамических констант равновесия [56, 57, 78, 82]. Поскольку константа равновесия K_0 в расчете на неионизированные формы реагирующих веществ не зависит от pH, а весь вклад в pH-зависимость $K_{\text{равн}}$ обусловлен ионизацией определенных ионогенных групп, то учитывая все существующие равновесия в системе (4) можно рассчитать зависимость $K_{\text{равн}}$, а следовательно, и $\Delta G_{\text{гидр}}$ от pH (рис. 2) [170, 178].

Из рис. 2 видно, что равновесие в этой реакции сдвинуто в сторону синтеза именно при тех значениях pH, где наиболее активны большинство как нативных ацилаз животного и микробного происхождения, так и иммобилизованные препараты этих ферментов. Подобный вывод имеет определенное практическое значение, поскольку обратимость реакции при стереоселективном гидролизе рацемической ацетиламинокислоты будет снижать производительность процесса.

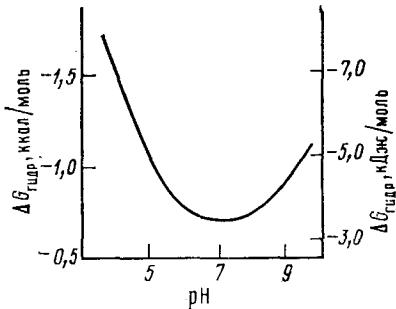


Поиск новых микробных ацилаз или создание препаратов иммобилизованного фермента с pH-оптимумом каталитического действия в области pH, где обратимость реакции гидролиза практически не будет сказываться даже при высоких концентрациях ацетат-иона, позволили бы

избавиться от подобного недостатка. Возможным путем создания иммобилизованных препаратов ацилаз с измененным рН-оптимумом действия является их включение в структуру полиэлектролитных комплексов [180].

Интересно отметить также, что свободная энергия гидролиза ацетил-*L*-метионина в расчете на неионизированные формы исходных веществ и продуктов реакции составляет 7,46 ккал/моль (31,0 кДж/моль), т. е. синтез является термодинамически выгодным процессом. Тот факт, что

Рис. 2. рН-зависимость свободной энергии гидролиза ацетил-*L*-метионина



в обычных условиях синтез ацетамидной связи практически не наблюдается, обусловлен тем, что как исходные вещества, так и продукты реакции присутствуют в реакционной среде в виде ионов, а концентрация неионизированных форм ничтожно мала. Полученное для ацетил-*L*-метионина значение ΔG_0 несколько превышает значения свободной энергии гидролиза в расчете на неионизированные формы, обычно получаемые для пептидной связи [82], и свидетельствует о том, что синтез ацетамидной связи термодинамически еще более выгоден по сравнению с синтезом пептидной связи. Аналогичные результаты были получены и при изучении обратимого гидролиза N-фенилацетильных производных аминокислот, катализируемого пенициллинамидазой из *E. coli* [181, 182].

Ацилаза I свиной почки обладает высокой стереоспецифичностью. Из большого числа ацетиламинокислот лишь *D*-изомер ацетилметионина заметно гидролизуется ферментом; отношение скоростей гидролиза ацетил-*L*-метионина и ацетил-*D*-метионина, взятых порознь, составляет примерно 10 000 : 1 [52]. В присутствии *L*-метионина действие ацилазы I на ацетил-*D*-метионин значительно тормозится и при гидролизе рацемического ацетил-*D*, *L*-метионина соотношение скоростей гидролиза *L*- и *D*-изомеров будет близко к 40 000 : 1. Подобное же, если не большее, соотношение скоростей гидролиза антиподов существует для ацильных производных других аминокислот. Обнаружено, однако, что если ацильной группой является трифторацетил, то для некоторых аминокислот наблюдается сильное уменьшение стереоспецифичности ацилазы I [183].

Высокая стереоспецифичность ацилазы I при гидролизе ацетильных и хлорацетильных производных различных аминокислот позволила разделить на оптические антиподы рацематы ряда природных и синтетических аминокислот. В то же время необходимо отметить, что ацилаза I непригодна для разделения рацематов аспарагиновой кислоты, пролина и оксипролина, ароматических аминокислот.

3. Микробные и растительные ацилазы

Ацилазная активность (преимущественно гидролиз ацетилметионина) была обнаружена в листьях табака [184], в клубнях картофеля, во многих овощах (особенно высокая на единицу сухого веса у редиса и тыквы), практически во всех злаках и бобовых (за исключением полированного риса, обработка которого приводит, возможно, к нарушению ферментной системы); в коре мандаринов, апельсинов и фиг [185, 186].

Ацилазная активность различных микроорганизмов

Микроорганизм	Субстратная специфичность		Ингибиторы и активаторы ферментов	рН-Оптимум действия	Ссылки
	гидролизует	не гидролизует			
<i>Str. caesporosus</i>	Ac-L-аминокислоты	<i>D</i> -изомеры	HB: бивалентные катионы, ЭДТА	7,0—8,0	[199]
<i>Bact. cadaveris</i>	Form-Gly, -Tyr	Ac-, Clac-Asp	—	7,0—8,0	[200]
<i>Micrococcus n. sp.</i>	то же	то же	—	7,0—8,0	[200]
Углеводородокисляющие микроорганизмы	Ac-Leu, -norLeu, -Val, -Met, Bz-Leu	Ac-Trp, Bz-Asp	—	—	[201]
<i>Bacillus brevis</i>	Ac-L-Met	Ac-D-Met	—	—	[202]
<i>Bacillus subtilis</i>					
<i>Bacillus megaterium</i>					
<i>Mycrococcus lysodektyiens</i>	Ac-L-Glu	Ac-D-Glu	A : Co(II) ($5 \cdot 10^{-5} M$), Ni(II) ($10^{-5} M$), Fe(II) ($10^{-2} M$), Mn(II) ($10^{-2} M$); И : Zn(II), ЭДТА	6,5—6,6	[203]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Form-L-Met, Ac-L-Met, Ac-L-амино- кислоты *		HA : Mn(II) ($10^{-3} M$), Co(II) ($10^{-4} M$)	—	[204]
<i>E. coli B</i>			A : Co(II); И : Cu(II), Zn(II), Ni(II), ЭДТА	7,0	[205]
<i>E. coli</i> 160-37	Form-L-аминокислоты		—	7,2	[204]
<i>E. coli</i> ATCC 9637	Ac-Met, -Orn	Ac-Ala, -Leu, -Val, -Glu, Clac-Tyr, Bz-Arg	—	—	[206,
<i>E. coli</i>	Phac-L-Ala, -L-Val, -L-Ambut, -L- Leu, -L-Phe	<i>D</i> -изомеры	—	—	207]
То же	Ac-L-Ala, -L-Met, Clac-L-Ala, -L-Met, -L-Asp, -L-Leu, -L-Phe	<i>D</i> -изомеры Clac-L-Tyr, -L-Trp	A : Co(II)	—	[208]
<i>Neurospora crassa</i>	Phac-L-амино-кислоты				
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	пальмитил-L-Asp, L-Val, -L-Phe, де- каноил-L-Asp, лаурил-L-Asp	Ac-, бутирил-, гексаноил-, октаноил-L-Asp	A : ионы щелочных металлов; И : Cu(II), Hg(II)	5,7—7,3	[209]
То же	Ac-L-Val, -L-Asp, Clac-L-Phe		A : бивалентные катионы; И : Cu(II), Hg(II)	—	[210,
<i>Mycobacterium avium</i>	пальмитил-L-Asp, -L-Val, -L-Phe		HB : Cu(II), Hg(II)	6,2	211]
То же	Ac-L-Val, L-Asp, Clac-L-Phe	—	И : Cu(II), Hg(II)	7,4	[212]
<i>Mycobacterium phlei</i>	лаурил-L-Phe, -L-Ala, -L-Ambut, -L-Met, -L-Glu, Bz-L-Ala, -L-Ambut	—	—	—	[213]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bz-Gly, -Phe	—	—	—	[213]
.Пивные дрожжи	Ac-L-Met, Clac-L-Ala, -L-Leu, -L-Phe, -L-Trp, Gly-L-Met	—	—	—	[214]
<i>Pseudomonas</i> ATCC 11299B	Form-Asp, Clac-Asp	Ac-Met, Form-Leu	HA : Co(II); A : Fe(II)	7,0	[215]
То же	Form-, Ac-, Clac-Asp	Ac-Met, Form-Leu	HA : Co(II); A : Fe(II)	8,0	[215]

