

УДК 577.15.02

КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕОБРАТИМОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Метелица Д. И., Еремин А. Н.

Критически рассмотрены способы кинетического описания и механизмы термической инактивации белков (ферментов) в различных средах — водных растворах, обращенных мицеллах поверхностно-активных веществ и микросомальных мембранах. Сопоставлены эффективные кинетические константы, вычисленные по уравнению первого порядка и приближенными методами в соответствии с ассоциативно-диссоциативной схемой. Для ферментов различных классов проанализирована зависимость эффективных констант скорости инактивации от температуры и обсуждены причины отклонения таких зависимостей от уравнения Аррениуса. Проанализировано влияние полиолов и детергентов на стабильность ферментов и их модифицированных форм. Сопоставлены и обсуждены активационные термодинамические параметры термоинактивации (ΔH^* , ΔS^* и ΔG^*) различных ферментов в разных средах. Даны рекомендации по количественному описанию термостабильности белков (ферментов) в реальных условиях их применения.

Библиография — 138 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1921
II. Способы кинетической характеристики инактивации белков	1922
III. Кинетические особенности инактивации ферментов в разных средах	1930
IV. Влияние полиолов и детергентов на стабильность ферментов в растворах	1937
V. Температурная зависимость констант скорости инактивации ферментов и физико-химический смысл активационных термодинамических параметров этого процесса	1941
VI. Заключение	1944

I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время достигнуты большие успехи в изучении строения и принципов структурной организации белков [1]. Однако проблема установления взаимосвязи между структурой и стабильностью биомолекул остается одной из незавершенных задач современной биофизической химии [2]. Хорошо известно, что изменения конформации белков сказываются на их спектральных и многих других физико-химических характеристиках [1–3]. Иногда эти характеристики не «замечают» малых, но только на первый взгляд несущественных конформационных трансформаций белков. Довольно часто незначительные изменения структуры активного центра биомолекул оказывают существенное влияние на их стабильность и функциональную активность. Изучение потери стабильности и активности белков имеет фундаментальное значение для современной энзимологии, биоорганической химии и смежных дисциплин. С другой стороны, без знания основных структурных факторов, определяющих стабильность белковых молекул в средах разной природы, невозможно решение практических задач стабилизации биологически важных полимеров. Необходимость решения этой задачи диктуется развитием современной биотехнологии и инженерной энзимологии, требующих проведения многих ферментативных процессов в жестких условиях, т. е. при повышенных температурах, воздействии примесей органических растворителей, в водных средах с экстремальными значениями pH, в присутствии детергентов разной природы и т. д.

Современная биотехнология требует точных количественных характеристик стабильности биополимеров. Многочисленные данные, полученные в разных условиях, из-за отсутствия четкой количественной об-

работки часто невозможно сравнить между собой и тем более использовать при расчетах ферментных реакторов, сроков годности биопрепаратов и т. д. Особенно важна количественная характеристика стабильности биополимеров в условиях их практического применения, т. е. в водных средах, в присутствии органических растворителей, детергентов, денатурирующих добавок, стабилизирующих веществ, и в иммобилизованном состоянии.

Интерес к инаktivации и реактивации белков и ферментов проявился очень давно [4, 5] и до сих пор эта многоплановая проблема остается в центре внимания специалистов разных профилей [3, 6—23]. Разные стороны денатурации и инаktivации биополимеров рассмотрены в монографиях [3, 7—11, 14, 16, 18], обзорных статьях [12, 13, 15, 17, 21, 22] и учебниках [1, 2]. Строение белков и роль конформационных изменений в процессах их денатурации подробно освещаются в руководствах [1—3, 9—11]. Термодинамика процессов обратимой и необратимой денатурации рассмотрена в работах [3, 7, 12]. Методы изучения процессов денатурации белков и ферментов подробно описаны в руководствах Жоли [3] и Кушнера [11]. Биологические аспекты стабильности мультферментных комплексов и других биополимеров отражены в [11], а кинетические аспекты этой проблемы — в монографии [16]. Основные пути стабилизации ферментов рассмотрены в работах [13—15, 19, 22], проблемам реактивации биокатализаторов посвящены обзоры [20, 21]. Общие закономерности изменения термостабильности белков и ферментов после химической модификации их функциональных групп рассмотрены в обзоре [22], а соотношение термодинамических и кинетических факторов в стабилизации иммобилизованных белков — в работе [23].

Обширный и далеко неполный литературный материал, упомянутый выше, на наш взгляд, недостаточно отражает, а иногда и не затрагивает многие важные кинетические аспекты необратимой инаktivации ферментов. Понимая стабильность ферментов как функцию их структуры, которая во многом зависит от окружения, и руководствуясь уже упомянутыми фундаментальными и практическими задачами, мы поставили в настоящем обзоре несколько конкретных целей: 1) рассмотреть способы быстрой и корректной характеристики скорости процессов инаktivации ферментов в реальных условиях их применения; 2) используя эти способы, дать количественную характеристику термостабильности ряда ферментов (лизоцим, лактат-, малат- и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, пероксидаза хрена, каталаза) и белков (миоглобин, цитохром b_5); 3) на конкретных примерах сравнить термостабильность ферментов в водных растворах и обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях (пероксидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, цитохромы b_5 и P-450), а также в водных растворах и пассивных биологических мембранах (цитохром P-450); 4) проанализировать закономерности стабилизирующего действия на ферменты полислов и детергентов разной природы; 5) критически рассмотреть термодинамические активационные характеристики необратимой инаktivации белков в разных условиях и возможности их связи со структурой биополимеров и окружением.

II. СПОСОБЫ КИНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИНАКТИВАЦИИ БЕЛКОВ

В литературе часто понятие «инаktivация» неправильно подменяется термином «денатурация». Инаktivация всегда связана с потерей функциональной активности белка или фермента и может быть обусловлена рядом причин, не вызывающих денатурацию биополимера. Термин инаktivация много шире, чем денатурация. Постараемся четко определить эти понятия. Анализ различных определений денатурации биополимеров приведен в работе [11]. В результате автор обосновал наиболее правильное, на наш взгляд, определение этого процесса, что денатурация — это конформационное изменение биологической макромолекулы, приводящее к необратимой или обратимой утрате ею способности к выполнению определенной биологической функции. Денатурация может быть вызвана физическими и химическими факторами (нагревание,

ультразвук, облучение, экстремальные значения pH), сопровождать процессы агрегации белков, диссоциации субъединичных биомакромолекул на мономеры, тиолдисульфидный обмен и расщепление связей S—S, а также быть результатом иммобилизации и химической модификации функциональных групп биополимера [3, 11, 20—23]. Считается, что процесс денатурации не сопровождается разрывом ковалентных связей полимерной цепи биомакромолекулы [1—3, 11, 13, 14]. Денатурация белка всегда приводит к его инактивации. Однако причинами инактивации могут стать факторы, не вызывающие конформационных, т. е. денатурационных последствий: например, взаимодействие макромолекул друг с другом, или модификация функционально важных групп, не изменяющая конформации биополимера в целом [20, 21]. Таким образом, инактивацией биомакромолекулы можно считать любое изменение, приводящее к необратимой или обратимой утрате определенной биологической функции.

Равновесный процесс «нативный белок (нат) \rightleftharpoons инактивированный белок» (ин) может быть охарактеризован константой равновесия $K = [\text{ин}]/[\text{нат}]$, где [ин] и [нат] — равновесные концентрации инактивированной и нативной форм соответственно. В том случае, если белок находится в сильно разбавленном растворе, константа равновесия K может быть связана с характеристиками равновесной инактивации — энтальпией ΔH и энтропией ΔS — соотношением:

$$-\ln K = \Delta G/RT = \Delta H/RT - \Delta S/R$$

Величину ΔH можно определить по уравнению Вант-Гоффа при условии, что ΔH и ΔS не зависят от температуры:

$$-[d \ln K/d(1/T)] = \Delta H/R$$

В настоящее время различными методами измерены значения ΔH и ΔS для процессов обратимой инактивации множества белков. Для определения этих термодинамических характеристик измеряют константы равновесия между нативной и денатурированной формами или находят теплоту денатурации методом сканирующей микрокалориметрии [12]. Свободные таблицы этих данных можно найти в монографиях и обзорах [1—3, 7, 10—12].

При рассмотрении необратимых процессов инактивации белков (ферментов) особенно важен экспериментальный критерий проверки необратимости. Необратимо инактивированными следует считать те белки, которые изменили функциональную активность так, что после снятия воздействия исходный уровень функциональной активности не восстанавливается в течение длительного времени [20]. Некоторая неопределенность этого понятия связана с произвольностью в выборе времени, после которого исходная функциональная активность белка не восстанавливается.

Природа необратимой инактивации может быть как термодинамической, так и кинетической (рис. 1) [20, 21]. В первом случае свободная энергия стабилизации белка $\Delta G_{\text{ин}} = G_{\text{ин}} - G_{\text{нат}}$ больше нуля, а свободная энергия его дестабилизации $\Delta G = -\Delta G_{\text{ин}} < 0$. Белок не может быть реактивирован, так как свободная энергия нативной формы характеризуется локальным минимумом, в то время как свободная энергия инактивированной формы — глобальным минимумом (рис. 1, а). В случае кинетической необратимости белок из нативного состояния с глобальным минимумом свободной энергии переходит в инактивированное состояние с локальным минимумом Гиббсовой энергии: в этом случае свободная энергия стабилизации белка $\Delta G_{\text{ин}} < 0$, а энергия его дестабилизации $\Delta G = -\Delta G_{\text{ин}} > 0$. Два состояния разделены высоким активационным барьером, который препятствует быстрой реактивации белка (рис. 1, б). Практическое разделение термодинамической и кинетической необратимости при инактивации белков — сложная проблема, пути решения которой только намечаются [23]. Задачей данного обзора не является анализ вкладов в термодинамические параметры ΔG , ΔH и ΔS различ-

ных по своей природе сил и рассмотрение данных по обратимой инактивации белков, так как это сделано ранее в монографии [3] и обзорах [12, 17, 22].

При необратимой инактивации кинетическую стабильность белков принято характеризовать константой скорости $k_{ин}$, которую обычно определяют по изменению свойств белков методами флуоресценции, электронной и КД-спектроскопии или по изменению активности. В общем случае сохранение активности биокатализатора не всегда соответствует сохранению целостности всей белковой глобулы [22]. Если справедлив один из постулатов теории абсолютных скоростей реакции, который гласит, что скорость достижения равновесия между реагентами и активированным комплексом много больше скорости самой химической реакции, то эта теория может быть применена к процессам инактивации белков [3, 6]. Согласно Эйрингу [6] для молекулярных реакций

$$k_{ин} = (kT/h) \exp(-\Delta G^*/RT) = (kT/h) e^{\Delta S^*/R} e^{-\Delta H^*/RT} \quad (1)$$

где k — константа Больцмана, h — постоянная Планка, ΔG^* , ΔH^* и ΔS^* — увеличение свободной энергии, энтальпии и энтропии при образовании активированного комплекса. Изменение энтальпии активации связано с энергией активации соотношением: $\Delta H^* = E_{акт} - RT$.

Однако уже в самых ранних работах, полный обзор которых можно найти в монографии [3], было показано, что не для всех ферментов и не при всех условиях процесс необратимой инактивации может быть описан

кинетическим уравнением первого порядка. Часто кинетика инактивации ферментов не подчиняется закону первого порядка с начала процесса или не описывается этим законом при проведении инактивации белков до значительных глубин. Чаще всего уравнение первого порядка неприменимо для описания инактивации субъединичных ферментов в буферных растворах [24—33]. Как показано в работах [24—32], при инактивации щелочной фосфатазы [31], почечной ацилазы [29] и глюкозооксидазы [26, 27] эти субъединичные ферменты диссоциируют на мономеры, которые затем необратимо инактивируются. Диссоциация фермента на субъединицы наблюдается также при инактивации глицеринальдегид-3-фос-

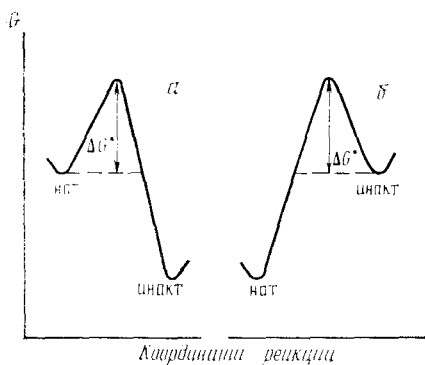


Рис. 1. Энергетическая диаграмма возможных путей процесса (а — термодинамический, б — кинетический) необратимой инактивации белка [20, 21]

фатдегидрогеназы [34], каталазы [35, 36] и многих других белков с четвертичной структурой [20, 21, 37—39]. Появление субъединиц в процессе инактивации ферментов подтверждается методами гель-электрофореза [26, 27, 29, 34] или седиментации [36]. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что процесс инактивации субъединичных ферментов в самом простом случае может быть описан схемой [24—33]:



где E — нативный фермент, A — его обратимо денатурированная форма, которая частично сохраняет каталитическую активность, или субъединица олигомерного фермента, I — необратимо инактивированная форма белка, лишенная ферментативной активности. Для многих ферментов схема инактивации может быть гораздо сложнее, так как процесс включает не одну, а несколько обратимых стадий, что сильно затрудняет его кинетическое описание. Например, в присутствии ионов Mg^{2+} или Zn^{2+}

щелочная фосфатаза образует тетрамеры, которые инактивируются по трехстадийному диссоциативному механизму [31]:



В схеме (3) каталитически активны тетрамеры E_4 и димеры E_2 , мономеры E неактивны, а форма I необратимо денатурирована. Имеются указания на то, что в ферментном процессе каталитически активными являются только димеры щелочной фосфатазы E_2 [40]. Диссоциативный механизм инактивации многих субъединичных белков не является неожиданным, так как отражает их сложную структурную организацию и ту важную роль, которую играют в функционировании олигомерного белка структурные уровни разных порядков.