Почвенные псевдомонады	Ac-L-Asp, -L-Asn, Bz-L-Asp, дипептиды с L-Asp или L-Asn на C-конце	D-изомеры, Ac-, Bz-аминокислоты	HA : Co(II), Zn(II)			[216]
То же	Ac-L-Ala, Bz-L-Ala	то же	то же			[217]
»	Ac-L-Glu, -L-Gln, Bz-L-Glu, -L-Gln, дипептиды с L-Glu или L-Gln на C-конце	—	—			[218]
<i>Pseudomonas</i> KT83	Bz-D-Phe, -D-Phe, -D-n-nitro-Phe, -D-β-phenylSer, diClac-D-ароматические аминокислоты	L-изомеры	—			[219]
<i>Pseudomonas</i> KT 84	diBz-L-Lys **, Bz-L-Ser, -L-Thr, -L-Orn, -L-Met, -L-Glu, -L-Asp, -L-Leu, -L-Val	D-изомеры	—			[220, 221]
<i>Pseudomonas</i> KT 85	Bz-L-β-phenylSer, -L-isoLeu	D-изомеры	—			[222, 223]
<i>Pseudomonas</i> KT 104	Ac-L-Trp	Ac-D-Trp	—			[224, 225]
<i>Pseudomonas</i> KT 202, KT 205	Bz-L-Thr, diBz-L-Lys **, Ac-L-Trp, -L-Met	D-изомеры	—			[226]
<i>Pseudomonas</i> KT 218	Bz-, Ac-L-аминокислоты с прямой цепью C ₆ , C ₈ , C ₁₂ , C ₁₄ ; Bz-L-Thr	D-изомеры	—			[227]
<i>Pseudomonas</i> KT 224	Ac-L-Met	Ac-D-Met	—			[228]
<i>Pseudomonas</i> KT 230, KT 231, KT 232, KT 233	diBz-L-Lys **; Bz-L-Phe, -L-Thr, -L-алифатические аминокислоты	D-изомеры	—			[229]
<i>Pseudomonas</i> KT 251, KT 256	Ac-L-Trp	Ac-D-Trp	—			[230, 235]
<i>Pseudomonas</i> KT 301	diBz-L-Lys **	diBz-D-Lys	—			[231]
<i>Pseudomonas</i> KT 303 KT 305	Bz-L-Trp	Bz-D-Trp	—			[232]
<i>Pseudomonas</i> KT 313	diBz-L-Lys **, α-Phac-ε-Bz-L-Lys	D-изомеры	—			[233]
<i>Pseudomonas</i> KT 801	Bz-, Phac-, diClac-октаноил-L-аминокислоты *	D-изомеры	A : Mg(II) *; И : Co(II), Cu(II) Mn(II), о-фенантролин И : Hg(II) *, Zn(II) *, Co(II) (10 ⁻³ M) *	8,0		[234]
<i>Pseudomonas</i> AAA 6020	Phac-L-Val, -L-Leu, -L-Glu, -L-Ala, -L-Met, -D-аминокислоты	Ac-, Bz-аминокислоты	—			[235]
<i>Pseudomonas</i> AAA6029	Bz-, Ac-D-β-Phe-, -D-Met D-Leu, -D-Ala, -D-Val	Phac-D- и -L-аминокислоты, Bz-, Ac-L-Phe, -L-Met, -L-Leu, -L-Ala, -L-Val, Ac-D-L-аминокислоты	A : L-Cys (3 · 10 ⁻³); И : Hg(II), Zn(II) (10 ⁻³ M), ПХМБ (10 ⁻³ M); HB : Ca(II), Co(II), Mg(II) (10 ⁻³ M) (Ac-D-Phe)	10,5 6,8		[236]

ТАБЛИЦА 4 (продолжение)

Микроорганизм	Субстратная специфичность		Ингибиторы и активаторы ферментов	рН-Оптимум действия	Ссылки
	гидролизует	не гидролизует			
<i>Micrococcus agilis</i>	Ac-Phe-, -Met, -Val, -Leu, Clac-Phg, -Tyr, -Glu	Ac-Asp, Ac-D-Phe	И : Ag(I) *, Mn(II), Pb(II), Cu(II), Cd(II), Hg(II) ($10^{-3} M$), иодацетамид, ПХМБ, о-фенантролин, меркаптоэтанол	7,0	[241]
<i>Streptomyces tuirus</i> IFO 13418	Ac-D-Phg, -D-Leu, -D-Ala, -D-Met, -D-Val, -D-Phe, -D-Tyr, -D-Trp, -L-Met	L-изомеры	И : Ag(I), Hg(II) ($10^{-5} M$); НВ : NaN ₃ , NaCN	7,5	[242]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ac-L-Glu, Form-L-Glu, фторацетил-L-Glu, пропионил-L-Gly, Ac-L-Gln, -L-Met, -L-Ala, -Gly	бутирил-L-Glu, Mct *, Ac-L-Ser*, -L-Asn*, -L-His *, -L-Asp *	HA : Co(II), Zn(II), Mn(II), Mg(II) ($10^{-3} M$); И : ПХМБ ($10^{-3} M$); НВ : N-этилмалеимид	6,5	[243]
<i>Penicillium vinaceous</i>	Ac-, Clac-L-ароматические аминокислоты	D-изомеры	A: Co(II), ($10^{-3} M$) И: Hg(II), Mn(II)	5,6—5,8 (Ac-амино-кислоты)	[244— 247]
<i>Penicillium oxalicum</i>	diAc-L-Lys, Ac-L-Met, -L-Ala, -L-Glu, -L-Leu *, -L-Val *, -L-isoLeu *, -L-His *, -L-Asp *, Clac-L-Ser, -L-Val *	—	—	7,6—7,8 (Clac-амино-кислоты)	[248— 251]
<i>Aspergillus oryzae</i>	ϵ -Bz- α -Ac-L-Lys **, Clac-, Ac-амино-кислоты	D-изомеры	A: Co(II), Zn(II) *, Cd(II) *, Mn(II) *, Cu(II) * ($10^{-3} M$)	7,5	[252]
<i>Aspergillus avamori</i> 78-2	Ac-Trp, -Met	D-изомеры	—	—	[253]
<i>Streptoverticillium</i>	Ac-L-Met, -L-Leu, -L-Phe, -L-Trp, -L-Phg	D-изомеры	—	7,0	

Обозначения: А—активаторы, И—ингибиторы, НВ—не влияют на активность, НА—необходимы для проявления активности, Form—формил, Clac—хлорацетил, isoLeu—изолейцин, Am-but— α -аминомасляная кислота, Phg— α -аминофенилуксусная кислота (фенилглицин), isoLeu—изолейцин.

* Слабо гидролизуется или активирует.

** Для диацильных производных лизина гидролиз идет только по α -аминогруппе (гидролиз по β -аминогруппе рассмотрен в гл. VI).

У семян всех исследованных растений найдена заметная активность, которая резко возрастает при их прорастании [186, 187].

Из всех растительных ацилаз частично очищены и исследованы только три фермента: из семян рапса [188], из листьев табака [184] и из семян *Palo Verde* (*Parkinsonia Aculeata L.*) [189].

Фермент из семян рапса энантиоселективно гидролизует ацетильные производные ароматических, алифатических аминокислот и метионина, причем *D*-форма не только не подвергается ферментативному расщеплению, но и не оказывает никакого влияния на гидролиз *L*-формы. Ацетильные производные глицина, глутаминовой кислоты и пролина, а также бензоил- и карбобензокси-производные аминокислот устойчивы к действию фермента. pH-Оптимум каталитической активности находится в области 7,2–8,8. Ионы Co(II) активируют ацилазу примерно в 50 раз, ионы Ca(II), Fe(II), Mg(II), Ni(II), Zn(II) — в 10 раз хуже. Активность фермента ингибитирует ПХМБ (*n*-хлормеркурибензоат), о-фенантролин, но 8-оксихинолин и N-этилмалеимид не влияют на каталитическую активность [188].

Из листьев табака выделен и частично очищен фермент с гораздо более узкой субстратной специфичностью, который гидролизовал только N-ацетил-*L*-аргинин, -*L*-цистеин и -*D*, *L*-метионин, и существенно хуже N-формил-*D*, *L*-метионин, pH-Оптимум каталитической активности фермента сдвинут в щелочную область по сравнению с ацилазой I свиной почки и зависит от природы гидролизуемого субстрата. Ионы Co(II) активируют ацилазу из листьев табака, причем степень активации увеличивается в процессе очистки. ПХМБ полностью ингибирует активность фермента в концентрации 0,5 мМ, однако иодацетат (1,5 мМ) и ЭДТА (20 мМ) не влияют на каталитические свойства ацилазы из листьев табака [184].

В семенах *Palo Verde* ацилазная активность сосредоточена преимущественно в зародыше и в семядолях. Обнаруженная ацилаза была очищена примерно в 75 раз и, как оказалось, сильно напоминает по своим свойствам ацилазу, выделенную из семян рапса [189]. Ацилаза из семян *Palo Verde* эффективно расщепляет широкий набор ацетильных и формильных производных ароматических и алифатических аминокислот, причем лучшим субстратом является N-формил-*L*-метионин. Ацильные производные *D*-аминокислот гидролизуются очень слабо. pH-Оптимум каталитической активности зависит от природы гидролизуемого субстрата и расположен в области pH 7,0–9,0. Ионы Co(II) активируют фермент примерно в полтора раза и сильно повышают его стабильность при выделении. В то же время отмечается, что исследованная ацилаза сохраняет свою активность после диализа и электрофореза, т. е., скорее всего, не является металлоферментом, либо ион металла оченьочно связан белковой глобулой. Ацилаза из семян *Palo Verde* так же, как и другие рассмотренные ацилазы, ингибируется под действием SH-реагентов [189].

Рассмотренные ацилазы близки по своим свойствам к ацилазе I свиной почки. Так же как и ацилаза I, они обладают высокой стереоспецифичностью, наиболее эффективно гидролизуют производные метионина, активируются ионами Co(II), чувствительны к действию SH-реагентов. Характерным отличием растительных ацилаз является сдвинутый, по сравнению с ацилазой I, в щелочную область pH-оптимум каталитической активности и тот факт, что растительные ацилазы способны гидролизовать производные не только алифатических, но и ароматических аминокислот. Подобная широкая субстратная специфичность делает возможным использование растительных ацилаз для разделения рацематов аминокислот. Необходимо отметить, однако, что еще более широкие перспективы, уже нашедшие свое практическое воплощение, имеют ацилазы, выделенные из различных микроорганизмов (см. табл. 4).

4. ϵ -N-Ацил-*L*-лизинамидогидролаза

Существует фермент, способный гидролизовать только *L*-изомер при действии на рацемический ϵ -N-ацил-*D*, *L*-лизин (ϵ -N-ацил-*L*-лизинамидогидролаза, КФ 3.5.1.17). Интересно отметить, что в данном случае ϵ -лизинацилаза проявляет стереоспецифичность при гидролизе связи, которая сравнительно далеко удалена от асимметрического центра в молекуле субстрата. Впервые ϵ -лизинацилазная активность была обнаружена у почвенных бактерий КТ 83 [190]. Позднее ϵ -лизинацилазная активность обнаружена у ряда микроорганизмов: плесени, особенно *Aspergillus*, у дрожжей *Rhodotorula glutinis* [191], у бактерий *Achromobacter* и *Pseudomonas*, особенно у *Achromobacter pestifer* [192]. Выяснены оптимальные условия выращивания *Achromobacter pestifer*, как продуцента ϵ -лизинацилазной активности [193], а сам фермент очищен до электрофоретически гомогенного состояния [194]. Фермент гидролизует всевозможные ϵ -ацильные производные лизина: ацетил-, хлорацетил-, ди- и трихлорацетил-, иодацетил-, *n*-бутирил-, *n*-капронил-, *n*-каприлил-, глицил-, бензоил-, фенилацетил-, карбобензокси-, *n*- и *m*-нитробензоил-, нафтоил-производные, однако, ни α -ацил-, ни диацил-*L*-лизин не подвергаются ферментативному гидролизу. Замена атома водорода на алкильную группу в ϵ -NH₂-группе также дает негидролизуемый субстрат [195]. Константы Михаэлиса для гидролиза хлорацетильного, ацетильного и бензоильного ϵ -производных *L*-лизина составляют соответственно 0,29, 0,5 и менее 0,1 mM [196]. Фермент ингибируют ионы Ag(I), Hg(I), Hg(II), ПХМБ, хлорацетон, иодацетат. Ингибирование ПХМБ полностью снимает добавление цистеина. ЭДТА мало влияет, а ионы Fe(III), Al(III) (в концентрации 1 mM) и Ni(II), Co(II), Mn(II), Ca(II), Sr(II), Cd(II) (в концентрации 10 mM) активируют ϵ -лизинацилазу на 20–30%. pH-Оптимум действия фермента из *Achromobacter pestifer* составляет 4,8–5,2, что отличается от ϵ -лизинацилаз из *Pseudomonas* и *Aspergillus oryzae*, для которых он равен соответственно, 6,0 и 8,2–8,4 [197].

В клетках штамма *Pseudomonas* КТ 80 обнаружен фермент, стереоселективно гидролизующий N- δ -ацильные производные орнитина [198], однако этот фермент практически не исследован.

5. Промышленное использование микробных ацилаз

Использование микробных ацилаз для разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы в настоящее время является единственным методом, нашедшим промышленное применение. Поэтому чрезвычайно велик интерес к микроорганизмам, способным гидролизовать N-ацилированные аминокислоты. В табл. 4 собраны имеющиеся в литературе данные по микробным ацилазам [199–253].

Из материала табл. 4 видно, что микробные ацилазы обладают практически неограниченной субстратной специфичностью и гидролизуют всевозможные ацильные производные всех природных аминокислот, кроме пролина, оксипролина и ряда синтетических α -аминокислот. Интересно отметить, что большинство ацилаз обладают выраженной стереоспецифичностью и избирательно гидролизуют лишь ацильные производные *L*-изомеров аминокислот, однако среди мутантов микроорганизмов почвы удалось обнаружить фермент, катализирующий гидролиз ацилированных *D*-аминокислот с достаточно широкой субстратной специфичностью [220, 221, 240]. Наличие ацилаз, стереоспецифичных как к *L*-, так и к *D*-изомерам, позволяет надеяться на возможный выбор схемы процесса разделения рацематов аминокислот в зависимости от того, какой из двух оптических изомеров необходимо получить.

Однако несмотря на очень большое число работ, посвященных условиям культивирования продуцентов фермента, выделению и частичной очистке ацилаз, разработке методик препаративного разделения

Рис. 3. Стабильность и регенерация колонки с иммобилизованной на ДЭАЭ-сепадексе ацилазой из *Aspergillus oryzae*; A — активность

Рис. 4. Промышленная установка разделения рацематов аминокислот на основе ацилазы из *Aspergillus oryzae*, иммобилизованной на ДЭАЭ-сепадексе [283]; 1 — насос, 2 — фильтр, 3 — теплообменник, 4 — реактор, 5 — испаритель, 6 — кристаллизатор, 7 — сепаратор, 8 — рацемизатор

Рис. 5. Относительные затраты (W) при промышленном разделении рацематов аминокислот с помощью ацилазы из *Aspergillus oryzae*, растворимой и иммобилизованной на ДЭАЭ-сепадексе: а — периодический процесс (растворимый фермент), б — непрерывный процесс (иммобилизованный фермент) [283]; затраты на 1 — субстрат, 2 — фермент, 3 — труд, 4 — топливо, 5 — носитель для иммобилизации

Ацетил-*D,L*-аминокислота

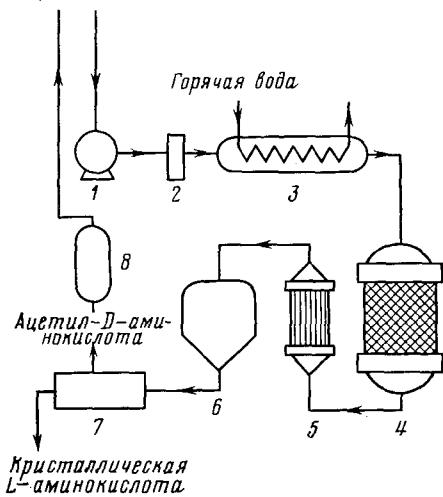


Рис. 4

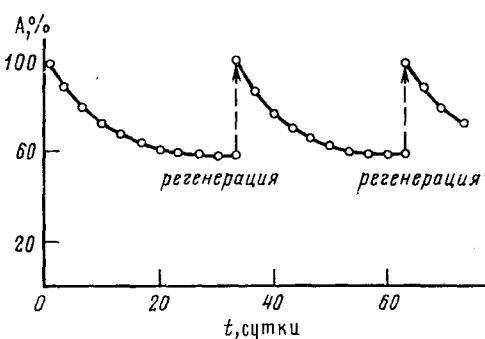


Рис. 3

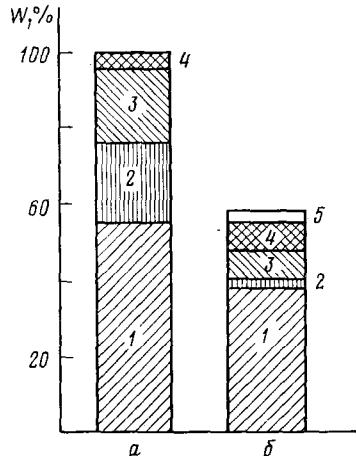


Рис. 5

рацематов с помощью полученных препаратов, иммобилизации ацилаз из микроорганизмов (подробно иммобилизация ацилаз будет рассмотрена ниже) и действию реакторов на основе иммобилизованного фермента, до сих пор ни ацилаза из *Aspergillus oryzae*, ни ацилаза из микроорганизмов почвы не были получены в достаточно чистом виде; ничего не известно также о механизме действия этих ферментов. Несомненно, знание механизма действия способствовало бы более целенаправленному поиску оптимальных условий проведения процесса и выбору вида катализатора для промышленного разделения рацематов с использованием ацилаз микроорганизмов.