На первый взгляд удивительно, что сравнительно простые мономерные белки, например лизоцим, обнаруживают сложную картину инактивации как в растворе, так и в кристаллическом состоянии: при pH 3—7 термическая инактивация лизоцима представляет собой двухступенчатый обратимый процесс [41], который соответствует схеме (2). Ступенчатый характер тепловой денатурации лизоцима подтвержден изменением оптической плотности его растворов в интервале температур 20—90° С. При 60—70° С происходят конформационные изменения лизоцима в растворе, сопровождающиеся уменьшением содержания α -спиралей от 30 до $\sim 10\%$. Конформационные переходы лизоцима в растворе между 20 и 30° С обнаружены и методом ЯМР ^{13}C [43]. Инактивация лизоцима ультразвуком в интервале 20—80° показала, что фермент претерпевает несколько конформационных переходов, включая тот, что имеет место при $\sim 30^\circ\text{C}$ [44]. Изучение термической денатурации лизоцима в слабо щелочных растворах методами флуоресценции [45] и кругового дихроизма [46] подтвердило справедливость схемы (2) для этого фермента. В первой обратимой стадии инактивации лизоцима α -спиральная структура белка меняется мало, но во второй необратимой стадии наблюдается ее полное нарушение на участке 5—15 полипептидной цепи и понижения остатка Glu-35, что сильно дестабилизирует прилегающие α -спирали. Нами получены данные о максимальной скорости инактивации белка в растворе при pH 6,5, которые подтверждают важную роль Glu-35 в необратимой инактивации фермента [47], так как $pK_a \approx 6,5$ в молекуле лизоцима имеет только остаток Glu-35, локализованный в области активного центра [48, 49].

Мы рассмотрели две причины отклонения инактивации ферментов от кинетического закона первого порядка — субъединичную природу многих белков и сложный стадийный характер инактивации мономерных белков. При исследовании инактивации ферментов в биологических мембранах кинетика процесса еще более усложняется участием в нем изоэнзимов одного и того же фермента или разных конформеров одной и той же формы белка. Так обстоит дело с инактивацией цитохрома Р-450 в микросомальных мембранах [50]. Гетерогенность цитохрома Р-450 в микросомах печени приводит к тому, что на полулогарифмических анаморфозах кинетических кривых наблюдается излом, отражающий инактивацию разных форм или разных конформеров цитохрома Р-450 (рис. 2). В этом случае изменение концентрации каталитически активного цитохрома во времени описывается суммой двух экспонент. Константа скорости $k_{\text{ин}}$, определяемая графически для первой фазы процесса из полулогарифмической анаморфозы кинетической кривой, приближается к ее истинному значению при условии, что скорость инактивации во второй фазе на много меньше, чем в первой.

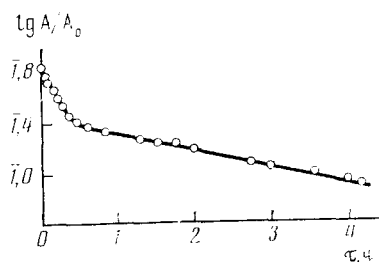


Рис. 2. Полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой инактивации цитохрома Р-450 в микросомах печени кролика при 52° С в трис-НСl буфере с pH 7,54 [50]

Еще одной причиной усложнения кинетики инактивации мономерных белков является их ассоциация (агрегация) в буферных растворах [3, 20, 21, 51]. Как правило, инактивация с образованием агрегатов описывается двустадийной кинетической схемой [51]: $E \rightleftharpoons D \rightarrow I$, в которой E — нативная, D — денатурированная и I — инактивированная форма (агрегат). Как видим, формально эта схема не отличается от схемы (2).

Рассмотрение обширного экспериментального материала по инактивации мономерных и олигомерных (субъединичных) белков привело авторов работы [33] к выводу, что инактивация всех белков может быть описана общей формальной схемой, которая совпадает со схемой (2). Первая обратимая стадия отражает для субъединичных белков их диссоциацию, а для мономерных — конформационные изменения (денатурацию). Наличие первой обратимой стадии в обоих случаях приводит к тому, что на кинетических кривых инактивации ферментов, снятых в низкотемпературной области, возникают изломы, т. е. эти кривые не описываются уравнением первого порядка во всем временном интервале [24—32]. Положение изломов зависит от начальной концентрации белка в растворе [24—31].

Полная кинетическая характеристика процесса инактивации белка (схема (2)) предполагает определение констант скорости прямых (k_1 и k_2) обратной (k_{-1}) реакции, константы равновесия между нативным ферментом E и его денатурированной формой A ($K = k_1/k_{-1}$), а также выражение в интегральной форме концентрации E и A в определенный момент времени. Анализ схемы (2) (при начальных условиях $t=0$, $[E]_0 = a$, $[A]_0 = [I]_0 = 0$) дает следующие выражения для текущих концентраций E и A [52]:

$$E = a \left\{ \frac{\lambda_2 - k_1^{-1}k_2}{\lambda_2(\lambda_2 - \lambda_3)} e^{-\lambda_2 k_1 t} + \frac{k_1^{-1}k_2 - \lambda_3}{\lambda_3(\lambda_2 - \lambda_3)} e^{-\lambda_3 k_1 t} \right\}$$

$$[A] = a/\lambda_2 - \lambda_3 \cdot (e^{-k_1 \lambda_2 t} - e^{k_1 \lambda_3 t}), \text{ где } \lambda_2 = 1/2(\alpha + \beta);$$

$$\lambda_3 = 1/2(\alpha - \beta); \alpha = 1 + k_{-1}/k_1 + k_2/k_1; \beta = [\alpha^2 - 4k_2/k_1]^{1/2}$$

Как видим, текущие концентрации форм белка E и A описываются весьма сложными уравнениями. Заметим, что на практике часто невозможно контролировать концентрацию форм белка A и I и обычно следят лишь за расходом исходного фермента E .

Система уравнений, описывающих схему (2) и другие подобные схемы, нелинейна и не имеет аналитического решения [30, 32]. Поэтому Полтораки, Чухрай и соавт. в цикле исследований [24—32], детально рассмотрев кинетические особенности инактивации олигомерных ферментов, предложили несколько способов приближенного решения системы уравнений для определения кинетических констант k_1 , k_{-1} , k_2 и константы диссоциации субъединичных ферментов K . Один из вариантов приближенного решения позволяет получить значения констант скорости диссоциации олигомерного белка из уравнения [31, 32]:

$$2(v/v_0) - 1/2(v/v_0)^2 = 3/2 - k_1 t \quad (4)$$

где v_0 и v — скорости инактивации белка в начальный момент и после времени t , которое не должно превышать время τ , соответствующее излому на графике зависимости $\ln v$ от t . Во втором варианте приближенного описания кинетики инактивации субъединичных ферментов используется уравнение [30—32]:

$$(1/t) \ln v/v_0 = -k_1 + (1/3)k_1^2 k_{-1} [E]_0 t^2 \quad (5)$$

в котором $[E]_0$ — начальная концентрация фермента и время t также должно быть меньше τ . Линеаризация кинетических кривых инактивации с помощью уравнения (5) позволяет вычислить не только константу скорости k_1 , но и константу скорости обратной реакции k_{-1} , а затем и константу диссоциации субъединичных белков на мономеры или димеры в случае термической трансформации тетрамерного белка. Уравнения (4) и (5) успешно использованы для кинетической характеристики про-

цессов инактивации почечной ацилазы [29], щелочной фосфатазы [31] и некоторых других олигомерных белков.

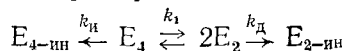
Таким образом, корректное кинетическое описание инактивации ферментов при произвольном выборе начальной концентрации сводится к непростому анализу кинетических кривых, так как их полулогарифмические анаморфозы имеют изломы, а эффективные константы скорости $k_{ин}$, вычисляемые с помощью таких анаморфоз, как правило, представляют собой функции начальной концентрации белка, и, следовательно, в строгом смысле не являются константами. Поэтому приходится искать пути приближенного решения системы уравнений, описывающих ассоциативно-диссоциативную схему (2), чтобы найти простые способы линеаризации кинетических зависимостей.

Означает ли это, что не может быть случаев, когда кинетические кривые термoinактивации ферментов линеаризуются в координатах $\ln v-t$? На наш взгляд не означает, так как на практике реализованы такие условия инактивации белков, когда обратимый процесс диссоциации субъединичного фермента или первая обратимая стадия конформационного превращения мономерного белка сведены к минимуму или отсутствуют совсем.

Первый случай. Субъединичный фермент обработан буфункциональными реагентами и его обратимая диссоциация на мономеры затруднена [14, 15, 29, 34]. Например, модифицированная глутаровым альдегидом почечная ацилаза инактивируется по закону первого порядка, так как стадия обратимой диссоциации фермента практически исключена [29]. В этом случае на полулогарифмических анаморфозах кинетических кривых отсутствуют какие-либо изломы при проведении инактивации до весьма значительных глубин.

Второй случай. Диссоциация субъединичного фермента на мономеры происходит по механизму «все или ничего» и сопровождается полной потерей каталитической функции. В качестве примера приведем диссоциацию на мономеры тетрамерной каталазы в кислых и щелочных средах [35], при обработке денатурирующими агентами [53, 54], в ходе лиофилизации [55] и в результате сукцинилирования белка янтарным ангидридом [36]. Независимо от того, каким образом иницирована диссоциация каталазы, этот процесс сопровождается потерей каталазной активности, а его кинетика подчиняется закону первого порядка даже при больших степенях инактивации [35, 36, 56].

Третий случай. Диссоциация субъединичного белка на мономеры является лимитирующей стадией всего процесса инактивации. При изучении НАД-зависимой гидрогеназы обоснована диссоциативная схема термoinактивации этого тетрамерного белка [38]:



где $k_{и}$ и k_d — константы скорости инактивации и денатурации.

Авторы [38] показали, что скорость инактивации фермента определяется диссоциацией тетрамера на димеры. Поэтому полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых потери активности гидрогеназы не имеют изломов до значительных глубин инактивации белка. В случае мономерных белков также возможны маршруты инактивации, в которых весь процесс лимитирует первая стадия. Такие примеры будут приведены в дальнейшем.

Четвертый случай. Инактивация белка проводится в сильно разбавленных растворах, когда затруднена или сведена к минимуму ассоциация субъединиц фермента или агрегация мономерного белка. В этом случае, при условии, что лимитирующей стадией всего процесса является первая прямая реакция (см. схему (2)), кинетика инактивации будет подчиняться закону первого порядка и полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых не должны иметь каких-либо изломов.