В настоящее время запатентован целый ряд методов разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы с помощью растворимых ацилаз микробного происхождения [254—261], однако несомненно, что будущее в этом вопросе принадлежит иммобилизованным ферментам или клеткам.

Широкие технологические возможности применения иммобилизованных биокатализаторов, и в частности ацилаз аминокислот, привели к появлению большого числа работ по иммобилизации ацилазы I свиной почки и особенно ацилаз микроорганизмов. В табл. 5 собраны имею-

ТАБЛИЦА 5

Получение и свойства иммобилизованных ацилаз

Способ иммобилизации, фермент	Сохранение активности, %	Изменение свойств иммобилизованного фермента по сравнению с нативным	Ссылки
Ацилаза I свиной почки			
Адсорбция на ДЭАЭ-сепадексе А-50 на силикагеле или силохроме С-80	— 50 25—45	ПТ сдвиг рН-оптимума на 1 в щелочную область то же	[262] [263, 264]
на силикагеле, покрытом слоем лецитина, холестерина или инозина на ДЭАЭ-целлюлозе	—	—	[264]
на керамических носителях на основе Al_2O_3 , SiO_2 и TiO_2	В	рН-оптимум становится очень широким (7,5—9,5)	[264] [265]
на силохроме, покрытом бедком или синтетическим полимером	15	—	[266, 267]
Пришивка к «Enzastyl-AA»	30	сдвиг рН-оптимума на 0,4 в щелочную область; ПТ	[268]
к силохруму при помощи γ -амино-пропилтриэтиксилана и глутарового альдегида	В	—	[269]
к ДЭАЭ-целлюлозе через триазиновые красители	В	—	[269]
к силохруму через диазотированный <i>m</i> -фенилендиамин	В	—	[269]
амидной связью к нерастворимому полиамиду (сополимер акриламида, метилакрилата и N, N'-метиленбисакриламида)	50—100	ПТ	[270]
растворимыми карбодиимидаами к COOH-содержащим гелям	—	—	[271]
к водорастворимым диальдегидоплексус и диальдегиддекстрону	H	—	[272]
Включение в поликариламидный гель окислительно-восстановительной или фотополимеризацией	6—12	—	[266]
Включение в полакриламидный гель радиополимеризацией	25—45	изменение субстратной специфичности	[273]
Ацилаза из <i>Aspergillus ochraceus</i>			
Ковалентная пришивка к мицелю клеток с помощью альбумина и глутарового альдегида	80	повышение устойчивости к действию ингибиторов; ПТ	[274]
Ацилаза из <i>Aspergillus Oryzae</i>			
Адсорбция на активированном углероде, кислой, нейтральной и щелочной окиси алюминия, силикагеле на танинне, пришитом к аминогексил целлюлозе	<1 20—25		[275] [276]
на ПАБ-целлюлозе	0	сдвиг рН-оптимума на 0,5—1 в кислую область; ПТ	[275, 277, 278]
на ТЭАЭ-целлюлозе	51,5		
на ДЭАЭ-целлюлозе	55,2		
на КМ-сепадексе С-50	0	сдвиг рН-оптимума на 0,5—1 в кислую область; ПТ	
на ДЭАЭ-сепадексе А-25 и А-50	56—59		
на амберлитах IRC-50, IR-4B, IR-45	0	сдвиг рН-оптимума на 0,5—1 в кислую область; ПТ	
Ковалентная пришивка к диазотированной ПАБ-целлюлозе	5,3		[279, 280, 281, 282]
диазотированному ариламиностеклу	43,5		
диазотированному «Enzacryl-AA»	3,6		
азиду КМ-целлюлозы	0		
BrCN-активированной целлюлозе	1,0		

ТАБЛИЦА 5 (продолжение)

Способ иммобилизации, фермент	Сохранение активности, %	Изменение свойств иммобилизованного фермента по сравнению с нативным	Ссылки
BrCN-активированному сефадексу хлорацетилцеллюзое	1,2 11,3	сдвиг рН-оптимума на 0,5—1 в щелочную область; ПТ	
бромацетилцеллюзое иодацетилцеллюзое ариламиностеклу	28,0 39,0 20—40	сдвиг рН-оптимума на 0,5 в кислую область; ПТ	[283]
Сшивка на носителе (АЭ-целлюзое) бифункциональным реагентом			
1,4-дibромбутilenом	0,4		
1,4-дихлорбутilenом	0,4		
дициклогексилкарбодиимидом	1,2		
динодметаном	0,3	—	
глутаровым альдегидом	0,6		
гексаметилендизоцианатом	1,6		
толуолдизоцианатом	0,2		
Сшивка бифункциональным реагентом			[283]
глутаровым альдегидом	14,7	—	
толуолдизоцианатом	1,3	—	
Включение в поликариламидный гель	52,8	сдвиг рН-оптимума на 0,5 в кислую область; ПТ	[284]
Включение в каррагенановый гель	50	ПТ	[285]
Микрокапсулирование			
нейлон	36,0	—	
поликарбамид	15,0	—	[284]
этилцеллюзоза	10,4		

Обозначения. В—высокое, Н—низкое, ПТ—повышение термостабильности.

щиеся в литературе данные по методам получения и свойствам иммобилизованных ацилаз аминокислот [262—285]. Как видно из табл. 5, высокое сохранение активности микробной ацилазы при иммобилизации дают следующие методы: адсорбция на ДЭАЭ- и ТЭАЭ-целлюзое или ДЭАЭ-сефадексе, ковалентная пришивка к диазотированному ариламиностеклу или галогенцеллюзое, пришивка глутаровым альдегидом к ариламиностеклу, включение в поликариламидный гель и микрокапсулирование с использованием нейлона. Однако простота получения, низкая стоимость, высокая операционная стабильность и возможность регенерации сорбции на носителе новой порции фермента, соответствующей потерянной активности [286] (см. рис. 3) делают наиболее пригодным биокатализатором для практического разделения рацематов ацилазу, сорбированную на ДЭАЭ-сефадексе [287]. На основе этого биокатализатора создана промышленная установка для разделения рацематов аланина, метионина, фенилаланина, валина и триптофана (см. рис. 4) [288]. Через колонку емкостью 1000 л с иммобилизованной на ДЭАЭ-сефадексе ацилазой из *Aspergillus oryzae* пропускают 0,2 M раствор ацетил-D, L-метионина, содержащий $5 \cdot 10^{-4}$ M Co(II) при 50° и pH 7,0 со скоростью 2000 л/ч. Свободный L-метионин выпадает в осадок при выпаривании элюата. Выход 91%, $[\alpha]_D^{25} = +23,4^\circ$ после перекристаллизации из воды. Ацетил D-метионин в маточной жидкости нагревают при 60° с уксусным ангидридом для рацемизации, ацетил-D, L-метионин выделяют и вновь используют в качестве субстрата [287].

На рис. 5 приведено сравнение обычного метода с растворимой ацилазой и непрерывного процесса на основе иммобилизованного фермента. Во-первых, резко снижаются затраты на биокатализатор, во-вторых, заметно уменьшаются затраты труда и упрощается процедура очистки, что позволяет получать больше конечного продукта из того же количества исходных веществ. Все вместе взятое позволяет уменьшить вдвое затраты на производство L-аминокислоты при использовании иммобилизованной ацилазы.