Далее мы рассмотрим особенности кинетики инактивации белков, превращения которых в разных условиях изучены в нашей лаборатории [35, 36, 47, 50, 56—70]. Среди них имеются мономерные (лиозим [47],

Активационные термодинамические параметры необратимой инактивации ферментов в разных средах

Фермент	Условия инактивации	Δt^a	$E_{\text{акт}}$, ккал/моль	$t^\circ \text{C}$	ΔH^* , ккал/моль	ΔS^* , ккал/моль	ΔG^* , ккал/моль	Ссылки
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	0,1 М NaOH-глициновый буфер, pH 9,1	23—46	4,34; 131,40	25 45	3,75; 130,80	—70,20; 341,00	24,66; 22,40	[57]
КФ 1. 1. 1. 49	Обращенные мицеллы; 0,1 М АОТ ^в , 0,1 М Тритона X-45, 12% 0,1 М NaOH-глицинового буфера, pH 9,1	23—46	19,40; 61,42	25 45	18,80; 60,80	—18,15; 118,80	24,20; 23,02	[57]
Лизоцим, КФ 3. 2. 1. 17	0,067 М фосфатный буфер, pH 6,2	20—80	24,20	37	23,60	—7,50	25,90	[47]
Лактатдегидрогеназа, КФ 1. 1. 1. 27	0,1 М фосфатный буфер, pH 8,2	20—60	6,40; 44,60	25 37	5,81 44,00	—60,06 63,50	23,70 24,40	[58]
Малатдегидрогеназа, КФ 1. 1. 1. 37	0,1 М фосфатный буфер, pH 8,2	20—52	43,00	37	42,40	63,60	22,70	[58,59]
Миоглобин из сердца кашалота	0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4 тот же буфер с холатом натрия тот же буфер с Твином 20 и 15% глицерина	46—71	17,70	25	17,10	—	—	[60]
		22—37	17,10	25	16,50	—22,60	23,20	[60]
		30—46	31,80	25	31,20	—24,00	24,00	[60]
Каталаза, КФ 1. 11. 1. 6 Конъюгат каталазы со строфан- тином	0,1 М фосфатный буфер, pH 6,6 тот же буфер	20—45	14,60	40	14,00	—30,20	23,43	[56]
		20—45	22,80	40	22,20	—4,20	23,50	[56]
Субъединицы каталазы	0,1 М фосфатный буфер, pH 3,28	22—40	14,70	37	14,10	—23,50	21,40	[35]
Сукцинилированная каталаза	0,1 М цитратно-ацетатный буфер, pH 6,0	31—65	15,50	—	—	—	—	[36]

Пероксидаза хрена КФ 1. 11. 1. 7	0,1 М цитратно-ацетатный буфер, pH 6,0	37—53	19,90	45	19,20	—14,90	24,00	[61]
Конъюгат пероксидазы со строфантином	тот же буфер	37—53	20,60	45	19,90	—12,80	24,00	[61]
Пероксидаза хрена	0,05 М фосфат-цитратный буфер, pH 7,0 обращенные мицеллы: 0,2 М АОТ, 6% 3 мМ фосфат-цитратного буфера, pH 4,6 обращенные мицеллы; 0,1 М АОТ, 0,1 М Тритона X-45, 6% того же буфера, pH 4,0	45—80 26—50; 50—60 19—55; 55—66	47,40 26,40; 62,20 5,30; 62,40	45 45; 50,5 45	46,77 25,77; 61,56 4,67	64,71 6,33; 122,60 —61,42	26,19 23,76; 21,90 24,20	[62] [57,62] [57,62]
Цитохром b_5 из печени кролика	0,05 М трис- H_3PO_4 буфер, pH 7,5 с 15% глицерина	50—62	4,80	50,5	4,16	—63,84	24,80	[63]
	обращенные мицеллы: 0,25 М АОТ, 4,5% того же буфера	32—39	2,00	37	1,39	—71,75	23,63	[63]
	обращенные мицеллы: 0,13 М АОТ, 0,13 М Тритона X-45, 4,5% того же буфера	31—37	6,60	37	6,00	—54,74	23,00	[63]
Цитохром P-450 ЛМ-2, КФ 1. 14. 14. 1	0,05 М трис-HCl буфер, pH 7,54 с 20% глицерина	40—58	23,50	45	22,86	—7,25	25,17	[50]
Цитохром P-450, иммобилизо- ванный на полиамиде	тот же буфер	40—58	22,40	45	21,76	—8,47	24,46	[50]
Цитохром P-450 в микросомах	0,05 М фосфатный буфер, pH 7,33 с глице- рином от 0 до 4,1 М	45—54	111,0—54,0	50,4	110,0—53,0	280,0—89,0	19,70—24,80	[64,65]
	0,05 М трис-HCl буфер, pH 6,88 с глицери- ном от 0 до 4,1 М	45—54	110,0—98,0	50,5	109,0—97,0	265,0—220,0	23,80—26,20	[64,65]

^a ΔI — Интервал температур; ^б — значения температур, при которых вычислены термодинамические параметры; ^в АОТ — Аэрозоль ОТ (натриевая соль ди-(2-этил)-гексилового эфира сульфоянтарной кислоты); пары активационных параметров приведены в тех случаях, когда температурные зависимости констант имеют излом на графиках Аррениуса.

миоглобин [60], цитохром b_5 [63, 69], пероксидаза хрена [61, 62], цитохром Р-450 ЛМ-2 [50, 64, 66—69]) и субъединичные биополимеры (лактатдегидрогеназа [58], малатдегидрогеназа [59], каталаза [35, 36, 56]). Термическая инактивация всех перечисленных белков была изучена в буферных растворах, а некоторые из них (пероксидазы [57, 62], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [57], цитохрома b_5 [68, 69], цитохрома Р-450 ЛМ-2 [66—69]) — в обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях. В биомембранах (микросомы печени) изучена термическая инактивация интегрального мембранного фермента цитохрома Р-450 ЛМ-2 [50, 64, 65]. Среди исследованных объектов имеются водорастворимые (лизоцим, пероксидаза, каталаза, миоглобин, дегидрогеназы) и гидрофобные биополимеры (цитохромы b_5 и Р-450), а также модифицированные ферменты — сукцинированная каталаза [36], конъюгаты строфантина К с пероксидазой [61] и каталазой [56]. Выбор этих объектов исследования определяется не только фундаментальными задачами, но и широким использованием большинства из них в практике [71—73]. Изученные нами белки, условия и температурные интервалы их инактивации, а также активационные термодинамические параметры приведены в табл. 1.

Мы ограничились количественным рассмотрением данных, полученных только в нашей лаборатории, хотя табл. 1 можно было бы дополнить результатами исследований других групп в нашей стране [14, 15, 19, 20—34, 74, 75] и за рубежом [17, 76—80]. Такое ограничение круга рассмотренных кинетических исследований термоинактивации белков (ферментов) обусловлено следующими причинами: во-первых, данные других авторов были обобщены и критически рассмотрены ранее [14, 15, 19—22] или в процессе работы над настоящим обзором [74, 75] и, по нашему мнению, не нуждаются в повторном анализе; во-вторых, часто количественные характеристики термоинактивации получены разными авторами в разных условиях, так что иногда затруднительно установить начальные концентрации белков, подвергаемых термоинактивации. Это приводит к противоречивым результатам при соотнесении эффективных кинетических констант с определенными стадиями изученных процессов инактивации и реактивации белков, проанализированных, например, в недавно вышедшей монографии [81]. Анализ кинетических констант термоинактивации белков без их соотнесения с начальными концентрациями инактивируемых объектов, как будет показано ниже, некорректен и может привести к ошибочным заключениям о характере и механизме термоинактивации биополимеров. Поэтому мы ограничились количественным рассмотрением собственных данных, так как анализируемые нами результаты получены в контролируемых условиях, которые можно легко сопоставить для разных объектов в различных средах.

III. КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИНАКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТОВ В РАЗНЫХ СРЕДАХ

1. Кинетика инактивации ферментов в водных средах

Лизоцим (КФ 3.2.1.17) инактивируется в соответствии со схемой (2) [41, 44—47]. При концентрациях белка 0,14—5,48 мкМ (в интервале температур 40—70°С) константа скорости первого порядка зависит от начальной концентрации (рис. 3). Эта зависимость описывается уравнением

$$k_{ин} = k_0 \exp(-\alpha[E]_0) \quad (6)$$

где $[E]_0$ — начальная концентрация белка, k_0 — константа скорости инактивации при бесконечном разбавлении белка, не зависящая от $[E]_0$, α — коэффициент, зависящий от температуры и имеющий размерность обратной концентрации [47]. Изменение α в зависимости от температуры (см. рис. 3) описывается уравнением:

$$\alpha = \alpha_0(1 - \gamma/T) \quad (7)$$

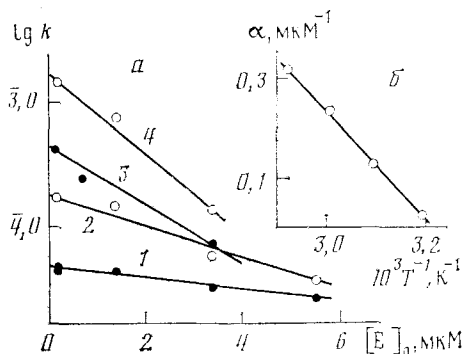


Рис. 3

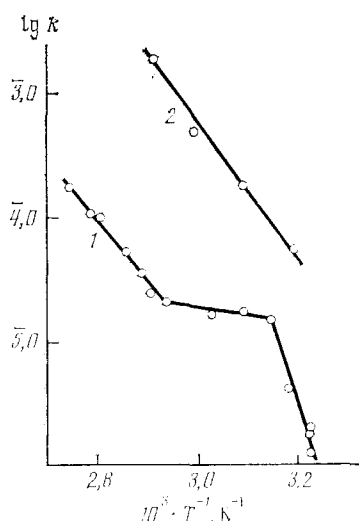


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость эффективных констант скорости инактивации лизоцима от его начальной концентрации при различных температурах (°C): 1 — 40, 2 — 50, 3 — 60, 4 — 70 (а); зависимость коэффициента α от температуры (б) [47]

Рис. 4. Зависимость от температуры констант скорости инактивации лизоцима при концентрации 0.20 мг/мл (1) и при бесконечном разбавлении фермента (2) [47]

Температурная зависимость эффективных констант скорости инактивации $k_{ин}$ при больших концентрациях лизоцима характеризуется изломами на графике Аррениуса (рис. 4), в то время как температурная зависимость констант скорости k_0 , полученных экстраполяцией $k_{ин}$ к нулевой концентрации белка, не обнаруживает их (рис. 4, прямая 2). Из рис. 4 (прямая 2) можно найти $E_{акт}$ и выражение константы скорости в общем виде [47]:

$$k_0 = 4,0 \cdot 10^{11} \exp(-24\,200/RT) \quad (8)$$

Из уравнений (6) — (8) получаем общее выражение эффективной константы скорости $k_{ин}$ [47]:

$$k_{ин} = 4,0 \cdot 10^{11} \cdot \exp\{-24\,200/RT - \alpha_0(1 - \gamma/T[E]_0)\} \quad (9)$$

Видно, что температурная зависимость $k_{ин}$ не описывается законом Аррениуса, так как $k_{ин}$ зависит не только от температуры, но и от концентрации белка $[E]_0$. Корректной кинетической константой, характеризующей инактивацию лизоцима, может быть только k_0 , так как она не зависит от концентрации белка в растворе.

Малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37) инактивируется по схеме, аналогичной (2): $E_2 \xrightleftharpoons{k_1} 2E \xrightarrow{k_d} E_d$, в которой E_2 — димер, E — субъединица фермента, k_1 — константа скорости диссоциации димера, k_d — константа скорости денатурации субъединицы [59]. При произвольно выбранной концентрации белка константы скорости инактивации $k_{ин}$, вычисленные из полулогарифмических апаморфоз кинетических кривых уменьшения активности фермента, зависят от начальной концентрации димера (рис. 5) [59]:

$$k_{ин} = k_0 / (1 + \alpha k_0 [E_2]_0) \quad (10)$$

где k_0 — константа скорости инактивации белка при бесконечном разбавлении, а α — постоянная величина, зависящая от температуры и имеющая размерность обратной скорости $M^{-1} \cdot c$. Температурная зависимость констант скорости инактивации малатдегидрогеназы k_0 (см. рис. 5) описывается уравнением [59]:

$$k_0 = 1,42 \cdot 10^{27} \cdot \exp(-43\,000/RT) \quad (11)$$

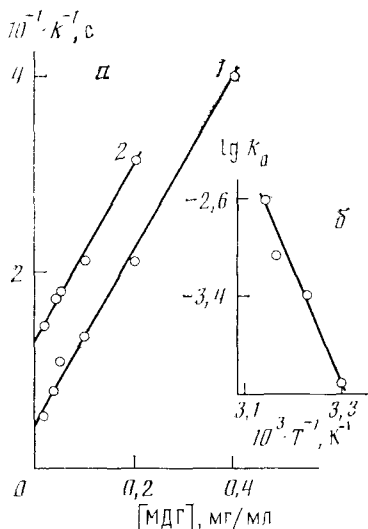


Рис. 5. а — зависимость эффективных констант скорости термической инактивации малатдегидрогеназы (МДГ) от начальной концентрации фермента при 45° С (1) и 43° С (2); б — температурная зависимость констант скорости инактивации малатдегидрогеназы k_0 , соответствующих бесконечному разбавлению белка [59]

Температурный ход эффективных констант скорости $k_{ин}$ не описывается уравнением Аррениуса, так как они зависят от температуры, концентрации фермента и коэффициента α .

Интересно сравнить значения эффективных констант скорости $k_{ин}$, вычисленных при разных начальных концентрациях белка и температурах, с константами скорости k_1 (см. схему инактивации, приведенную выше), рассчитанными по формуле (4) [31, 32]. В табл. 2 сопоставлены $k_{ин}$ и k_1 в различных условиях. При низких концентрациях фермента обе константы мало отличаются, однако с увеличением концентрации малатдегидрогеназы в 5 раз, разница между ними становится существенной. Мы считаем совпадение величин $k_{ин}$ и k_1 при малых концентрациях белка не случайным. Стадия диссоциации димеров фермента является лимитирующим звеном его инактивации, а обратная реакция реассоциации субъединиц малатдегидрогеназы при малых концентрациях фермента затруднена или не происходит совсем. Нельзя исключить также, что инактивацию лимитируют конформационные изменения димера, происходящие еще до его диссоциации на субъединицы.

Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) — тетрамерный фермент, инактивация которого может быть описана несколькими схемами с последовательной диссоциацией на димеры и мономеры [58]. В интервале температур 20—60° С эффективная константа скорости инактивации зависит от начальной концентрации тетрамера E_4 . Эта зависимость описывается уравнением (10), в котором концентрация димера E_2 заменена на концентрацию тетрамера E_4 . В интервале 35—60° С температурная зависи-

Таблица 2

Константы скорости инактивации малатдегидрогеназы (МДГ) ($k_{ин}$), вычисленные из зависимостей $\lg \tau$ — время [59], и константы скорости k_1 , вычисленные по уравнению (4) [31, 32]

[МДГ] ₀ =0,01 мг/мл			[МДГ] ₀ =0,05 мг/мл		
$t^\circ \text{C}$	$10^4 \cdot k_{ин}, \text{с}^{-1}$	$10^4 \cdot k_1, \text{с}^{-1}$	$t^\circ \text{C}$	$10^5 \cdot k_{ин}, \text{с}^{-1}$	$10^5 \cdot k_1, \text{с}^{-1}$
20	0,128	0,139	28	0,798	1,670
25	0,294	0,278	30	3,220	2,900
26,5	0,319	0,296	34	10,01	9,52
28	0,437	0,389	37	11,70	12,30
30	0,511	0,407	38	11,80	12,50
34	0,766	0,714	40	19,30	17,20
37	1,440	1,480	43,5	69,00	62,50
40	2,920	3,180	46	115,00	105,00
45	9,590	9,170	49	478,00	400,00

мость k_0 подчиняется уравнению [58]:

$$k_0 = 1,30 \cdot 10^{27} \cdot \exp(-44\,600/RT) \quad (12)$$

Ниже 35°C $E_{\text{акт}}$ снижается до 6,40 ккал/моль.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) из печени быка. Диссоциация фермента подчиняется принципу «все или ничего»: $E_i \xrightleftharpoons{k_1} 4E$ [53, 54]. Субъединицы фермента лишены каталазной активности [35, 36, 53, 55]. Константа диссоциации каталазы на субъединицы k_1 сильно зависит от pH и описывается в кислых и щелочных средах уравнениями (13) и (14) соответственно [35]:

$$k_1 = 5,0 \cdot 10^7 \cdot [H^+]^{2,3} \quad (13)$$

$$k_1 = 5,0 \cdot [H^+]^{-1,4} \quad (14)$$

В 0,1 М фосфатном буфере с pH 6,6 при температурах $20-45^\circ\text{C}$ термоинаktivация каталазы (изученная по потере ее каталитической активности в окислении этанола гидроперекисью кумила) характеризуется $E_{\text{акт}} = 14,6$ ккал/моль. После ее модифицирования 11 молекулами строфантина К энергия активации термодеструкции фермента повышается до 22,8 ккал/моль [56]. Температурная зависимость константы скорости инаktivации каталазы в интервале $20-45^\circ\text{C}$ описывается уравнением [56]:

$$k_1 = 4,13 \cdot 10^6 \cdot \exp(-14\,600/RT)$$

Пероксидаза хрена (КФ 1.11.1.7). Температурная зависимость $k_{\text{ин}}$ фермента описывается уравнением [61]:

$$k_{\text{ин}} = 1,7 \cdot 10^{10} \cdot \exp(-19\,900/RT)$$

Модифицирование пероксидазы тремя молекулами строфантина К мало изменяет активационные характеристики инаktivации фермента (см. табл. 1). Изменение pH сильно сказывается на значениях констант скорости инаktivации пероксидазы и активационных характеристиках процесса: в 0,1 М цитратно-ацетатном буфере с pH 6,0 энергия активации равна 19,9 ккал/моль [61], в то время как в 0,05 М фосфат-цитратном буфере с pH 7,0 возрастает до 47,4 ккал/моль [62].

Цитохром Р-450 ЛМ-2 (КФ 1.14.14.1) в трис-HCl буфере (pH 7,54) с 20% глицерина теряет каталитическую активность в интервале $40-58^\circ$. Этому процессу соответствует $E_{\text{акт}} = 23,5$ ккал/моль [50]. Важно отметить, что параллельно с потерей каталитической активности уменьшается интенсивность полосы Соре карбонильного комплекса цитохрома Р-450 и появляется спектральная полоса при 420 нм, отвечающая неактивной форме гемопротенида — Р-420 [65, 82]. Иммобилизация цитохрома Р-450 ЛМ-2 на полиамиде не вызывает заметного изменения $E_{\text{акт}}$ процесса термодеструкции гемопротенида (22,4 ккал/моль) [50]. Кинетические кривые уменьшения каталитической активности цитохрома Р-450 ЛМ-2 в растворе, как правило, имеют несколько фаз, которые можно объяснить двумя путями: во-первых, сильно гидрофобный цитохром Р-450 образует в водном растворе агрегаты, в которых он инаktivируется с разными скоростями; во-вторых, в разбавленных растворах может проявляться инаktivация разных конформеров одной и той же формы цитохрома Р-450, так как после извлечения из микросомальных мембран гемопротенид необычайно лабилен в водных средах.

2. Кинетика инаktivации ферментов в обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях

Обращенные мицеллы ПАВ с включенными в них ферментами и белками являются реальной моделью биологических мембран, отражающей многие важные стороны их структуры и сложные липид-белковые и белок-белковые взаимодействия [66—69, 83—85]. Кроме того, микрогетерогенные системы «белок — ПАВ — вода — органический растворитель» — новая, весьма интересная среда для проведения ферментативных реакций [83—85]. Многократно показано, что ферменты различных клас-

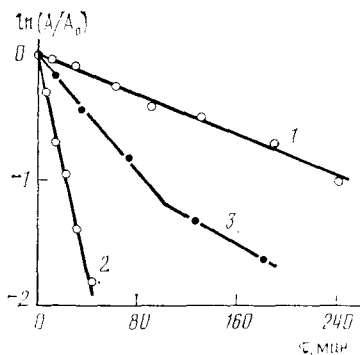


Рис. 6

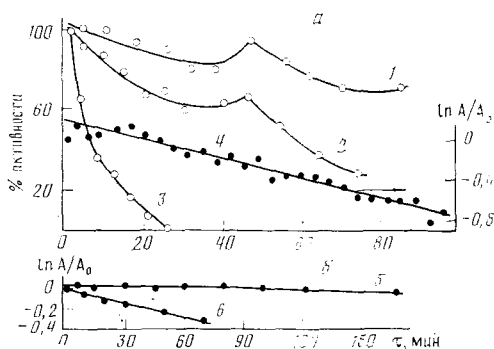


Рис. 7

Рис. 6. Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых инактивации глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при 40° С: 1 — буферный раствор; 2 — мицеллы АОТ в гептане; 3 — смешанные мицеллы из АОТ и Тритона X-45 в гептане [57]; условия указаны в табл. 1.

Рис. 7. Кинетические кривые изменения каталитической активности пероксидазы в обращенных мицеллах: 0,2 М АОТ, 6% полярной фазы из 0,05 М фосфат-цитратного буфера с pH 4,6 (13,5 нМ фермента): 1 — 37, 2 — 43, 3 — 54° С и 4 — полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой при 40° С (а); полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых изменения активности пероксидазы (13,5 нМ) в 0,05 М фосфат-цитратном буфере с pH 7,0: 5 — 45, 6 — 55° С [57] (б)

сов, солюбилизированные обращенными мицеллами ПАВ, не только сохраняют свои каталитические свойства, но иногда более активны, чем в водных средах [69, 83—86]. При практическом использовании белков в среде обращенных мицелл ПАВ важно знать не только каталитическую активность биокатализаторов в этих условиях, но и их стабильность при различных температурах, pH и воздействиях денатурирующих добавок. Нами показано, что устойчивость гемопротеидов в обращенных мицеллах ПАВ, как и в водных средах, зависит от температуры, pH, ионной силы и добавок, стабилизирующих белок; на устойчивость гемопротеидов влияют также физико-химические свойства и состав мицелл, целенаправленно меняя которые можно существенно стабилизировать солюбилизированные белки [66—69], [83—85].

Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (КФ 1.1.1.49, Г6ФДГ) инактивируется в обращенных мицеллах АОТ (натриевая соль ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты) в гептане по кинетическому закону первого порядка до больших глубин (рис. 6) [57]. Отметим, что по этому же закону фермент инактивируется и в водных растворах. Однако в смешанных мицеллах, составленных из АОТ и Тритона X-45 (1:1), наблюдается отклонение инактивации фермента от закона первого порядка (см. рис. 6). Температурная зависимость эффективных констант скорости инактивации Г6ФДГ в интервале 23—46° С характеризуется изломом на графике Аррениуса, приходящимся на 34° С. Выше излома $E_{\text{акт}} = 61,4$ ккал/моль, а ниже — 19,4 ккал/моль [57]. При инактивации фермента в водных растворах также наблюдается излом при 36° С, а $E_{\text{акт}}$ отличаются от вычисленных для мицеллярных систем (табл. 1).

Пероксидаза хрена при инактивации в обращенных мицеллах АОТ и смешанных мицеллах, составленных из АОТ и Тритона X-45, выше 26° С обнаруживает «периодичность» в изменении своей активности, которую мы связываем со сложными кооперативными превращениями системы «вода — белок — АОТ — гептан» [57, 62]. Эта «периодичность» инактивации пероксидазы сглаживается при повышении температуры до 50—55° С (рис. 7). Отметим, что в буферных растворах инактивация пероксидазы описывается кинетическим уравнением первого порядка (см. рис. 7, б, прямые 5 и 6) [57, 61, 62], т. е. явление «периодичности» в изменении каталитической активности фермента связано только с природой обращенных мицелл ПАВ. На константы скорости инактивации пероксидазы в мицеллах влияют концентрации буфера, его pH, процент-

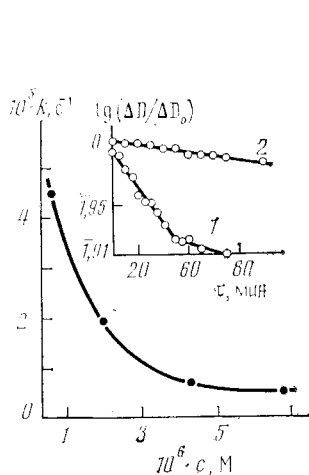


Рис. 8

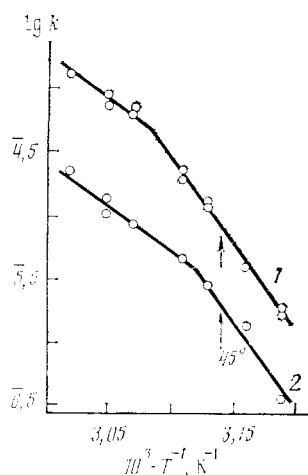


Рис. 9

Рис. 8. Влияние концентрации цитохрома b_5 (c) на константу скорости его трансформации в мицеллах АОТ в октано при 31°C : 1 — $0,68$ мкМ; 2 — $6,84$ мкМ цитохрома b_5 ($0,25$ М АОТ, $4,5\%$ полярной фазы в октано) [63]

Рис. 9. Зависимость констант скорости термонинактивации цитохрома Р-450 в микросомах печени кролика в отсутствие глицерина в растворе от температуры: 1 — первая фаза; 2 — вторая фаза процесса [50]

ное содержание водной фазы, добавление в систему неионного детергента Тритона Х-45 или глицерина [57, 62]. Температурная зависимость эффективных констант скорости инактивации пероксидазы в мицеллах характеризуется изломом на графике Аррениуса при 55°C , а значения $E_{\text{акт}}$ выше и ниже этой температуры сильно отличаются (см. табл. 1).

Цитохром b_5 инактивируется в обращенных мицеллах со скоростями, которые зависят от его начальной концентрации (рис. 8). При малых концентрациях белка изломы на полулогарифмических анаморфозах кинетических кривых падения интенсивности полосы Сорс отсутствуют, но появляются при увеличении концентрации гемопротенида [63]. Характер зависимости $k_{\text{ин}}$ от начальной концентрации одинаков как для цитохрома b_5 в мицеллярных системах, так и для малатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в водных растворах (уравнение (10) [59]): с ростом концентрации белка константа скорости его инактивации уменьшается.

Цитохром Р-450 ЛМ-2 инактивируется в мицеллах разного состава с разными скоростями [66—69]. Усложняя состав мицелл, можно добиться существенной стабилизации этого лабильного белка в мицеллярных системах. При 40°C $k_{\text{ин}}$ цитохрома Р-450 в мицеллах, содержащих АОТ, цетилтриметиламмонийбромид, Твин 20 и Тритон Х-45, равна $2,9 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$, а в микросомах печени при той же температуре — $3,4 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ [66, 67], т. е. стабильность гемопротенида в целенаправленно подобранной мицеллярной системе может быть даже выше его устойчивости в нативной мембране [66, 67, 69].

Таким образом, обращенные мицеллы ПАВ не только предохраняют белки от денатурирующего влияния органических растворителей но в отдельных случаях способны обеспечить их относительно высокую термическую стабильность в углеводородной среде [66—69]. Оптимальный состав обращенных мицелл, обеспечивающих сохранение каталитической активности фермента или даже ее увеличение, индивидуален для каждого белка. Однако термостабильность ферментов в мицеллах чаще всего ниже, чем в водной среде, хотя ферменты в мицеллярных системах могут быть стабилизированы при усложнении состава мицелл таким образом, что их устойчивость достигает уровня, характерного для буферных растворов. Например, при 45°C константа скорости инактивации Г6ФДГ в буферном растворе равна $2,24 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, а в смешанных мицел-

лах из АОТ и Тритона X-45 (1 : 1) — $9,12 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, т. е. фермент в мицеллах устойчивее в 2,4 раза [57]. В последнее время предложен еще один способ стабилизации белков в органических растворителях [87]: ковалентное включение α -химотрипсина в частицы сшитого полиакриламидного геля коллоидных размеров (100—400 Å). Такой катализатор универсален и может быть использован как в углеводородах, так и в водных растворах.

Количественное описание инактивации белков в мицеллах сопряжено с теми же трудностями, что и в водных растворах: эффективные константы скорости инактивации зависят от начальной концентрации белка [63, 70]; температурная зависимость этих констант осложнена изломами на графиках Аррениуса, которые отражают не только эффективный характер констант скорости, но и особенности поведения мицеллярных систем с повышением температуры [57, 62, 70].

3. Кинетика инактивации цитохрома Р-450 в микросомальных мембранах

Цитохром Р-450 — терминальная оксидаза многих гидроксилирующих мультиферментных систем, широко распространенных в природе [82]. Эти системы отвечают за гидроксилирование гидрофобных соединений до более полярных оксипроизводных, которые или выводятся из организма или служат ключевыми соединениями в биосинтезе биоактивных веществ [82]. Большинство цитохромов Р-450 в разной степени связано с мембранами и отличаются большой лабильностью после извлечения из нативного окружения. Уникальное свойство цитохромов Р-450 катализировать превращения разнообразных соединений в оксипроизводные заставляет исследователей искать пути практического использования этого семейства биокатализаторов. Однако сложность выделения цитохромов из мембраны, их малая устойчивость в водных средах, высокая стоимость сырьевого источника, а также мультиферментная природа гидроксилирующих систем заставляет искать пути использования стабилизированных органелл (микросом, митохондрий) в ферментативных процессах гидроксилирования *in vitro* [88, 89]. В связи с этим характеристика инактивации цитохромов Р-450 в нативных мембранах и их стабилизация в этой среде чрезвычайно актуальны [50, 64, 65, 82, 88, 89]. Нами изучена инактивация цитохрома Р-450 в микросомах печени кроликов по потере его каталитической активности в окислении анилина и по изменению спектральных свойств [50, 64, 65].

Уменьшение каталитической активности гемопротеида в микросомах сопровождается снижением интенсивности полосы Соре его СО-комплекса и ростом концентрации неактивной формы гемопротеида — цитохрома Р-420 [65]. Изменение активности цитохрома Р-450 в микросомах происходит в несколько стадий [64]. Как правило, эффективная константа скорости определена только для первой стадии процесса. Температурная зависимость $k_{\text{ин}}$ цитохрома Р-450 в микросомах характеризуется наличием излома на графиках Аррениуса для первой и второй фазы процесса инактивации гемопротеида (рис. 9) [50]. Причины появления изломов будут обсуждены ниже. Одним из способов стабилизации мембранных белков, и цитохрома Р-450 в частности, является включение их в липидные дисперсии и липосомы, моделирующие многие стороны нативных биологических мембран. Детальное обсуждение этой проблемы проведено в монографии [90]. Изучение термодинамических характеристик тепловой инактивации цитохрома Р-450 в липосомах показало, что они зависят от рН и температуры и изменяются в сравнении с водным раствором в пределах: ΔH — от 78 до 80 ккал/моль, ΔS — от —163 до —184 кал/моль·К. Это свидетельствует о возрастании конформационной «жесткости» белка в липосомах по сравнению с буферными растворами [91].

Важной задачей при исследовании термоинактивации ферментов является соотнесение кинетических характеристик лимитирующей стадии этого сложного процесса и его молекулярным механизмом. Решение этой задачи только кинетическими приемами невозможно и требует ис-

пользования многих других методик (электронная, КД- и ЯМР-спектроскопия, седиментационный анализ, электрофорез). Применение комплекса физико-химических методов в ряде случаев позволяет соотносить лимитирующую стадию термоинактивации с достаточно определенными молекулярными механизмами трансформации биополимера. Уже отмечалось, что на основании данных ЯМР ^{13}C [43], флуоресценции [45], круглого дихроизма [46], измерения оптической плотности лизоцима [42] и кинетики его инактивации [44, 47] можно утверждать, что лимитирующая стадия термоинактивации этого белка связана с нонизацией остатка Glu-35 и разрушением полипептидной цепи на участке 5—15 [47—49]. Лимитирующей стадией термоинактивации более сложного мембранного фермента цитохрома P-450 является разрыв координационной связи гемового железа с остатком цистеина полипептидной цепи, что превращает фермент в неактивную форму P-420 [50, 82, 90]. Установление этой лимитирующей стадии стало возможным только на основании комплекса исследований кинетики термоинактивации цитохрома P-450 [50, 65] и изменений его спектральных характеристик [65, 82, 90].

Решению сложной задачи соотнесения кинетических параметров и структурных изменений ферментов при их инактивации посвящены работы Полторака, Чухрай и соавт. [24—33, 74], Березина, Мартинеска, Угаровой и соавт. [14, 15, 19—22, 75] в нашей стране, а также Пфайля [17] и Йенике [76—80] за рубежом. Рассмотрение этих вопросов очень важно, но выходит за рамки нашего обзора, посвященного только кинетическим аспектам термоинактивации белков и ферментов. Мы можем лишь отослать читателя к недавнему обзору [74], в котором детально рассмотрены процессы диссоциативной термоинактивации ферментов, приближенные методы расчета индивидуальных кинетических параметров этих процессов и указаны способы стабилизации субъединичных ферментов путем закрепления их четвертичной структуры, а также к обзору [75], посвященному основным структурным и физико-химическим факторам стабилизации белковых макромолекул в растворе и методам стабилизации биокатализаторов путем химической модификации и точечных мутаций белков. Полезный критический анализ работ, касающихся соотнесения кинетических данных инактивации и реактивации субъединичных ферментов с их структурными изменениями, приведен в монографии [81].

IV. ВЛИЯНИЕ ПОЛИОЛОВ И ДЕТЕРГЕНТОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В РАСТВОРАХ

Среда, в которой функционируют белки в живой клетке, в значительной степени отличается по составу, вязкости, полярности и другим параметрам от растворов, применяемых *in vitro*. Давно известно, что различные органические растворители значительно снижают стабильность белков. Добавки в белковые растворы ряда низкомолекулярных соединений (солей, сахаров, полиолов, детергентов и т. д.) влияют на стабильность белков (ферментов), так как изменяют свойства растворов и сродство белка к растворителю. В данном разделе проанализировано влияние некоторых низкомолекулярных добавок на термостабильность белков и обсужден механизм стабилизации последних.

Стабилизирующее действие полиолов на белки хорошо известно [92—102]. Степень денатурации овальбумина мочевиной уменьшается в присутствии сахарозы [92], многоатомные спирты увеличивают температуру термического перехода лизоцима и рибонуклеазы [93], сахароза оказывает стабилизирующий эффект на яичные белки [93]. Для изучения количественных закономерностей стабилизирующего действия полиолов на белки использованы различные методы [98, 100, 101]: проведены систематические исследования влияния ряда полиолов на температуру денатурации овальбумина, лизоцима, кональбумина и α -химотрипсина методом калориметрии [98] и детально изучено взаимодействие ряда белков с водными растворами лактозы и глюкозы методом денси-

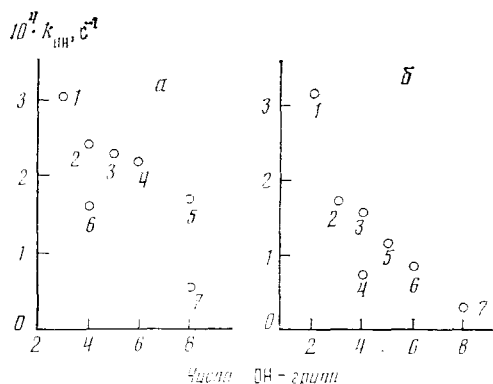


Рис. 10

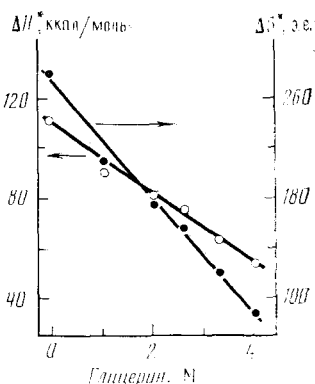


Рис. 11

Рис. 10. Изменения константы скорости термоинактивации пероксидазы хрена, модифицированной строфантинном К (а) и цитохрома Р-450 в микросомах (б) в зависимости от числа ОН-групп в молекуле полиолов; а: 1 — глицерин, 2 — рамноза, 3 — глюкоза, 4 — сорбит, 5 — мальтоза, 6 — ксилоза, 7 — сахароза; 50°С [61]; б — 1 — этиленгликоль, 2 — глицерин, 3 — рамноза, 4 — ксилоза, 5 — глюкоза, 6 — сорбит, 7 — мальтоза; 50,5°С [64]

Рис. 11. Зависимость ΔH^* и ΔS^* от концентрации глицерина при инактивации цитохрома Р-450 в микросомах в фосфатном буфере с рН 7,3 [64]

тометрии [100]. В нашей лаборатории для количественной характеристики влияния полиолов на термостабильность различных белков применен кинетический подход [58, 61, 64, 65]. Стабилизирующее влияние полиолов изучено на примере пероксидазы хрена, модифицированной тремя молекулами строфантина К [61], лактатдегидрогеназы в водных растворах [58] и цитохрома Р-450 в микросомах печени кроликов [64, 65]. Независимо от природы белка (растворимый в воде или гидрофобный) и его структурной организации (мономерный или субъединичный), а также независимо от окружения фермента (водный раствор или микросомальные мембраны), все низкомолекулярные полиолы и декстраны уменьшают скорость инактивации белков [58, 61, 64, 65].

Увеличение концентрации глицерина и сахаров в растворе сопровождается монотонным снижением скорости инактивации конъюгата пероксидазы со строфантинном [61], лактатдегидрогеназы [58] и цитохрома Р-450 в микросомах [64, 65]. Полиэтиленгликоли 600, 1000, 6000 и декстраны 20, 40 и 500 также стабилизируют конъюгат пероксидазы со строфантинном [61]. Однако декстран 20 и полиэтиленгликоли 300 и 1000 не оказывают стабилизирующего влияния на цитохром Р-450 в микросомах [64]. Каким образом можно объяснить данные о стабилизирующем действии полиолов на белки?

Нами показано, что между величинами констант скорости инактивации пероксидазного конъюгата, цитохрома Р-450 и числом ОН-групп в молекулах стабилизирующих добавок существует прямая связь (рис. 10): чем больше ОН-групп содержит стабилизатор, тем меньше $k_{ин}$, т. е. тем стабильнее белок в растворе или микросомах [61, 64, 65]. Для объяснения этих данных напомним основные факторы стабилизации белков [14, 15, 98]. Стабильности белков способствуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия и комплексобразование с некоторыми металлами. Известно, что растворение полиолов в воде мало сказывается на образовании водородных связей белками [98]. Электростатические взаимодействия обычно сильнее в растворах сахаров, чем в воде, но их вклад в стабилизацию белков относительно мал. Главным фактором, стабилизирующим пространственную структуру белка, являются гидрофобные взаимодействия [1—3, 14, 15, 98]. Гидрофобные взаимодействия в большой степени определяются природой растворителя, и, следовательно, сильно зависят от того, как сахара и другие полиолы влияют на структуру воды. Показано, что взаимодействие между

парами гидрофобных групп намного сильнее в растворах глицерина и сахаров, чем в чистой воде [98]. Вероятно, это главный механизм, по которому полиолы стабилизируют белки в водных растворах. Стабилизирующее воздействие полиолов определяется тем, насколько велик их стабилизирующий эффект на водные растворы. Авторами работы [98] предлагается в качестве такой структурирующей характеристики использовать относительную величину $f = (\bar{V}_2 - V_w)/V_w$, где V_w — ван-дер-ваальсовский объем растворенного вещества, \bar{V}_2 — парциальный молярный объем этого же вещества, который включает внутренний объем молекулы и его изменения, вызванные действием растворителя. В качестве примера приведем значение f для глицерина в воде при 25°С [103]: $V_w = 51,4$ мл/моль, $\bar{V}_2 = 73,5$ мл/моль, $f = 43,1\%$. Ван-дер-ваальсовские объемы для сахаров и других полиолов вычислены в работе [104]. Для определения парциальных молярных объемов \bar{V}_2 применяют уравнение:

$$\varphi_v = M_r/d_0 = 1000(d - d_0)/cd_0$$

где d и d_0 — плотности раствора и растворителя, M_r — молекулярная масса растворенного вещества, c — его концентрация в растворе в М [98]. Как видим, φ_v линейно зависит от c и экстраполяцией к нулевой концентрации можно получить значение парциального молярного объема \bar{V}_2 . Парциальные молярные объемы для многих сахаров вычислены таким образом и приведены в работе [105]. Сахара вызывают эффективное структурирование воды в том случае, когда их ОН- группы ориентированы в пространстве так, что расстояние между ними соответствует расстоянию между атомами кислорода в молекулярной решетке воды [98]. Более точных количественных характеристик структурирования воды полиолами в настоящее время нет.