Приведенные примеры показывают, что ферментативное превращение рацематов в оптически чистые аминокислоты уже сегодня является

методом, нашедшим свое техногическое вопрошение наряду с другими методами получения этих соединений. Следует отметить, что в настоящее время не существует универсального метода производства всего набора необходимых аминокислот. Поэтому в каждом конкретном случае путь производства той или иной аминокислоты должен определяться индивидуально, в зависимости от сырья, потребности, требований к чистоте, наличия необходимых биокатализаторов и ряда других факторов. Нет, однако, сомнений в том, что биотехнологические процессы с использованием ферментов, энантиоселективно превращающих простейшие производные аминокислот, найдут в сочетании с химическим синтезом исходных соединений еще более широкое применение уже в ближайшем будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nakamura A., Tsutui M. In: *Principles and Applications of Homogeneous catalyses*. New York — Chichester — Brisbane — Toronto: John Wiley and Sons, 1980, ch. 7.
2. Сафонова Э. Н., Беликов В. М. Успехи химии, 1974, т. 43, с. 1575.
3. Coletti A., Brienne M.-J., Jacques J. Chem. Rev., 1980, v. 80, p. 215.
4. Zolotarev Yu. A., Myasoedov N. F., Penkina V. I., Dostovalov I. N., Petrenik O. V., Davankov V. A. J. Chromatogr., 1981, v. 207, p. 231.
5. Ezaki N., Soda K., Kumagai H., Yamada H. Biotechn. Bioeng., 1980, v. 22, suppl. № 1, p. 127.
6. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы/Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартинека. М.: Изд. МГУ, 1976, т. 2, с. 137.
7. Тысячная И. В., Яковлева В. И., Арен А. К. Прикл. биохим. микробиол., 1981, т. 17, с. 645.
8. Тысячная И. В., Яковлева В. И., Куплетская М. Б., Березин И. В. Биохимия, 1979, т. 44, с. 2201.
9. Wolgemuth J. Ber., 1905, B. 38, S. 2064.
10. Kyokawa M. Z. Physiol. Chem., 1933, B. 214, S. 38.
11. Kato K., Kawahara R., Yamamaki Y., Takanashi T., Igurashi S. Яп. Пат. 7612893 (1976); C. A., 1976, v. 85, 78649.
12. Dinelli D., Marconi W., Cecere F., Galli G., Morisi F. Enzyme Eng., 1978, v. 3, p. 477.
13. Gaebl O. H., Keltch A. K. J.. Biol. Chem., 1926, v. 70, p. 763.
14. Linneweh F. Z. Biol., 1930, B. 90, S. 109.
15. Bucherer H. T., Steiner W. J. Pract. Chem., 1934, v. 140, p. 291.
16. Wallach D. P., Grisolia S. J. Biol. Chem., 1957, v. 226, p. 277.
17. Cadie G. S., Bernheim F., Bernheim M. L. C. Ibid., 1949, v. 181, p. 449.
18. Kraicovits F., Coletti-Previero M. A., Previero A. Bioorganic chemistry, 1980, v. 9, p. 248.
19. Cecere F., Galli G., Morisi F. FEBS Letters, 1975, v. 57, p. 192.
20. Yamada H., Takahashi S., Kii Y., Kumagai H. J. Ferment. Technol., 1978, v. 56, p. 484.
21. Esaki N., Soda K., Kumagai H., Yamada H. Ibid., 1978, v. 56, p. 492.
22. Takahashi S., Kii Y., Kumagai H., Yamada H. Biotechn. Bioeng., 1980, v. 22, p. 127.
23. Takahashi S., Ohashi T., Kii Y., Kumagai H., Yamada H. J. Ferment. Technol., 1979, v. 57, p. 328.
24. Yamada H., Simizu S., Shimada H., Tani Y., Takahashi S., Ohashi T. Biochemie, 1980, v. 62, p. 395.
25. Shimizu S., Shimada H., Takahashi S., Ohushi T., Tani Y., Yamada H. Agr. Biol. Chem., 1980, v. 44, p. 2233.
26. Sano K., Yokozeki K., Eguchi C., Kagaka T., Noda I., Mitsugi K. Ibid., 1977, v. 41, p. 819.
27. Sugawa T., Orumura S., Ito T., Katsuya N. Ibid., 1966, v. 30, p. 27.
28. Sano K., Yokozaki K., Tamura F., Yasuda N., Noda I., Mitsugi K. Appl. Envir. Microbiol., 1977, v. 34, p. 806.
29. Sano K., Mitsugi K. Agr. Biol. Chem., 1978, v. 42, p. 2315.
30. Fukumura T. Ibid., 1977, v. 41, p. 1321.
31. Fukumura T., Talbot G., Misono H., Teramura Y., Kato K., Soda K. FEBS Letters, 1978, v. 89, p. 298.
32. Sano K., Natsuda K., Yamada K., Mitsugi K. Яп. пат. 156995 (1977); C. A., 1978, v. 88, 168486.
33. Fukumura T. Яп. пат. 7425190 (1974); C. A., 1974, v. 81, 62117.
34. Fukumura T. Яп. пат. 7425191 (1974); C. A., 1974, v. 81, 76466.
35. Fukumura T. Agr. Biol. Chem., 1976, v. 40, p. 1687.
36. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Козлова Е. В., Казлаускас Д. А., Паулюконис А. Б. Тезисы докл. Всесоюзн. совещания «Аминокислоты для сельского хозяйства, пищевой промышленности, здравоохранения и научных исследований», Фрунзе, 1981, с. 38.
37. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Козлова Е. В., Казлаускас Д. А., Ческис Б. И., Старкувене Б. П. Тезисы докл. IV Всесоюзн. конференции «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Рига, 1982, т. 1, с. 150.

38. Fukumura T. *Plant Cell. Physiol.*, 1977, v. 18, p. 1173.
39. Казлаускас Д. А., Паулюконис А. Б., Вайткявичюс А. К., Гальвидас И. Ю. Тезисы докл. Всесоюзн. семинара «Перспективы применения полиферментных систем в народном хозяйстве». Неринга, 1980, ч. 2, с. 28.
40. Fukumura T. *Agr. Biol. Chem.*, 1977, v. 41, p. 1509.
41. Ehrlich F. *Biochem. Z.* 1906, B. 1, S. 8.
42. Ehrlich F., Wendel A. *Ibid.*, 1908, B. 8, S. 438.
43. Ehrlich F. *Ibid.*, 1914, B. 63, S. 379.
44. Stumpf P. K., Green D. E. *J. Biol. Chem.*, 1944, v. 153, p. 113.
45. Camien M. N., McCrure L. E., Dunn M. S. *Arch. Biochem.*, 1950, v. 28, p. 220.
46. Neuberger A., Sanger F. *Biochem. J.*, 1943, v. 37, p. 515.
47. Mizushima S., Sakaguchi K.-I. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1956, v. 20, p. 131.
48. Duschinsky R., Yeanneret J. *Compt. rend.*, 1939, v. 208, p. 1359.
49. Stetten M. R., Schwenheimer R. J. *Biol. Chem.*, 1944, v. 153, p. 113.
50. Leller E. A., Maritz A. *Helv. Chim. Acta*, 1945, v. 28, p. 365.
51. Leller E. A., Maritz A. *Ibid.*, 1944, v. 27, p. 1888.
52. Birnbaum S. M., Greenstein J. P. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, v. 39, p. 108.
53. Parikh J. R., Greenstein J. P., Winits M., Birnbaum S. M. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, v. 80, p. 953.
54. Zeller E. A. *Advances in Enzymology*, 1948, v. 8, p. 459.
55. Meister A., Levintow L., Kingsley R. B., Greenstein J. P. *J. Biol. Chem.* 1951, v. 192, p. 535.
56. Carpenter F. H. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, v. 82, p. 1111.
57. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, с. 99.
58. Bergman M., Fraenkel-Contrat H. *J. Biol. Chem.*, 1938, v. 124, p. 1.
59. Fruton J. S., Irving G. W., Bergman M. *Ibid.*, 1940, v. 133, p. 703.
60. Behrens O. K., Doherty D. G., Bergman M. *Ibid.*, 1940, v. 133, p. 61.
61. Albertson N. F. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1951, v. 73, p. 452.
62. Bennet E. L., Niemann C. *Ibid.*, 1950, v. 72, p. 1798.
63. Shuller W. H., Niemann C. *Ibid.*, 1951, v. 73, p. 1644.
64. Milne H. B., Stevens C. *Ibid.*, 1950, v. 72, p. 1742.
65. Murachi T. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, v. 61, p. 468.
66. Niemann C., Rapport M. M. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1946, v. 68, p. 1671.
67. Milne J. R., Beng C.-H. *Ibid.*, 1957, v. 79, p. 645.
68. Mohrig J. R., Shapiro S. M. *J. Chem. Educ.*, 1976, v. 53, p. 586.
69. Borsook H., Deasy C. L., Haagen-Smit A. J., Keighley G., Lowy P. H. *J. Biol. Chem.*, 1948, v. 176, p. 1383.
70. Dekker C. A., Fruton J. S. *Ibid.*, 1948, v. 173, p. 471.
71. Hanson H. T., Smith E. L. *Ibid.*, 1949, v. 179, p. 815.
72. Luisi P. L., Saltman R., Vlach D., Guarnacia K. J. *Molec. Catalys.*, 1977, v. 2, p. 133.
73. Isawa Y., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1977, v. 50, p. 2762.
74. Carty R. P., Kirschenbaum D. M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, v. 110, p. 399.
75. Gawron O., Alaid A. J., Bogle R. E., Odstrchel G. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, v. 95, p. 203.
76. Oka T., Morihara K. *J. Biochem.*, 1977, v. 82, p. 1055.
77. Morihara K., Oka T. *Biochem. J.*, 1977, v. 163, p. 531.
78. Fastrez J., Fersht A. R. *Biochemistry*, 1973, v. 12, p. 2025.
79. Каганов И. А., Орехович В. Н. Докл. АН СССР, 1954, т. 95, с. 1259.
80. Марголин А. Л., Швядас В. К. Тезисы докл. II Всесоюзн. симпозиума «Получение и применение иммобилизованных ферментов», Абоян, 1977, с. 34.
81. Hasegawa M., Matsubara I. *Agr. Biol. Chem.*, 1978, v. 42, p. 383.
82. Козлов Л. В., Дьяченко Е. Д., Антонов В. К. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, с. 105.
83. Антонов В. К., Гинодман Л. М., Гурова А. Г. *Молекулярная биология*, 1977, т. 11, с. 1160.
84. Jencks W. P., Caplow M., Gilchrist M., Kullen R. G. *Biochemistry*, 1963, v. 2, p. 1313.
85. Dobry A., Fruton J. S., Sturtevant J. M. *J. Biol. Chem.*, 1952, v. 195, p. 149.
86. Мартинек К., Клибанов А. М., Самохин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, с. 696.
87. Karupe A., Kasche I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 80, p. 955.
88. Введение в прикладную энзимологию/Под ред. И. В. Березина, К. Мартинека. М.: Изд. МГУ, 1982, гл. XI, с. 215.
89. Wong C.-H., Chen S.-T., Wang K.-T. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, v. 576, p. 247.
90. Anderson G., Luisi P. L. *Helv. Chim. Acta*, 1979, v. 62, p. 488.
91. Flegmann A. W., Tattersall R. J. *Mol. Evol.*, 1979, v. 12, p. 349.
92. Warburg O. *Z. physiol. Chem.*, 1906, B. 48, S. 205.
93. Brenner M., Kocher V. *Experientia*, 1948, v. 4, p. 73.
94. Brenner M., Kocher V. *Helv. Chim. Acta*, 1949, v. 32, p. 333.
95. Brenner M., Muller H. R., Pfister R. W. *Ibid.*, 1950, v. 35, p. 568.
96. Wretlind K. A. *J. Acta Physiol. Scand.*, 1950, v. 20, p. 1.
97. Chibata I., Yamada S., Yamada S. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1957, v. 21, p. 62.
98. Wretlind K. A. *J. J. Biol. Chem.*, 1950, v. 186, p. 221.
99. Wretlind K. A. *J. Acta Chem. Scand.*, 1952, p. 6.
100. Рабинович П. И., Прийдорогин Н. Л., Губерниев М. А. Докл. АН СССР, 1952, т. 85, с. 117.

101. Benoiton N. L., Tong J. H. Y., D'Iorio A., Petitclerc C. Пат. США 3813317 (1974); С. А., 1973, в. 78, 43976.
102. Matta M. S., Kelly J. A., Ronde M. F. Пат. США 3878043 (1975); С. А., 1975, в. 83, 164578.
103. Березин И. В., Мартинек К. В кн.: Основы физической химии ферментативного катализа, М.: Высшая школа, 1977, с. 126.
104. Johnson P. E., Stewart J. A. Arch. Biochem. Biophys., 1972, в. 149, р. 295.
105. Kerdy F. J., Jindal S. P., Bender M. L. J. Biol. Chem., 1972, в. 247, р. 5746.
106. Клесов А. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 1512.
107. Mura H., Bauer C. J. Theor. Biol., 1978, в. 75, р. 181.
108. Галаев И. Ю., Швядас В. К. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Методы получения высокоочищенных ферментов», Вильнюс, 1978, с. 119.
109. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Березин И. В. Биохимия, 1980, т. 45, с. 629.
110. Del Castillo L. M., Nieto Z., Arce E., Inei-Shizukawa G., Gruz M. T., Castaneda-Agullo M. Biochim. Biophys. Acta, 1971, в. 235, р. 358.
111. Tong J. H., Petitclerc C., D'Iorio A., Benoiton N. L. Canad. J. Biochem., 1971, в. 49, р. 877.
112. Ямков И. А., Тихонова Т. В., Даванков В. А. Биоорган. химия, 1979, т. 5, с. 113.
113. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Иванов А. Е., Березин И. В. Биохимия, 1980, т. 45, с. 829.
114. Steits T. A., Henderson R., Blow D. M. J. Mol. Biol., 1969, в. 46, р. 377.
115. Birktoft J. J., Mathews B. W., Blow D. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, в. 36, р. 131.
116. Heur G. E., McGriff R. B., Niemann C. J. Amer. Chem. Soc., 1960, в. 82, р. 1830.
117. Ingles D. W., Knowles J. R. Biochem. J., 1967, в. 104, р. 369.
118. Rapp J. R., Niemann C., Hein G. E. Biochemistry, 1966, в. 5, р. 4100.
119. Conen S. G., Vaidya V. M., Schultz R. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, в. 66, р. 249.
120. Dupraix A., Beihet J. J. FEBS Letters, 1973, в. 34, р. 185.
121. Silver M. S., Matta S. M. Arch. Biochem. Biophys., 1972, в. 151, р. 62.
122. Hay R. W., Porter L. J., Morris P. J. Austral. J. Chem., 1966, в. 19, р. 1197.
123. Conley N. L., Martin R. B. J. Phys. Chem., 1965, в. 69, р. 2914.
124. Bell R. P., Collor B. A. J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1964, в. 60, р. 1087.
125. Robson M. Nature, 1965, в. 208, р. 265.
126. Галаев И. Ю., Иванов А. Е., Швядас В. К. Тезисы докл. IV Всесоюзн. конференции «Методы получения и анализа биохимических препаратов», Рига, ч. 1, с. 34.
127. Галаев И. Ю. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук, М.: МГУ, 1979.
128. Yamskov I. A., Tikhonova T. V., Davankov V. A. Enzyme Microb. Technol., 1981, в. 3, р. 137, 141.
129. Галаев И. Ю., Швядас В. К. Тезисы докл. Всесоюзн. симпоз. «Химия протеолитических ферментов», Углич, 1979, с. 85.
130. Bauer C.-A. Biochemistry, 1978, в. 17, р. 375.
131. Bauer C.-A. Biochim. Biophys. Acta, 1976, в. 438, р. 495.
132. Yamamoto T., Izumiya N. Arch. Biochem. Biophys., 1967, в. 120, р. 497.
133. Wright C. S. J. Mol. Biol., 1972, в. 67, р. 151.
134. Morihara K., Oka T., Tetzuki V. Arch. Biochem. Biophys. 1970, в. 138, р. 515.
135. Thompson R. C., Blout E. R. Biochemistry, 1973, в. 12, р. 57.
136. Ямков И. А., Тихонова Т. В., Даванков В. А. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Химия протеолитических ферментов», Углич, 1979, с. 88.
137. Даванков В. А. Тезисы докл. Всесоюзн. совещания «Аминокислоты для сельского хозяйства, пищевой промышленности, здравоохранения и научных исследований». Фрунзе, 1981, с. 63.
138. Kameda Y., Yanamoto S. Chem. Pharm. Bull., 1971, в. 19, р. 2423.
139. Kameda Y., Toyama E., Matsui K. Ann. Rept. Fac. Pharm. Kanzaka Univ., 1955, в. 5, р. 12.
140. Smorodinzev I. A. Z. Physiol. Chem., 1922, B. 124, S. 123.
141. Mori T. J. Biochem., 1939, в. 29, р. 225.
142. Nawa K. Ibid., 1938, в. 28, р. 237.
143. Neuberg C., Linhard K. Biochem. Z., 1924, B. 147, S. 372.
144. Neuberg C., Mandl L. Enzymologia, 1950, в. 14, р. 128.
145. Гринштейн Дж., Винц М. В кн.: Химия аминокислот и пептидов, М.: Мир, 1965, с. 63.
146. Moravcsik E., Teleghi J., Indos H., Komives K., Otvos L. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 1977, в. 12, р. 399.
147. Szewczuk A., Szczechlik K. Clin. Chim. Acta, 1971, в. 33, р. 309.
148. Slowinska R., Sobiech K. A. Ziomek E., Szewczuk A. Chemical Abstracts, 1978, в. 89, № 39992.
149. Birnbaum S. M., Levintow L., Kingsley R. B., Greenstein J. P. J. Biol. Chem., 1952, в. 194, р. 455.
150. Rao K. P., Birnbaum S. M., Kingsley R. B., Greenstein J. P. Ibid., 1952, в. 198, р. 507.
151. Endo Y. FEBS Letters, 1978, в. 95, р. 281.
152. Endo Y. Biochim. Biophys. Acta, 1978, в. 523, р. 207.
153. Grisolía S., Reglero A., Rivas J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, в. 77, р. 237.