Имеются и другие объяснения стабилизирующего действия полиолов на белки. Предполагается, что молекулы полиолов могут проникать внутрь белковых глобул, что способствует увеличению гидрофобных взаимодействий внутри глобулы и снижению ее лабильности [99]. В некоторых случаях может происходить специфическое связывание сахаров и спиртов белками. Так, например, лизоцим в кристаллическом состоянии взаимодействует с глюкозой, которая стабилизирует фермент, так как связана с ним, по крайней мере, в двух центрах [106]. Константа связывания глюкозы с лизоцимом равна $2,3 \text{ М}^{-1}$ [106].

Стабилизирующее влияние полиолов на белки самой разной природы указывает на главную роль структуры водной среды, в которой находятся белки, и второстепенную роль структурной организации самих белков. Интересно проанализировать влияние полиолов на цитохром Р-450, находящийся в микросомальной мембране, т. е. в ином микроокружении по сравнению с его водным раствором.

Низкомолекулярные и высокомолекулярные полиолы различным образом воздействуют на микросомы. Низкомолекулярные добавки влияют на мембрану как мягкие поверхностно-активные вещества: с повышением температуры они легко проникают в липидный бислой, увеличивают степень гидратации фосфолипидов, снижают поверхностную вязкость бислоя и повышают латеральную подвижность фосфолипидов [107—110]. Высокомолекулярные добавки (полиэтиленгликоли, декстран) не проникают в липидный бислой, но снижают поверхностный потенциал фосфолипидов и приводят к агрегации везикул [111]; конкурируя с фосфолипидами за воду, они вызывают сжатие жидкокристаллической решетки бислоя [112]. Таким образом, низкомолекулярные полиолы могут действовать на мембрану в целом, в то время как высокомолекулярные — существенно влияют только на ее поверхностный слой. Этим можно объяснить разницу в действии полиолов на микросомальный цитохром Р-450 [64, 65]. Поэтому стабилизирующее действие полиолов необходимо характеризовать с учетом их влияния на гидрофобные взаимодействия в белковой глобуле и во всей мембране в целом. Проникая в микросомы, глицерин способствует гидрофобным контактам между парами неполярных групп молекулы цитохрома Р-450, а в при-

мембранных областях понижается полярность среды. Глицерин выравнивает свойства всей системы и сильно повышает структурированность среды. С этой точки зрения понятно значительное уменьшение энтропии активации с ростом концентрации глицерина при инаktivации микросомального цитохрома Р-450 (рис. 11). С другой стороны, глицерин уменьшает энтальпию активации тепловой денатурации цитохрома Р-450, действуя на микросомы как детергент, и существенно облегчает подвижность и лабильность гемопротейда в липидном бислое [64, 65]. Влияние глицерина на энтальпию активации можно рассматривать как дестабилизирующий фактор в процессе термоинаktivации цитохрома Р-450, в то время как влияние глицерина на энтропию активации является стабилизирующим фактором в термоинаktivации гемопротейда. Из наших данных следует, что соотношение этих двух факторов складывается в пользу энтропийного, в результате чего свободная энергия активации деструкции цитохрома Р-450 в присутствии глицерина возрастает и, как следствие, константа скорости термодеструкции цитохрома Р-450 уменьшается. Отметим, что подобные соотношения ΔH^* и ΔS^* наблюдаются также при других способах стабилизации белков, например, при их иммобилизации на носителях [23]: связывание с матрицей приводит к отклонению от первоначальной структуры фермента в сторону его денатурации, снижению ΔH^* и одновременному снижению ΔS^* вследствие упорядочения структуры иммобилизованного белка.

По сравнению с полиолами детергенты оказывают более сильное влияние на белки, находящиеся в водном растворе. Систематические исследования взаимодействия детергентов с белками в водных растворах необходимы в связи с их практической важностью. Во-первых, применение детергентов неизбежно при выделении из мембран связанных с ними белков [82, 113—115]. Во-вторых, часто необходима солюбилизация водонерастворимых субстратов для липолитических ферментов [116]. В-третьих, для достижения высоких скоростей ферментативных реакций в буферные растворы часто добавляют неионные детергенты [117, 118]. В большинстве случаев детергенты подбирают эмпирическим путем. Большой экспериментальный материал о взаимодействии детергентов с растворимыми и мембранными белками обобщен в обзорах [115, 119, 120]. Однако до сих пор остро ощущается отсутствие систематических исследований взаимодействия различных детергентов с белками, что затрудняет обобщения и оценку перспектив развития этой методически важной области энзимологии.

В нашей лаборатории систематически изучено взаимодействие различных детергентов в водной среде с миоглобином и цитохромами с и Р-450 [60]. Эти белки отличаются не только растворимостью, молекулярными массами, но и прочностью связывания гема с апобелком. В качестве детергентов были использованы цвиттер-ионное ПАВ N-C₁₂H₂₅-N,N-диметиламмоний-1-пропан-3-сульфонат (ТМ 3-12) и неионные ПАВ — Твин 20 и Тритон N-101, относящиеся к типу А, который объединяет амфифильные соединения с лиотропным мезоморфизмом, образующие в водной среде мицеллы сферической или эллипсоидной формы [119]. Мы использовали также холат натрия, относящийся к группе заряженных детергентов типа В, которые отличаются отсутствием лиотропного мезоморфизма и образуют в водной среде агрегаты, содержащие от 2 до 8 молекул ПАВ [119]. Взаимодействие перечисленных гемопротейдов с детергентами обоих типов сопровождается уменьшением интенсивности полос Соре в спектрах поглощения. Скорость этого процесса определяется природой детергентов, их концентрацией, температурой и максимальна для цвиттер-ионного ПАВ ТМ 3-12. Константы скорости трансформации гемопротейдов сложным образом зависят от концентрации детергентов. Методами КД и вторых производных спектров поглощения гемопротейдов в присутствии детергентов показано их влияние на вторичную структуру и конформацию белков, приводящее к потере гема. В соответствии с предложенной моделью взаимодействия детергентов с гемопротейдами процесс происходит на двух уровнях —

молекулярном и надмолекулярном [60]. При концентрациях детергентов ниже критической концентрации мицеллообразования наблюдается бимолекулярное взаимодействие ПАВ с белками; выше этой концентрации с белками взаимодействуют не только молекулы ПАВ, но и их мицеллы (тип *A*) или ассоциаты (тип *B*). Молекулярный механизм взаимодействия ПАВ с белками состоит в том, что молекулы ПАВ проникают своими гидрофобными фрагментами в полости и «трещины» молекул белка, повышая гидрофобность в областях, соседних с ароматическими аминокислотами, что подтверждается возрастанием амплитуды второй производной в спектрах поглощения цитохромов *c* и Р-450 ЛМ-2 при добавлении Твина 20 и ТМ 3-12 [60]. В белке изменяется не только гидрофильно-гидрофобный баланс глобулы, но и нарушается его вторичная структура, что подтверждается спектрами КД, отражающими уменьшение содержания α -спиральных участков в молекулах миоглобина при добавлении ТМ 3-12 [60]. Наиболее сильно взаимодействует с белками цвиттер-ионное ПАВ ТМ 3-12. Воздействие ПАВ на гемопротениды приводит к конформационным изменениям белков, облегчающим потерю гема. Трансформация миоглобина в присутствии детергентов разного типа происходит с $E_{\text{акт}} = 17\text{—}23$ ккал/моль, которые можно отнести к процессу разрыва координационной связи: железо гема — азот гистидина [60]. Индивидуальные детергенты и их смеси повышают или понижают значения ΔH^* в процессе трансформации миоглобина. Между ΔH^* и ΔS^* наблюдается связь (компенсационный эффект), отраженная уравнением $\Delta H^* = A + \beta \Delta S^*$, где $A = 22\,000$ кал/моль, $\beta = 300$ К. Обычно коэффициент β должен быть близок к средней температуре опытов, что наблюдается и в данном случае $T_{\text{сред}} \approx \beta = 300$ К.

Особый случай представляют обращенные мицеллы ПАВ в органических растворителях, солюбилизировавшие белки. В чистых органических растворителях белки практически нерастворимы. Для повышения их растворимости используют некоторые ПАВ. В отличие от водных растворов, в обращенных мицеллах детергенты взаимодействуют с белком преимущественно своими полярными фрагментами. Вокруг белковой глобулы формируется смешанная сольватная оболочка, составленная из молекул ПАВ, органического растворителя и воды. Состав сольватной оболочки и соотношение компонентов в мицеллярном растворе непосредственно влияют на стабильность и активность белков в системе. Исчерпывающую информацию о функционировании и свойствах белков в этих системах читатель может получить из обзоров [83—85, 121].

V. ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ КОНСТАНТ СКОРОСТИ ИНАКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТОВ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ СМЫСЛ АКТИВАЦИОННЫХ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЭТОГО ПРОЦЕССА

Температурная зависимость констант скорости инактивации ферментов описывается уравнением Аррениуса и характеризуется одним значением $E_{\text{акт}}$ только в том случае, если исследование ферментов проведено в сильно разбавленных растворах. Только одна $E_{\text{акт}}$ характерна для разбавленных растворов мономерного лизоцима [47] и субъединичных лактат- и малатдегидрогеназ [58, 59]. Увеличение концентрации белка в растворе приводит к появлению изломов на графиках Аррениуса (см. рис. 4), так как величины $k_{\text{ин}}$ зависят от начальной концентрации белка и других параметров [47, 58, 59]. Во всех случаях, когда начальная концентрация белка выбрана произвольно, на графиках Аррениуса есть изломы, отражающие эффективный характер констант скорости инактивации ферментов в концентрированных растворах. В случае мембранных белков имеются другие причины, объясняющие наличие изломов на графиках Аррениуса: во-первых, конформация и стабильность белков в мембране зависят от воздействия, природы и физических свойств окружающих липидов, фазовые переходы которых вызывают скачкообраз-

ное изменение $E_{\text{акт}}$ в процессе тепловой трансформации белка [82, 90, 113, 114]; во-вторых, при определенных температурах возможны «фазовые» переходы самого белка, приводящие к резкому изменению его конформации [41—44, 122] и, как следствие, к изменению $E_{\text{акт}}$ процесса термической деструкции; в-третьих, возможно существование разных конформеров одной и той же формы биокатализатора, для которых характерны разные $E_{\text{акт}}$ процесса тепловой денатурации. Все перечисленные возможности могут реализоваться не только в биомембранах, но и в липосомах [123, 124] и, возможно, в обращенных мицеллах ПАВ.

Ясно, что наиболее близки к своим истинным значениям константы скорости инактивации белков, определенные в сильно разбавленных водных растворах, так как в этом случае сведены к минимуму возможности ассоциации мономерных белков и реассоциации субъединиц олигомерных ферментов. Поэтому целесообразно обсуждать $E_{\text{акт}}$ и полученные с помощью уравнения Аррениуса — Эйринга (1) активационные характеристики ΔH^* и ΔS^* в первую очередь для тех белков, инактивация которых охарактеризована константами скорости k_0 для их разбавленных растворов. В таких условиях нами изучено три фермента — лизоцим [47], малатдегидрогеназа [59] и лактатдегидрогеназа [58]. Как следует из уравнений Аррениуса (8), (11), (12) только в случае лизоцима (уравнение (8)) предэкспоненциальный множитель константы скорости близок к его предельному значению для мономолекулярных реакций [6, 52]. Для двух субъединичных ферментов предэкспонента на много порядков превышает типичные множители в уравнении для констант мономолекулярных реакций (10^{10} — 10^{11} с⁻¹) и соответствует высокой энтропии активации (табл. 1). Это не является неожиданным, так как уже давно известно, что инактивация белков характеризуется высокими значениями ΔH^* и ΔS^* [6—8, 10, 11, 23, 125].

Применяя уравнение Аррениуса — Эйринга (1) к превращениям ферментов и ферментативным реакциям, необходимо помнить, что, вследствие неэлементарности этих процессов, параметры, определяемые из температурной зависимости $k_{\text{ин}}$ ферментов и констант скорости ферментативных реакций, всегда являются эффективными величинами, отражающими всю сложность характеризующей макростадии — наличие промежуточных, внешне не проявляемых микростадий, влияние растворителя и окружения фермента и т. д. (см. [8], с. 175—185). По этой причине для анализа термодинамических и кинетических параметров инактивации ферментов необходимо привлекать дополнительные соображения, основанные на теории химической кинетики и эмпирических данных по более простым химическим и модельным системам, а также результаты изучения процессов инактивации ферментов методами спектроскопии ЯМР, КД, денситометрии, седиментационного анализа и т. д.