154. Grade W., Brown J. L. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 662, p. 86.
155. Grade W., Brown J. L. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 5012.
156. Ци Чжен-у, Орехович В. М. Биохимия, 1958, т. 23, с. 772.
157. Bruns F. U., Schulze C. Biochem. Z., 1962, B. 336, S. 162.
158. Kördel W., Schneider F. Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 445, p. 446.
159. Kördel W., Schneider F. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1976, B. 357, S. 1109.
160. Frey G., Kördel W., Schneider F. Z. Naturforsch. 1977, B. 32c, S. 769.
161. Kördel W., Schneider F. Ibid., 1977, B. 32c, S. 337.
162. Marshall R. M., Birnbaum S. M., Greenstein J. P. J. Amer. Chem. Soc., 1956, v. 78, p. 4636.
163. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Галстян И. А., Березин И. В. Биохимия, 1980, т. 45, с. 1151.
164. Kördel W., Schneider F. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1975, v. 356, p. 915.
165. Ötvos L., Moravcsik E., Mady G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, v. 44, p. 1056.
166. Falor P. J., Price V. E., Greenstein J. P. J. Biol. Chem., 1950, v. 182, p. 467.
167. Fu S. C. J., Birnbaum S. M., Greenstein J. P. J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, p. 6054.
168. Чухрай Е. С., Лавченко Д. Я. Вестн. Моск. ун-та, Химия, 1980, т. 21, с. 232.
169. Чухрай Е. С., Лавченко Д. Я., Арен А. К., Полторак О. М. Там же, 1979, т. 20, с. 118.
170. Galaev I. Yu., Svedas V. K. Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 701, p. 389.
171. Спирчев В. Б., Щукина Л. А. Ж. общ. химии, 1958, т. 28, с. 1709.
172. Спирчев В. Б., Ци Чжен-у, Орехович В. Н., Щукина Л. А. Биохимия, 1958, т. 23, с. 895.
173. Орехович В. Н., Щукина Л. А., Ци Чжен-у, Спирчев В. Б. Там же, 1959, т. 24, с. 667.
174. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Березин И. В. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, с. 19.
175. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Березин И. В. Авт. свид. СССР, № 640181 (1978); Бюл. изобр., 1978, № 48, с. 150.
176. Svedas V. K., Galaev I. Yu., Borisov I. L., Berezin I. V. Anal. Biochem., 1980, v. 101, p. 188.
177. Галаев И. Ю., Швядас В. К., Арен А. К., Березин И. В. Прикл. биохим. микробиол., 1980, т. 16, с. 281.
178. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Березин И. В. Биохимия, 1980, т. 45, с. 1833.
179. Wandrey C., Flushol E., Schügerl K. Biotechnol. Bioeng., 1979, v. 21, p. 1649.
180. Svedas V. K., Margolin A. L., Berezin I. V. Enzyme Engineering, Future Directions/Eds. Wingard L. B., Berezin I. V., Klyosov A. A., New York — London: Plenum Press, 1980, p. 257.
181. Швядас В. К., Галаев И. Ю. Тезисы докл. II Всесоюзного симпозиума «Получение и применение иммобилизованных ферментов». Абовян, 1977, с. 119.
182. Shvjadash V. K., Margolin A. L., Galaev I. J., Berezin I. V. Proceedings of the Third Joint US/USSR Enzyme Engineering Seminar of the US/USSR Joint Working Group on the Production of Substances by Microbiological Means, 1976, p. 679.
183. Fones W. S., Lee M. J. Biol. Chem., 1953, v. 201, p. 847.
184. Pierpoint G. Phytochemistry, 1973, v. 12, p. 2359.
185. Chibata I., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 1959, v. 23, p. 370.
186. Ozaki K., Wetter J. Canad. J. Biochem. Physiol., 1960, v. 38, p. 929.
187. Lugay J. C., Aronson J. N. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, v. 27, p. 437.
188. Ozaki K., Wetter J. Canad. J. Biochem. Physiol., 1961, v. 39, p. 843.
189. Lugay J. C., Aronson J. N. Biochem. Biophys. Acta, 1969, v. 191, p. 397.
190. Kameda Y., Toyoura E., Kimura Y., Matsui K. Chem. Pharm. Bull., 1958, v. 6, p. 394.
191. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 1960, v. 24, p. 31, 37.
192. Ishikawa T., Tosa T., Chibata I. Ibid., 1962, v. 26, p. 43.
193. Ishikawa T., Tosa T., Chibata I. Ibid., 1962, v. 26, p. 193.
194. Ishikawa T., Tosa T., Chibata I. Ibid., 1962, v. 26, p. 412.
195. Chibata I., Ishikawa T. Arch. Biochem. Biophys., 1964, v. 104, p. 231.
196. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Methods in Enzymology, 1970, v. 19, p. 756.
197. Ishikawa T., Tosa T., Chibata I. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 1962, v. 26, p. 581.
198. Kameda Y., Matsui K. Chem. Pharm. Bull., 1967, v. 15, p. 1573.
199. Yokote Y., Kusiro H., Kuto S., Noguti Y. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1969, v. 43, p. 250.
200. Ли Жу-шан. Микробиология, 1957, т. 26, с. 271.
201. Хачатуров А. А., Савченко Р. А. Биол. ж. Арmenии, 1970, т. 23, с. 40.
202. Hanson H., Fritzsche M., Iwig K. Acta biol. med. german., 1969, v. 22, p. 507.
203. Mineura K., Tonaka M. Nippon Nogei Kugaky Kaishi, 1963, v. 42, p. 36.
204. Fry K. T., Lamberg M. R. J. Mol. Biol., 1967, v. 28, p. 423.
205. Vogel H. J., Bonner D. M. J. Biol. Chem., 1956, v. 218, p. 97.
206. Rossi D., Lucente G., Romeo A. Experientia, 1977, v. 33, p. 1557.
207. Lucente G., Romeo A., Rossi D. Ibid., 1965, v. 21, p. 317.
208. Chibata I., Kisumi M., Yamada S. Bull. Agr. Chem., 1958, v. 22, p. 24.
209. Rossi D., Romeo A., Lucente G. Farmacol. Ed. Sci., 1973, v. 28, p. 262.
210. Matsumoto J., Nagai S. J. Biochem., 1972, v. 72, p. 269.
211. Nagai S., Matsumoto J. Ibid., 1964, v. 56, p. 465.
212. Nagai S. J. Biochem., 1961, v. 50, p. 428.
213. Kameda Y., Toyoura E. J. Pharm. Soc. Japan, 1952, v. 72, p. 400, 402.
214. Chibata I., Ishikawa T. Bull. Agr. Chem., 1958, v. 22, p. 218.