Что касается кинетических данных, то для их анализа в случае ферментативных процессов Лихтенштейн предложил три типа методов [8]: 1) количественное сравнение энергетических и энтропийных параметров для ферментативных и модельных реакций; 2) теоретическая оценка параметров для различных вариантов механизма исследуемых реакций; 3) корреляция между энергетическими и энтропийными параметрами ферментативных процессов (компенсационный эффект). Так как современный уровень теории не позволяет вычислять абсолютные значения энергий и энтропий активации для реакций в конденсированной фазе, третий тип анализа ферментативных процессов представляет большой интерес, особенно когда речь идет о сериях реакций, целенаправленном изменении одного из параметров при постоянстве других или об изменении условий проведения процесса с одним и тем же ферментом.

Впервые корреляция между энергетическими и энтропийными параметрами в ферментативном процессе отмечена в [126]. При изменении pH авторы наблюдали параллельное компенсирующее изменение параметров ΔH и ΔS в процессе связывания субстрата α -химотрипсином. С тех пор появилось много данных о компенсирующих изменениях ΔH и ΔS (ΔH^* и ΔS) в самых разнообразных ферментативных процессах. Эти

данные подробно рассмотрены и проанализированы в ряде работ [8, 11, 12, 125—130]. Обзор сведений по инактивации белков показывает, что основные кинетические закономерности этого процесса состоят в следующем: 1) наблюдаются резкие изменения скоростей инактивации, происходящие в довольно узком интервале температур, в небольшом диапазоне концентраций водородных ионов, органических растворителей и других добавок; 2) инактивация характеризуется аномально большими (в сравнении с параметрами обычных химических реакций) значениями $E_{\text{акт}}$ и ΔS^* достигающими в отдельных случаях 180 ккал/моль 600 э. е./моль белка (см. табл. 1, а также свободные данные в [3, 6, 7—11, 22, 23, 125]); 3) значения $E_{\text{акт}}$ и ΔS чрезвычайно чувствительны к изменению условий среды (рН, ионная сила, природа буфера, наличие стабилизирующих добавок, введение белков в мицеллы, липосомы, гели и т. д.); 4) между экспериментально определяемыми значениями $E_{\text{акт}}$ и энтропией активации для разных белков и для одного и того же белка при изменении условий существует линейная зависимость, выраженная уравнением [131, 132]: $E_{\text{акт}} = \alpha + \beta \cdot \Delta S^*$.

Как следует из многочисленных данных, обсужденных ранее и приведенных в обзоре, при переходе от одного белка к другому, а также при изменении рН, концентрации ионов и денатурирующих добавок, энергия и энтропия активации практически всегда изменяются параллельно (см. например, рис. 11). Известно, что наклон прямых в координатах $E_{\text{акт}} - \Delta S^*$ совпадает с наклоном прямых для параметров ΔH и ΔS обратимой инактивации [7—10, 22, 125]. Кинетический и термодинамический компенсационные эффекты характеризуются близкими коэффициентами β и одинаковыми масштабами изменения энергетических и энтропийных параметров [8, 125].

В соответствии с существующими представлениями, процессы инактивации (денатурации) биополимеров являются кооперативными конформационными переходами. Термодинамическая теория кооперативных систем в применении к биополимерам развита в работах [133—137]. Иногда денатурацию рассматривают как процесс «плавления», хотя в случае белков можно только приблизительно говорить об аналогиях с процессами плавления и «фазовыми» переходами, так как белки считаются «аперриодическими» нерегулярными кристаллами, для которых характерны различия энергии кооперативной связи и дефекты в разных частях больших молекул. Кооперативные процессы в белках являются промежуточными между обычными химическими реакциями, в которых принимает участие небольшое число молекул, и крупномасштабными фазовыми переходами с участием огромного числа одинаковых частиц [8]. Мы не будем рассматривать здесь различные кинетические модели конформационных переходов в белках, так как их детальный анализ приведен в монографиях и обзорах [8, 10, 125, 133—137].

В настоящее время, согласно [138], не вызывает сомнений энергетическая дискретность белков, которая отражает их структурную дискретность, так как белки — сложные системы, состоящие из более или менее независимых, но вполне определенных кооперативных подсистем. Расчлененность макромолекулы на кооперативные подсистемы (домены) — общий принцип структурной организации белковых молекул, имеющий эволюционные, функциональные и физические основания. Поэтому $E_{\text{акт}}$ и активационные характеристики ΔH^* , ΔS^* и ΔG^* процессов термической инактивации (денатурации) белков относятся к сложным кооперативным перестройкам части белковой молекулы и ее ближайшего окружения. Возможно ли в отдельных случаях отнести перечисленные выше характеристики к строго определенной молекулярной стадии инактивации белка? Комплекс кинетических [47], термодинамических [41], спектральных [42, 45, 46] и ЯМР ^{13}C данных [43], полученных при инактивации лизоцима, позволяет утверждать, что этот процесс начинается с ионизации остатка Glu-35, которая вызывает дестабилизацию прилегающих участков лизоцима и разрушение его α -спиральной структуры в области активного центра. Таким образом, даже в этом сравни-

тельно простом и детально охарактеризованном объекте лимитирующий акт необратимой инактивации сопровождается сложными конформационными изменениями, которые количественно отражаются величинами $E_{\text{акт}} \Delta H^*$ и ΔS^* [47]. Второй пример белка, для которого можно достаточно определенно говорить об элементарной стадии инактивации — это цитохром Р-450. Потеря этим белком каталитической активности связана с увеличением длины и разрывом координационной связи гемового железа с атомом серы цистеинового остатка [50, 82, 88, 90]. Однако изменение конформации апобелка предшествует этому акту, т. е. и в этом случае лимитирующая стадия инактивации связана с сильными конформационными изменениями биокатализатора, что отражается термодинамическими и активационными характеристиками процесса [50, 64, 65].

В каких случаях имеет смысл вычисление активационных характеристик термоинактивации белков из температурной зависимости $k_{\text{ин}}$, эффективный характер которой заведомо несомненен? Нам представляется, что это целесообразно лишь в том случае, когда речь идет о сравнении поведения одного и того же фермента под действием разных агентов, о сравнении разных ферментов при воздействии одного и того же агента в одинаковых условиях или о модифицировании фермента различными агентами в одних и тех же условиях. Обсуждать абсолютные значения $E_{\text{акт}} \Delta S^*$ и ΔG^* в этих случаях бессмысленно, так как информативным может быть только характер изменения этих величин при варьировании определенного параметра и постоянстве всех остальных, а не величины сами по себе. Таким образом, анализ полученных активационных характеристик сводится к обсуждению компенсационных состояний между их энергетическими и энтропийными составляющими [7, 8, 11, 125, 127—132].

Обсуждая энтальпийно-энтропийную компенсацию при инактивации (денатурации) белков, следует помнить, что есть сомнения в ее существовании как самостоятельного физического явления [9]. Утверждается, что во всех ферментативных реакциях, обнаруживающих энтальпийно-энтропийную компенсацию, ключевая роль принадлежит растворителю — жидкой воде, которая является неперенным участком всех физиологических процессов и естественным неисчерпаемым резервуаром свободной химической энергии в живой природе [125, 129]. Конформационные перестройки в белках и происходящие при этом изменения в их взаимодействиях с молекулами воды существенно изменяют структуру всей массы жидкой воды. Это обстоятельство, а также очень узкий интервал независимых параметров (рН, температуры, солевого состава среды), определяющих условия ферментативного процесса, приводят к появлению тривиальных линейных соотношений между изменениями энтальпии и энтропии [125, 129].

Блюменфельд [9] вполне обоснованно считает, что энтальпийно-энтропийные соотношения не отражают какой-либо особой физической сущности реакций, а являются простым следствием общих законов равновесной термодинамики и вообще не могут не существовать, если равновесный термодинамический процесс ($\Delta G \approx \text{const}$) протекает в очень узком интервале изменений независимой переменной (температуры, концентрации водородных ионов и т. д.). При исследовании реакций биополимеров, когда равновесная статистическая термодинамика применима с очень большими оговорками, какой-либо серьезный анализ компенсационных соотношений часто лишен физико-химического смысла.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из многочисленных экспериментальных данных следует, что термическая инактивация ферментов является сложным процессом, состоящим из нескольких последовательно-параллельных стадий, и потому часто не описывается кинетическим законом первого порядка. Как правило, полулוגарифмические анаморфозы кинетических кривых имеют изломы или вообще нелинейны. Даже в тех случаях, когда уравнение первого порядка удовлетворительно описывает кинетические данные, эффективная константа скорости инактивации $k_{ин}$ зависит от исходной концентрации белка.

Для быстрой и корректной количественной характеристики процесса термической инактивации белков предложены два подхода. Один из них применили авторы работ [24—32]: схема термоинактивации описывается уравнениями, которые решены приближенными методами, позволяющими определить константы скорости первой обратимой и второй необратимой стадии и вычислить константу равновесия между нативной и обратимо инактивированной формами белков. Этот метод позволяет количественно описать кинетические кривые термоинактивации мономерных и субъединичных белков при их произвольно выбранной начальной концентрации.

Второй метод применен в ряде наших работ [47, 58, 59, 70] и состоит в построении кинетических кривых инактивации при разных начальных концентрациях белка, их спрямлении по уравнению первого порядка, определении зависимости $k_{ин}$ от концентрации белка и вычислении константы скорости при бесконечном разбавлении белка k_0 . Мы считаем, что константа скорости k_0 является наиболее корректной количественной характеристикой термоинактивации белков. Недостатком нашего метода является приближенный характер уравнений, связывающих $k_{ин}$ с начальной концентрацией белка, и трудности с приданием физико-химического смысла коэффициентам α и γ в этих уравнениях (см. уравнения (9) и (10)). Достоинством метода является то, что мы получаем значение константы скорости для бесконечно разбавленных растворов и, следовательно, можем применять уравнения классической термодинамики при анализе температурной зависимости этих констант. Температурная зависимость k_0 описывается уравнением Аррениуса, в то время как графики в координатах $k_{ин}—1/T$ осложнены изломами, а истолкование этих зависимостей вообще лишено физико-химического смысла.

Следует помнить, что термодинамические активационные параметры (ΔH^* , ΔS^* и ΔG^*), полученные из анализа температурной зависимости k_0 , нельзя отнести к одной, строго определенной молекулярной стадии термоинактивации белков, так как они всегда характеризуют сложный кооперативный процесс конформационных превращений биополимера. Это является главной причиной отличия этих величин от активационных параметров термоллиза низкомолекулярных химических соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шульц Т., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982, с. 177.
2. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия, т. 3. М.: Мир, 1985, с. 179.
3. Жоли М. Физическая химия денатурации белков. М.: Мир, 1968. 364 с.
4. Michaelis L., Rona P. Biochem. Z., 1970, B. 27, S. 38.
5. Spiegel-Adolph M. Biochem. Z., 1926, B. 170, S. 126.
6. Глассон С., Лейдлер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М.: Изд-во иностр. лит., 1948, с. 424.
7. Брандтс Дж. Ф. В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 174.
8. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974. 256 с.
9. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1974.
10. Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика. М.: Наука, 1975, с. 242.

11. Кушнер В. П. Конформационная изменчивость и денатурация биополимеров. Л.: Наука, 1977. 274 с.
12. Privalov P. L. Adv. Protein Chem., 1979, v. 33, p. 167.
13. Torchilin V. P., Martinek K. Enzyme Microb. Technol., 1979, v. 1, p. 74.
14. Мартинек К. В. кн.: Успехи биоорганического катализа. М.: Изд-во МГУ, 1979, с. 105.
15. Мартинек К., Березин И. В. Успехи химии, 1980, т. 49, с. 737.
16. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. М.: Наука, 1979, с. 279.
17. Pfeil W. Mol. Cell. Biochem., 1981, v. 40, p. 3.
18. Кулис Ю. Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс: Моклас, 1981, с. 34.
19. Угарова Н. Н. В кн.: Введение в прикладную энзимологию. М.: Изд-во МГУ, 1982, с. 156.
20. Можжев В. В. Там же, 1982, с. 180.
21. Mozhaev V. V., Martinek K. Enzyme Microb. Technol., 1982, v. 4, p. 299.
22. Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В. Успехи химии, 1984, т. 53, с. 1852.
23. Козлов Л. В. Биооргани. химия, 1980, т. 6, с. 1243.
24. Полторак О. М., Чухрай Е. С. Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия, 1979, т. 20, с. 195.
25. Полторак О. М., Чухрай Е. С. Там же, 1979, т. 20, с. 286.
26. Чухрай Е. С., Полторак О. М., Лауценiece Д. Я., Аренс А. К. Там же, 1979, т. 20, с. 427.
27. Полторак О. М., Чухрай Е. С., Ташлицкий В. Н., Сванидзе Р. С. Там же, 1980, т. 21, с. 224.
28. Чухрай Е. С. Там же, 1981, т. 22, с. 381.
29. Вейнберга И. Г., Чухрай Е. С., Полторак О. М., Аренс А. К., Родзиня И. П. Там же, 1981, т. 22, с. 455.
30. Полторак О. М., Пряхин А. Н. Там же, 1983, т. 24, с. 247.
31. Аренс Э. А., Полторак О. М., Пряхин А. Н. Там же, 1983, т. 24, с. 458.
32. Пряхин А. Н., Полторак О. М., Аренс Э. А. Там же, 1983, т. 24, с. 254.
33. Аренс А. К., Березин И. В., Кулис Ю. Ю., Мартинек К., Можжев В. В., Полторак О. М., Торчилин В. П., Чухрай Е. С. Докл. АН СССР, 1985, т. 283, с. 1212.
34. Torchilin V. P., Trubetskoy V. S., Omel'yanenko V. G., Martinek K. J. Mol. Catal., 1983, v. 19, p. 291.
35. Артемчик В. Д., Курченко В. П., Метелица Д. И. Биохимия, 1985, т. 50, с. 826.
36. Артемчик В. Д., Курченко В. П., Метелица Д. И. Там же, 1985, т. 50, с. 1183.
37. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты, М.: Наука, 1978, с. 117—174.
38. Попов В. О., Овчинников А. Н., Газарян И. Г., Егоров А. М., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1985, т. 281, с. 735.
39. Кулис Ю. Ю., Куртигайене Б. С. Биохимия, 1978, т. 43, с. 453.
40. Путилин Ф. Н., Веселова Н. М. Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия, 1983, т. 24, с. 259.
41. Privalov P., Khechinushvili N. J. Mol. Biol., 1974, v. 86, p. 665.
42. Чистякова Л. А., Кравченко Н. А., Никитин С. Я., Юфит С. С., Клабуновский Е. И., Павлов В. А. Биофизика, 1976, т. 21, с. 975.
43. Cozzzone P., Opella S. J., Jardetzky O., Berthoy J., Jolles P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 2095.
44. Клесов А. А. Ферментативный катализ, ч. 2. М.: Изд-во МГУ, 1984, с. 159.
45. Jankowski A., Siemion I. Z. Studia Biophysica, 1978, B. 68, S. 61.
46. Jankowski A., Siemion I. Z. Ibid., 1978, B. 73, S. 221.
47. Тарун Е. И., Еремин А. Н., Метелица Д. И. Биофизика, 1986, т. 31, с. 195.
48. Timascheff S., Rupley J. Arch. Biochem. Biophys., 1972, v. 150, p. 318.
49. Banerjee A., Pogolotti A., Rupley J. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, p. 8260.
50. Еремин А. Н., Метелица Д. И., Усанов С. А., Ахрем А. А. Биофизика, 1980, т. 25, с. 71.
51. Brandts J. F. In: Thermobiology/Ed. Rose A. H. N. Y.—L.: Acad. Press, 1967, p. 25.
52. Денисов Е. Т. В кн.: Кинетика гомогенных химических реакций, М.: Высш. шк., 1978, с. 45.
53. Jones M. N., Manley P., Midey P. J. W., Wilkinson A. E. Biopolymers, 1982, v. 21, p. 1435.
54. Takeda A., Hirano K., Shiroya Yo., Samejima T. J. Biochem., 1983, v. 93, p. 967.
55. Азизов Ю. М., Лихтенштейн Г. И., Пурмаль А. П. Биохимия, 1972, т. 37, с. 620.
56. Плюгачева Е. И., Метелица Д. И. Там же, 1986, т. 51, с. 1262.
57. Еремин А. Н., Метелица Д. И. Там же, 1986, т. 51, с. 1612.
58. Маркина В. Л., Еремин А. Н., Метелица Д. И. Изв. АН БССР. Сер. хим., 1986, № 6, с. 61.
59. Маркина В. Л., Еремин А. Н., Метелица Д. И. Биофизика, 1985, т. 30, с. 971.
60. Еремин А. Н., Метелица Д. И., Сметтан Г. Биохимия, 1984, т. 49, с. 976.
61. Савенкова М. И., Курченко В. П., Метелица Д. И. Биофизика, 1984, т. 29, с. 930.
62. Еремин А. Н., Метелица Д. И. Изв. АН БССР. Сер. хим., 1987, № 1, с. 63.
63. Еремин А. Н., Метелица Д. И. Там же, 1983, № 2, с. 73.
64. Еремин А. Н., Метелица Д. И. Биохимия, 1982, т. 47, с. 1186.
65. Metelitz D. I., Eryomin A. N., Usanov S. A. Acta biol. med. Germ., 1982, B. 41, S. 17.
66. Еремин А. Н., Метелица Д. И. Докл. АН СССР, 1982, т. 267, с. 221.
67. Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. Изв. АН БССР. Сер. хим., 1982, № 3, с. 65.
68. Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. Там же, 1982, № 4, с. 106.

69. *Erjomin A. N., Metelitz D. I.* Biochim. et Biophys. Acta, 1983, v. 732, p. 377.
70. *Метелица Д. И., Еремин А. Н., Маркина В. Л., Тарун Е. И.* В кн.: V Всесоюз. симп. по инженерной энзимологии. Кобулет: Олайне, 1985, с. 20.
71. *Enzyme-Immunoassay*/Ed. Maggio E. T. Boca Raton: CRC Press, 1983, p. 105.
72. *Дзантиев Б. Б., Егоров А. М.* Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1982, т. 27, с. 442.
73. *Гаврилова Е. М.* Там же, 1982, т. 27, с. 450.
74. *Подторак О. М., Чухрай Е. С.* В кн.: Биотехнология, т. 5./Под ред. Березина И. В. М.: Изд-во ВИНТИ, 1986, с. 50.
75. *Угарова Н. Н., Кутузова Г. Д.* Там же, 1986, с. 5.
76. *Jaenicke R.* Europ. J. Biochem., 1974, v. 46, p. 149.
77. *Jaenicke R., Rudolph R., Heider I.* Biochemistry, 1979, v. 18, p. 1217.
78. *Jaenicke R., Rudolph R., Heider I.* Biochem. Intern., 1981, v. 2, p. 23.
79. *Rudolph R., Heider I., Jaenicke R.* Biochemistry, 1977, v. 16, p. 5527.
80. *Rudolph R., Heider I., Wetschof E., Jaenicke R.* Biochemistry, 1977, v. 16, p. 3384.
81. *Муронец В. И., Наградова Н. К.* Иммуобилизованные олигомерные ферменты. М.: Наука, 1984, с. 26.
82. *Метелица Д. И.* Активация кислорода ферментными системами. М.: Наука, 1982. 254 с.
83. *Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К.* Успехи химии, 1984, т. 53, с. 545.
84. *Левашов А. В., Хмельницкий Ю. Л., Клячко Н. Л., Мартинек К.* В кн.: Биологические мембраны и мембранно-активные соединения/Под ред. Ташмухамедова Б. А. Ташкент: Фан, 1985, с. 39.
85. *Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л., Березин И. В.* Биол. мембраны, 1985, т. 2, с. 667.
86. *Еремин А. Н., Метелица Д. И.* Биохимия, 1985, т. 50, с. 102.
87. *Абакумова Е. Г., Левашов А. В., Березин И. В., Мартинек К.* Докл. АН СССР, 1985, т. 283, с. 136.
88. *Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И.* Прикл. биохимия и микробиология, 1979, т. 15, с. 861.
89. *Mohr P., Scheller F., Renneberg R., Kühn M., Pommering K., Schubert F., Scheller W.* In: Cytochrome P-450/Eds. Ruckpaul K., Rein H. Berlin: Akademie Verlag, 1984, p. 370.
90. *Метелица Д. И.* Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 1984, с. 248—291.
91. *Уваров В. Ю., Бачманова Г. И., Арчаков А. И., Сухомудренко А. Г., Мясоедова К. Н.* Биохимия, 1980, т. 45, с. 1463.
92. *Simpson R. B., Kauzman W.* J. Amer. Chem. Soc., 1953, v. 75, p. 5139.
93. *Gerlma S. Y. J.* Biochem., 1970, v. 14, p. 150.
94. *Kyte J. J.* Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 4157.
95. *Fernandez-Sörensen A., Carlsson D. M.* Ibid., 1971, v. 246, p. 3485.
96. *Gerlma S. Y., Stuor E. R.* Int. J. Pept. Protein Res., 1972, v. 4, p. 377.
97. *Donovan J. W.* J. Sci. Food Agric., 1977, v. 28, p. 571.
98. *Back J. F., Oakenfull D., Smith M. B.* Biochemistry, 1979, v. 18, p. 5191.
99. *Uedaira H., Uedaira H.* Bull. Chem. Soc. Japan, 1980, v. 53, p. 2451.
100. *Arakawa T., Timasheff S. N.* Biochemistry, 1982, v. 21, p. 6536.
101. *Arakawa T., Timasheff S. N.* Ibid., 1982, v. 21, p. 6545.
102. *Добрецов Г. Е., Бондаренко В. А., Белоус А. М.* Докл. АН УССР. Сер. Б, 1978, № 1, с. 59.
103. *Herskovitz T. T., Kelly T. M.* J. Phys. Chem., 1973, v. 77, p. 381.
104. *Bondi A.* Ibid., 1964, v. 68, p. 441.
105. *Norrish R. S.* Selected Tables of Physical Properties of Sugar Solutions. L.: Leatherhead, 1967.
106. *Морозова Т. Я., Морозов В. Н.* Биофизика, 1983, т. 28, с. 952.
107. *Tirri Z. J., Schmidt P. C., Pullarkat R. K.* Lipids, 1977, v. 12, p. 863.
108. *Zoelen E. J. J., Van Blok M. C., Staffen G. P., Lancee-Hermkens A. M. W., Henriques de Jesus C., Gier J. D.* Biochim. et Biophys. Acta, 1978, v. 511, p. 320.
109. *Ahkong Q. F., Fisher D., Tampion W., Lucy J. A.* Nature, 1975, v. 253, p. 194.
110. *Williams R. J., Harris D.* Cryobiology, 1977, v. 14, p. 670.
111. *Топчиева И. Н.* Успехи химии, 1980, т. 49, с. 494.
112. *Le Neveu D. M., Parsegian V. A., Gingell D.* Biophys. J., 1977, v. 18, p. 209.
113. *Финеан Дж., Колмэн Р., Мичелл Р.* Мембраны и их функции в клетке. М.: Мир, 1977, с. 140—155.
114. *Метелица Д. И.* Успехи соврем. биологии, 1982, т. 94, с. 345.
115. *Биохимическое исследование мембран/Под ред. Мэдди Э. М.* М.: Мир, 1979, с. 160.
116. *Брокерхоф Х., Дженсен Р.* Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978. 396 с.
117. *Takikawa O., Gomi T., Suhara K., Itagaki E., Takemori S., Katagiri M.* Arch. Biochem. Biophys., 1978, v. 190, p. 300.
118. *Sato H., Ashida N., Suhara K., Itagaki E., Takemori S., Katagiri M.* Arch. Biochem. Biophys., 1978, v. 190, p. 307.
119. *Helenius A., Simons K.* Biochim. et Biophys. Acta, 1975, v. 415, p. 29.
120. *Tanford C., Reynods J. A.* Ibid., 1976, v. 457, p. 133.
121. *Метелица Д. И., Еремин А. Н.* Успехи биологической химии, 1987, т. 28, с.
122. *Клебанов Г. И., Никушин Е. В., Владимиров Ю. А.* Биофизика, 1978, т. 23, с. 261.

123. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука, 1981. 291 с.
124. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран. М.: Наука, 1982. 222 с.
125. Ламри Р., Билтонен Р. В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул/Под ред. Тимашева С. Н., Фасмана Дж. Д. М.: Мир, 1973, с. 7.
126. Doherty D. G., Vaslow E. J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 931.
127. Лихтенштейн Г. И., Авилова Т. В. Успехи соврем. биологии, 1973, т. 75, с. 26.
128. Лихтенштейн Г. И. Биофизика, 1966, т. 11, с. 24.
129. Lumry R., Rajender S. Biopolymers, 1970, v. 9, p. 1125.
130. Akhrem A. A., Metelitz D. I., Belski S. M., Kiselev P. A., Shurko M. E., Usanov S. A. Croatica Chem. Acta, 1977, v. 49, p. 223.
131. Сухоруков Б. И., Лихтенштейн Г. И. Биофизика, 1965, т. 10, с. 935.
132. Лихтенштейн Г. И., Сухоруков Б. И. Журн. физ. хим., 1964, т. 38, с. 747.
133. Волькенштейн М. В. Конфигурационная статистика полимерных цепей. М.: Изд-во АН СССР, 1959. 466 с.
134. Zimm B. H., Bragg J. K. J. Chem. Phys., 1959, v. 31, p. 526.
135. Волькенштейн М. В. Биофизика, 1961, т. 6, с. 257.
136. Бириштейн Т. М., Птицын О. Б. Конформация макромолекул. М.: Наука, 1964. 391 с.
137. Птицын О. Б. Успехи биол. наук, 1970, т. 69, с. 26.
138. Привалов П. Л. Биофизика, 1985, т. 30, с. 722.

Институт биоорганической химии
АН БССР, Минск