215. Ohmura E., Hayashi O. J. Biol. Chem., 1957, v. 227, p. 181.
216. Levy C. C., Goldman P. Ibid., 1968, v. 243, p. 3507.
217. Goldman P., Levy C. C. Biochem. Pharmacol., 1968, v. 17, p. 2265.
218. Levy C. C., Goldman P. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, p. 4467.
219. Goldman P., Levy C. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1967, v. 58, p. 1299.
220. Kameda Y., Toyoura E., Kimura Y., Matsui K., Kawasaki T. Yakugakky Zasshi, 1958, v. 78, p. 748, 754, 759, 763, 765, 767, 769.
221. Kameda T., Toyoura E., Kimura Y. Nature, 1958, v. 181, p. 1225.
222. Kameda Y. Яп. пат. 5909 (1962); С. А., 1963, v. 58, 9602.
223. Kameda Y. Яп. пат. 11660 (1962); С. А., 1963, v. 58, 14667.
224. Kameda Y., Toyoura E., Kimura Y., Ohsumi Y. Chem. Pharm. Bull., 1958, v. 6, p. 321.
225. Kameda Y., Toyoura E., Matsui K. Chem. Pharm. Bull., 1958, v. 6, p. 441.
226. Kameda Y., Toyoura E., Kimura Y., Okino B. Ibid., 1958, v. 6, p. 395.
227. Kameda Y., Matsui K., Kimura Y., Toyoura E. Ibid., 1962, v. 10, p. 1146.
228. Kimura Y. Ibid., 1962, v. 10, p. 1154.
229. Kameda Y. Яп. пат. 11815 (1962); С. А., 1963, v. 58, 14667.
230. Kameda Y. Яп. пат. 11662 (1962); С. А., 1963, v. 58, 14668.
231. Kameda Y., Toyoura E., Matsui K. Chem. Pharm. Bull., 1959, v. 7, p. 702.
232. Kameda Y., Toyoura E., Takeuchi E. Ibid., 1962, v. 10, p. 827.
233. Kimura Y., Toyoura E., Tatsuoka S. Яп. пат. 4863 (1963); С. А., 1963, v. 59, 5739.
234. Kameda Y., Toyoura E., Matsui K., Kimura Y., Kitagawa S. Nature, 1958, v. 182, p. 453.
235. Kameda Y., Ishii Y. Chem. Pharm. Bull., 1962, v. 10, p. 1152.
236. Toyoura E. Yakugakky Zasshi, 1960, v. 80, p. 362.
237. Kameda Y., Omori T. Chem. Pharm. Bull., 1962, v. 10, p. 831.
238. Kameda Y., Kuramoto T., Matsui K., Ebata T. Ibid., 1968, v. 16, p. 1023.
239. Kameda Y., Hase T., Kanatomo S., Mizaki K. Ibid., 1978, v. 26, p. 2710.
240. Kameda Y., Hase T., Kanatomo S., Kita Y. Ibid., 1978, v. 26, p. 2698.
241. Szwajcer E., Szewczuk A., Mordarski M. Chemical Abstracts, 1980, v. 93, № 109537.
242. Suyie M., Suzuki H. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1980, v. 44, p. 1089.
243. Früh H., Leisinger T. J. Gen. Microbiol., 1981, v. 125, p. 1.
244. Michi K., Nonaka A. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1954, v. 18, p. 346.
245. Michi K., Nonaka A. Bull. Agr. Chem., 1955, v. 19, p. 153.
246. Michi K., Nonaka A. Ibid., 1957, v. 21, p. 18.
247. Michi K., Tsuda H. J. Biochem., 1958, v. 45, p. 745.
248. Chibata I., Ishikawa T., Yamada S. Bull. Agr. Chem., 1957, v. 21, p. 304.
249. Chibata I., Watanabe A., Yamada S. Ibid., 1957, v. 21, p. 291, 296.
250. Лобарева Л. С., Соловьева Т. А., Лапук Я. И., Люблинская Л. А., Степанов В. М. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Методы получения высокоочищенных ферментов». Вильнюс, 1978, с. 83.
251. Лобарева Л. С., Малинка М. К., Лапук Я. И., Люблинская Л. А. Тезисы докл. II Всесоюзн. симпозиума «Химия протеолитических ферментов», Углич, 1979, с. 57.
252. Евтихов П. Н., Молодова Г. А. Прикл. биохим. микробиол., 1970, т. 6, с. 341.
253. Скворцова Е. Е., Ныс П. С., Галаев И. Ю., Швядас В. К., Савицкая Е. М. Биохимия, в печати.
254. Neuberg C., Mandl L. Пат. США 2511867 (1950); С. А., 1950, v. 44, 8365.
255. Matsuda H. Яп. пат. 17799 (1961); С. А., 1962, v. 57, 3561.
256. Parcell R. F. Пат. США 3669837 (1972); С. А., 1972, v. 77, 99656.
257. Левитов М. М., Савицкая Е. М., Ныс П. С., Булычева М. С., Петюшенко Р. М., Коровкин В. И., Ребекин И. А., Кашковская Л. К. Авт. свид. СССР № 487940 (1975); Бюл. изобр., 1975, № 38, с. 68.
258. Bamberg P., Sjoberg B. O. Н. Пат. США 3838008 (1974); С. А., 1970, v. 73, 121582.
259. Asai S., Tubira T., Tsuchiya E., Tuzuke H. Пат. США 3841966 (1974); С. А., 1974, v. 80, 133822.
260. Usuki T., Takahashi M., Noda M., Kamachiya Y., Wakamatsu H. Пат. США 3907638 (1975); С. А., 1975, v. 82, 58110.
261. Kimura Y., Nakamura U. Яп. пат. 107481 (1978); С. А., 1979, v. 90, 101961.
262. Johansen B., Syhre R., Berger R. J. Labelled Compounds, 1972, v. 8, p. 475.
263. Арен А. К., Калис В. Э., Лауценце Д. Я., Микельсоне З. В., Кукуран Д. Я., Фелднере В. А., Сполите Д. Я., Полторак О. М., Чухрай Е. С. Авт. свид. СССР № 523892 (1976); Бюл. изобр., 1976, № 29, с. 65.
264. Лауценце Д. Я., Отваре Р. В., Даия Д. Я., Арен А. К., Полторак О. М., Чухрай Е. С. Труды V биохимической конференции Прибалтийских республик и Белоруссии, Таллин, 1976, т. II, с. 62.
265. Weetall H. H., Detar C. C. Biotechn. Bioeng., 1974, v. 16, p. 1537.
266. Аруниш Х. Я., Кестнер А. И. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Методы получения высокоочищенных ферментов», Вильнюс, 1978, с. 115.
267. Лауценце Д. Я., Арен А. К., Чухрай Е. С., Полторак О. М. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Методы получения высокоочищенных ферментов», Вильнюс, 1978, с. 133.
268. Barth T., Maskova H. Collect. Czech. Chem. Commun., 1971, v. 36, p. 2398.
269. Стадзиня И. Г., Розина И. П., Калис В. Э., Арен А. К. Труды V биохимической конференции Прибалтийских республик и Белоруссии, Таллин, 1976, т. II, с. 51.
270. Ohno Y., Stahman P. Macromolecules, 1971, v. 4, p. 350.
271. Szajani B., Ivony K., Boross L. Magy. Kem. folyoirat, 1980, v. 86, p. 350.

272. Fleming Ch., Gabert A., Roth P., Wand H. Acta biol. med. german., 1973, v. 31, p. 449.
273. Кальюала Х. Я., Кестнер А. И. Труды V биохимической конференции Прибалтийских республик и Белоруссии. Таллин, 1976, т. II, с. 70.
274. Hirano K.-J., Karube I., Suzuki S. Biotechn. Bioeng., 1977, v. 19, p. 311.
275. Tosa T., Mori T., Chibata I. Enzymologia, 1966, v. 31, p. 214, 225.
276. Watanabe T., Mori T., Tosa T., Chibata I. Biotechn. Bioeng., 1979, v. 21, p. 477.
277. Tosa T., Mori T., Chibata I. Agr. Biol. Chem., 1969, v. 33, p. 1053.
278. Tosa T., Mori T., Chibata I. Enzymologia, 1971, v. 40, p. 49.
279. Chibata I., Tosa T., Sato T., Mori T. Пат. США 3816254 (1974); С. А., 1971, v. 75, 150334.
280. Sato T., Mori T., Tosa T., Chibata I. Arch. Biochem. Biophys., 1971, v. 147, p. 788.
281. Yokote Y., Fujita M., Chimura G., Noguchi S., Kimura K., Samejima H. J. Solid-Phase. Biochem., 1976, v. 1, p. 1.
282. Yokote Y., Fujita M., Shimura G., Noguchi S., Kimura K., Samejima H. Agr. Biol. Chem., 1975, v. 39, p. 1545.
283. Chibata I., Tosa T., Sato T., Mori T., Matuo Y. Proc. Int. Ferment. Symp. IV Ferment. Technol. Today, 1972, p. 383.
284. Mori T., Sato T., Tosa T., Chibata I. Enzymologia, 1972, v. 43, p. 213.
285. Tosa T., Sato T., Mori T., Yamamoto K., Takata I., Nishida Y., Chibata I. Biotechn. Bioeng., 1979, v. 21, p. 1697.
286. Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I. Agr. Biol. Chem., 1969, v. 32, p. 1047.
287. Chibata I., Tosa T. Appl. Biochem. Bioeng., 1976, v. 1, p. 329.
288. Chibata I. Hind. Antibiot. Bull., 1979, v. 20, p. 58.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова