



УДК 577.155.3.02

ИЗУЧЕНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА
ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ ИЗ *E. COLI*

I. КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Клесов А. А., Галаев И. Ю., Швидас В.-Ю. К.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет

Показано, что 6-аминопенициллановая и фенилуксусная кислоты, а также ряд алифатических и ароматических спиртов являются ингибиторами пенициллинамидазы из *E. coli*, причем с увеличением длины цепи алифатических спиртов тип ингибирования последовательно изменяется от конкурентного к неконкурентному. Субстраты пенициллинамидазы — бензилпенициллин и *p*-нитроанилид фенилуксусной кислоты связываются с разными участками активного центра фермента. Методом двухкомпонентного ингибирования показано, что топография активного центра пенициллинамидазы меняется в зависимости от структуры субстрата. В активном центре пенициллинамидазы имеется спектр участков связывания субстратов и эффекторов, как частично перекрывающихся, так и взаимонезависимых, причем отношения между ними зависят от природы субстрата.

Пенициллинамидаза (пенициллинамидогидролаза, КФ 3.5.1.11) помимо гидролиза пенициллинов катализирует превращение производных карбоновых кислот, таких, как 7-N-замещенные производные цефалоспориновых кислот [1—4], N-ацилированные L-аминокислоты со свободной карбоксильной группой [5—7], нитрофениловые эфиры [7] и анилиды карбоновых кислот [7, 8], фенилацетамид [8, 9] и N-метилфенилацетамид [9]. Наиболее специфическими субстратами пенициллинамидаз различного происхождения практически во всех случаях являются производные фенилуксусной или феноксуксусной кислот [10].

В последнее время пенициллинамидаза привлекает внимание исследователей и технологов в связи с возможным использованием ее для промышленного получения производных пенициллинового и цефалоспоринового рядов. Для практической реализации данных проектов чрезвычайно важно детальное изучение соответствующих ферментативных реакций.

В настоящей работе проведен детальный ингибиторный анализ топографии активного центра пенициллинамидазы из *E. coli*. В качестве ингибиторов использовали продукты ферментативного гидролиза бензилпенициллина — 6-аминопенициллановую и фенилуксусную кислоты, а также ряд алифатических и ароматических спиртов. Можно полагать, что изученные спирты практически не являются внешними нуклеофильными агентами [11, 12] в реакциях гидролиза, катализируемых пенициллинамидазой, и, следовательно, экспериментально определяемые значения констант ингибирования спиртами действительно отражают связующие свойства активного центра фермента. Об этом свидетельствует изменение

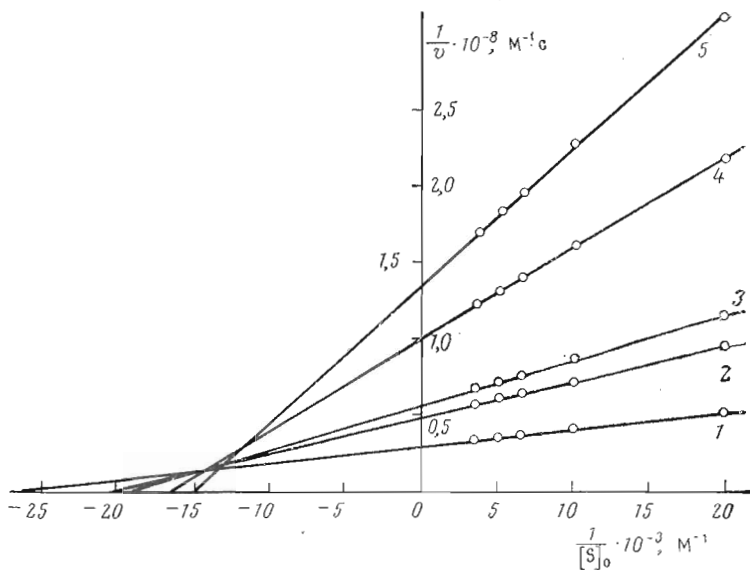
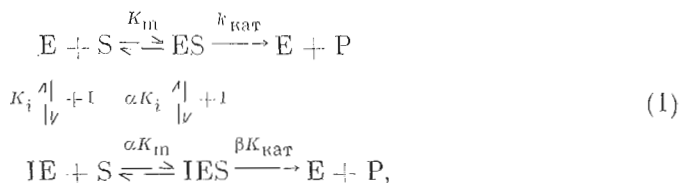


Рис. 1. Влияние амилового спирта на кинетику гидролиза *p*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой. Концентрации амилового спирта (мМ): 1 — 0; 2 — 4,2; 3 — 6,3; 4 — 14,7; 5 — 21,0

характера ингибирования (от конкурентного к неконкурентному) при удлинении углеводородной цепи спиртов * (см. ниже), а также сходство типов ингибирования пенициллинамидазы алифатическими спиртами и алкилборными кислотами [7], которые определенно не являются внешними нуклеофильными агентами.

*Влияние амилового спирта на кинетику гидролиза *p*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой.* Из рис. 1 видно, что амиловый спирт — это смешанный ингибитор ферментативного гидролиза, так как связывание его с пенициллинамидазой приводит к одновременному увеличению константы Михаэлиса и уменьшению максимальной скорости ферментативной реакции [15]. Поскольку реакции, катализируемые пенициллинамидазой, описываются двухстадийной схемой (при не слишком высоких концентрациях субстрата, см. [16]), общую схему смешанного ингибирования можно записать в следующем виде [15]:



где коэффициент α характеризует степень взаимозависимости связывания субстрата и ингибитора с активным центром фермента ($\alpha = 1$, взаимозависимость; $\alpha > 1$, антагонизм; $\alpha < 1$, синергизм), а коэффициент β — относительную реакционную способность тройного комплекса фермент—субстрат—ингибитор ($\beta < 1$ для всех случаев ингибирования).

* Характер ингибирования ферментативной активности в присутствии внешних нуклеофильных агентов зависит от соотношения констант скоростей отдельных стадий ферментативной реакции и постоянен для каждого отдельного субстрата [13, 14].

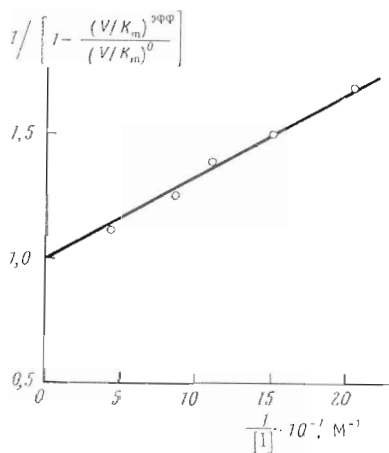


Рис. 2

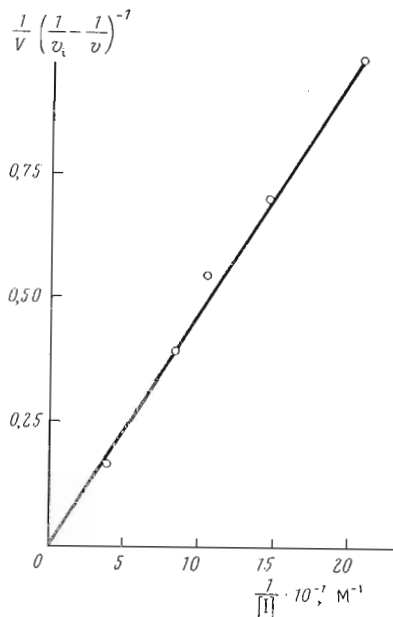


Рис. 3

Рис. 2. Определение константы ингибирования пенициллинамидазы амиловым спиртом в реакции гидролиза *n*-нитроанилида фенолуксусной кислоты (смешанный тип ингибирования)

Рис. 3. Определение степени взаимозависимости связывания субстрата и ингибитора для смешанного ингибирования амиловым спиртом гидролиза *n*-нитроанилида фенолуксусной кислоты ($1 \cdot 10^{-4}$ M), катализируемого пенициллинамидазой

Можно показать (см. [15]), что кинетика ферментативной реакции (1) в присутствии ингибитора смешанного типа подчиняется обычному уравнению Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{k_{\text{кат(эфф)}} [E]_0 [S]_0}{K_{\text{m(эфф)}} + [S]_0}, \quad (2)$$

в котором эффективные (зависящие от концентрации ингибитора) значения каталитической константы и константы Михаэлиса определяются выражениями

$$k_{\text{кат(эфф)}} = k_{\text{кат}} \frac{\alpha K_i + \beta [I]}{\alpha K_i + [I]}, \quad (3)$$

$$K_{\text{m(эфф)}} = \alpha K_m \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]}. \quad (4)$$

Чтобы определить, является ли тройной комплекс IES каталитически активным, выражения (3) и (4) можно привести к виду

$$\left(1 - \frac{k_{\text{кат(эфф)}}/K_{\text{m(эфф)}}}{k_{\text{кат}}/K_m}\right)^{-1} = \frac{\alpha}{\alpha - \beta} + \frac{\alpha K_i}{\alpha - \beta} \cdot \frac{1}{[I]}. \quad (5)$$

Если тройной комплекс IES каталитически неактивен ($\beta = 0$), то линейная зависимость левой части выражения (5) от обратной концентрации ингибитора должна пересекать ось ординат в точке, равной единице, что и наблюдается для случая ингибирования пенициллинамидазы амиловым

Смешанное ингибирование спиртами гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой из *E. coli*Для всех случаев коэффициент β (схема 1) равен 0

Ингибитор	$K_i \cdot 10^3, M$	$\alpha *$	Ингибитор	$K_i \cdot 10^3, M$	$\alpha *$
Метанол	600	9	<i>n</i> -Гептанол	1,2	—
Этанол	65	7	Циклогексанол	4,0	—
<i>n</i> -Пропанол	8,3	4	Бензиловый спирт	0,22	1
<i>n</i> -Бутанол	4,0	4	β -Фенилэтиловый спирт	0,17	—
<i>n</i> -Пентанол	3,8	2	Фенол	0,02	—
<i>n</i> -Гексанол	3,7	—			

* См. схему (1).

спиртом (рис. 2). Тангенс угла наклона прямой при этом численно равен константе ингибирования (K_i) ферментативной реакции.

Для определения коэффициента α (схема 1) был применен следующий подход. Можно показать, что при $\beta = 0$ (как в нашем случае) зависимость начальной скорости реакции от концентрации ингибитора имеет вид

$$\frac{1}{V} \left(\frac{1}{v_i} - \frac{1}{v} \right)^{-1} = \frac{\alpha K_i [S]_0}{\alpha K_m + [S]_0} \cdot \frac{1}{[I]}, \quad (6)$$

где V — максимальная скорость ферментативной реакции в отсутствие ингибитора; v_i — начальная скорость реакции (соответствующая начальной концентрации субстрата $[S]_0$) в присутствии ингибитора в концентрации $[I]$; v — скорость реакции в отсутствие ингибитора. Изображая графически зависимость левой части выражения (6) от обратной концентрации ингибитора, получим прямую, выходящую из начала координатных осей (рис. 3). Зная величины K_m и K_i , можно найти численное значение коэффициента α (схема 1).

Для ингибирования амиловым спиртом гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой, α равно 2. Другими словами, связывание амилового спирта с активным центром пенициллинамидазы ($K_i = 3,8 \cdot 10^{-3} M$) полностью блокирует ферментативную активность, но всего лишь в 2 раза ухудшает связывание фермента с субстратом — *n*-нитроанилидом фенилуксусной кислоты. Очевидно, сорбционные участки активного центра фермента, ответственные за связывание субстрата и ингибитора, практически не перекрываются, т. е. являются в значительной степени взаимонезависимыми.

Изучение алифатических и ароматических спиртов в качестве ингибиторов пенициллинамидазы. Чтобы выяснить влияние структуры спиртов на степень взаимозависимости участков связывания субстрата и ингибитора в активном центре фермента, было изучено ингибирование пенициллинамидазы серией алифатических спиртов от метанола до *n*-гептанола, а также рядом ароматических спиртов (табл. 1). Логично было бы предположить, что при увеличении размера гидрофобного радикала молекулы спирта будет происходить увеличение конкуренции субстрата и ингибитора в связывании с активным центром фермента, т. е. α должно было бы возрастать при переходе от метанола к бензиловому спирту. Однако на практике была обнаружена обратная зависимость: с увеличением размера молекулы спирта конкуренция его с субстратом в связывании на активном центре уменьшалась. В то время как связывание метанола с ферментом почти на порядок ухудшает последующее связывание субстрата, т. е. ингибирование носит практически конкурентный характер, комплекс

Таблица 2

Влияние фенилуксусной кислоты на кинетические параметры гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой

[Фенилуксусная кислота] · 10 ³ , М	$K_m \cdot 10^3$, М	$V \cdot 10^3$, М · с ⁻¹	$V/K_m \cdot 10^4$, с ⁻¹
0	4,3±0,2	4,0±0,1	9,1±0,1
7	5,4±0,5	2,6±0,2	4,9±0,1
10,6	6,1±0,6	2,1±0,1	3,45±0,04
13,8	7,5±0,7	1,7±0,1	2,26±0,02
20,8	10,3±0,8	1,4±0,1	1,36±0,02

фермента с бензиловым спиртом связывает субстрат в той же степени, что и свободный фермент (чисто неконкурентный характер ингибирования).

Этот факт представляется в высшей степени удивительным и свидетельствует о сложной организации активного центра пенициллинамидазы. По-видимому, в активном центре фермента участок связывания субстрата (*n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты) и каталитический участок пространственно разделены. Участок связывания спиртов, имеющий гидрофобную природу (о чем свидетельствует тенденция к уменьшению константы диссоциации комплекса фермент — ингибитор с увеличением гидрофобности неполярного радикала спирта, см. табл. 1), должен располагаться вблизи каталитических групп активного центра, так как при связывании спиртов с активным центром происходит блокирование ферментативной активности пенициллинамидазы ($\beta = 0$) при незначительной конкуренции со связыванием субстрата. Можно полагать, что при переходе к более гидрофобным спиртам происходит дальнейшее формирование участка связывания ингибитора, так что в случае высших спиртов (табл. 1) участки связывания субстрата и ингибитора в активном центре уже практически полностью взаимонезависимы. По-видимому, этот эффект «принудительного» дополнительного расчленения сорбционного и каталитического участков активного центра пенициллинамидазы и является причиной потери ферментативной активности при связывании со спиртами. Важно подчеркнуть, что изменение конкурентного характера ингибирования на неконкурентный при увеличении размера ингибитора указывает на динамическую структуру активного центра фермента.

Влияние фенилуксусной кислоты на кинетику гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой. Продукт ферментативного гидролиза, фенилуксусная кислота, представляет собой смешанный ингибитор пенициллинамидазы (табл. 2). Анализ кинетических данных показал, что, как и в случае ингибирования амиловым спиртом, в этом случае тройной комплекс фермент—субстрат—ингибитор каталитически неактивен ($\beta = 0$, схема 1), в то время как значения коэффициента α и константы ингибирования равны 3 и $5,1 \cdot 10^{-5}$ М соответственно.

Так как в реакции гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой, фенилуксусная кислота является полностью конкурентным ингибитором [16, 17] и ингибирующие свойства ее выражены в большей степени ($K_i = 1 \cdot 10^{-5}$ М в аналогичных условиях [17]), чем в реакции гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, можно заключить, что как характер, так и эффективность ингибирования пенициллинамидазы фенилуксусной кислотой изменяются при переходе от одного субстрата к другому.

Данный факт убедительно свидетельствует о том, что в активном центре пенициллинамидазы участки связывания бензилпенициллина, с одной стороны, и *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты — с другой, раз-

Смешанное ингибирование спиртами гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой
Для всех случаев коэффициент β (схема 1) равен 0

Ингибитор	$K_i \cdot 10^3, M$	α^*	Ингибитор	$K_i \cdot 10^3, M$	α^*
Метанол	8000	—	<i>n</i> -Бутанол	16	6
Этанол	1000	15	<i>n</i> -Пентанол	8,8	2,5
<i>n</i> -Пропанол	15	10	Бензиловый спирт	5,0	—

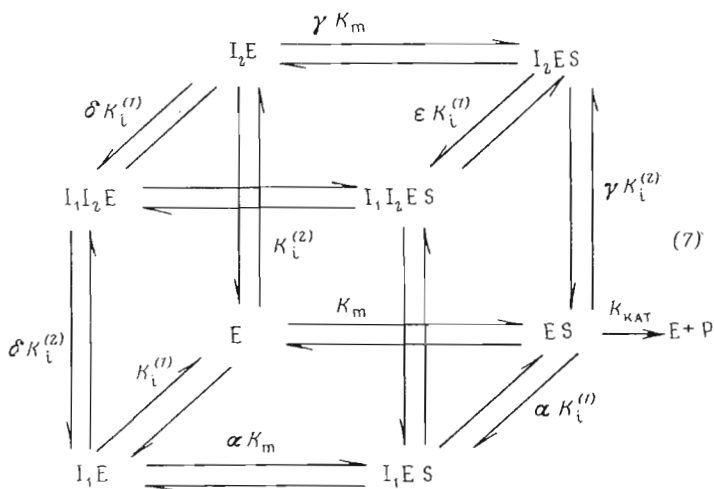
* См. схему (1).

личны. Поскольку определяемые значения констант ингибирования пенициллинамидазы фенилуксусной кислотой характеризуют в обоих случаях взаимодействии ингибитора со свободной формой фермента (схема 1), следует также заключить, что и субстрат, в свою очередь, принимает участие в формировании участка связывания ингибитора (продукта ферментативной реакции) с активным центром, причем свойства этого участка сохраняются некоторое время и после десорбции субстрата с фермента. Другими словами, единственной подходящей интерпретацией зависимости константы связывания ингибитора со свободным ферментом от структуры субстрата является допущение о динамической, релаксационной природе активного центра фермента. Этот вопрос уже неоднократно обсуждался в литературе (см., например, [18, 19]), однако до настоящего времени не было найдено убедительных доказательств изменений в свойствах активного центра свободного фермента в зависимости от структуры субстрата.

Естественно, альтернативным вариантом объяснения наблюдаемых эффектов является то, что кинетика действия пенициллинамидазы не описывается схемой (1) и наблюдаемые линейные зависимости, полученные при обработке экспериментальных данных в рамках данной схемы, случайны. Однако в настоящее время нет оснований принять этот вывод. Более того, формальный переход от двухстадийной схемы катализа (1) к многостадийной не может повлиять на интерпретацию результатов настоящей работы, так как во всех случаях анализ отношения $k_{кат}/K_m$ должен приводить к характеристикам (например, константам ингибирования), относящимся к свободной форме фермента.

Если предположение о том, что структура субстрата влияет как на характер, так и на эффективность связывания ингибиторов с пенициллинамидазой, верно, то влияние спиртов на кинетику ферментативного гидролиза бензилпенициллина может отличаться от их влияния на гидролиз *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты (см. выше). Действительно, как видно из сопоставления табл. 1 и 3, связывание спиртов со свободным ферментом существенно менее эффективно в реакции гидролиза бензилпенициллина, чем при гидролизе *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты.

Двухкомпонентное ингибирование пенициллинамидазы. Выше мы указывали на то, что участок связывания спиртов в активном центре пенициллинамидазы имеет гидрофобную природу. Можно полагать, что участок связывания фенилуксусной кислоты также гидрофобен [7, 16]. Для того чтобы выяснить, являются ли эти участки общими для обоих типов эффекторов, в настоящей работе был применен кинетический метод двухкомпонентного обратимого ингибирования фермента [15] фенилуксусной кислотой и амиловым спиртом. Так как в качестве субстрата использовали *n*-нитроанилид фенилуксусной кислоты, в реакции гидролиза которого оба ингибитора являются смешанными (рис. 1, табл. 1), общая схема реакции в присутствии двух ингибиторов может быть представлена в виде



Данная схема учитывает теоретическую возможность образования смешанных комплексов фермента с субстратом и обоими ингибиторами, а также возможных комбинаций фермента, субстрата и одного из ингибиторов. Можно показать, что кинетика реакции (7) описывается простым уравнением Михаэлиса — Ментен (2), эффективные кинетические параметры которого определяются выражениями

$$k_{\text{кат(эфф)}} = \frac{k_{\text{кат}}}{1 + \frac{[I_1]}{\alpha K_i^{(1)}} + \frac{[I_2]}{\gamma K_i^{(2)}} + \frac{[I_1][I_2]}{\gamma \epsilon K_i^{(1)}/K_i^{(2)}}}, \quad (8)$$

$$K_{\text{м(эфф)}} = K_{\text{м}} \frac{1 + \frac{[I_1]}{K_i^{(1)}} + \frac{[I_2]}{K_i^{(2)}} + \frac{[I_1][I_2]}{\delta K_i^{(1)}K_i^{(2)}}}{1 + \frac{[I_1]}{\alpha K_i^{(1)}} + \frac{[I_2]}{\gamma K_i^{(2)}} + \frac{[I_1][I_2]}{\gamma \epsilon K_i^{(1)}K_i^{(2)}}}. \quad (9)$$

После преобразований выражений (8) и (9) получаем

$$\frac{k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}}{k_{\text{кат(эфф)}}/K_{\text{м(эфф)}}} = 1 + \frac{[I_1]}{K_i^{(1)}} + \frac{[I_2]}{K_i^{(2)}} \left(1 + \frac{[I_1]}{\delta K_i^{(1)}}\right). \quad (10)$$

Как видно из анализа зависимостей констант скоростей второго порядка от концентрации обоих ингибиторов, в выражение (10) входит лишь один коэффициент δ , характеризующий степень конкуренции (степень взаимозависимости) между двумя ингибиторами в связывании с активным центром фермента. Если δ равно 1, центры связывания двух ингибиторов взаимонезависимы. Если же $\delta > 1$ или $\delta < 1$, то на практике должен наблюдаться антагонизм или синергизм между ингибиторами при их связывании с ферментом. Как видно из рис. 4, амиловый спирт и фенилуксусная кислота конкурируют в связывании одного и того же участка активного центра пенициллинамидазы и величина коэффициента δ в этом случае намного превосходит единицу.

Перекрестный метод двухкомпонентного ингибирования пенициллинамидазы в реакции гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты был применен также с использованием следующих пар ингибиторов: а) 6-аминопенициллановая и фенилуксусная кислоты, б) 6-аминопенициллановая кислота и амиловый спирт, в) 6-аминопенициллановая кислота и пропиловый спирт. В первом случае было найдено, что 6-аминопенициллановая и фенилуксусная кислоты являются взаимозависимыми инги-

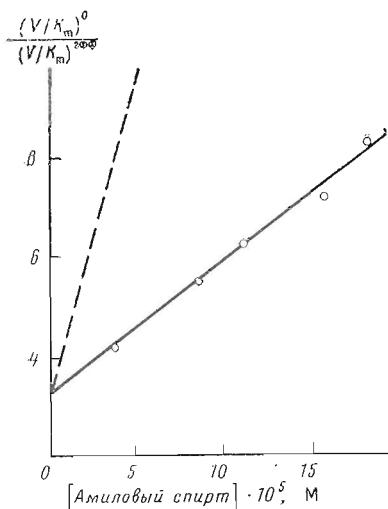


Рис. 4. Влияние двух взаимозависимых ингибиторов — амилового спирта и фенилуксусной кислоты ($1,4 \cdot 10^{-4}$ М) — на скорость гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой. Пунктирная линия соответствует альтернативному механизму взаимонезависимого ингибирования ($\delta = 1$, схема 7). Сплошная линия является теоретической для $\delta > 20$

биторами пенициллинамидазы. Этот факт представляется несколько неожиданным, так как данные соединения образуются при ферментативном гидролизе бензилпенициллина и должны занимать разные участки активного центра фермента. Кроме того, фенилуксусная кислота — конкурентный, а 6-аминопенициллановая кислота — неконкурентный ингибитор пенициллинамидазы в реакции гидролиза бензилпенициллина. Необходимо отметить, что в реакции ферментативного гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты оба эти ингибитора являются смешанными (для ингибирования 6-аминопенициллановой кислотой $\alpha = 2$, $K_i = 7,1 \cdot 10^{-3}$ М, $\beta = 0$). По-видимому, эти данные можно рассматривать как дополнительное подтверждение того, что пространственная организация активного центра пенициллинамидазы различается при гидролизе различных субстратов.

Поскольку амиловый спирт и фенилуксусная кислота, так же как 6-аминопенициллановая и фенилуксусная кислоты, являются несовместимыми ингибиторами, можно было бы ожидать, что в свою очередь амиловый спирт и 6-аминопенициллановая кислота также будут несовместимыми ингибиторами. Однако двухкомпонентное ингибирование показало, что амиловый спирт и 6-аминопенициллановая кислота образуют тройной комплекс с ферментом и участки их связывания лишь отчасти взаимозависимы ($\delta = 2,7$, схема 7). Наконец, пропиловый спирт и 6-аминопенициллановая кислота также образуют тройной комплекс с ферментом ($\delta = 2,4$).

Все эти данные свидетельствуют о том, что активный центр пенициллинамидазы представляет собой сложное образование, изменяющее свою топографию в зависимости от структуры субстрата, в присутствии которого проводится кинетический анализ. Наконец, активный центр пенициллинамидазы имеет в своем составе целый спектр участков связывания субстратов и эффикторов, как частично перекрывающихся, так и взаимонезависимых, причем отношения между ними также зависят от природы субстрата.

Экспериментальная часть

Характеристики препарата пенициллинамидазы из *E. coli*, а также бензилпенициллина (калиевая соль), 6-аминопенициллановой и фенилуксусной кислот приведены в работе [16]. *n*-Нитроанилид фенилуксусной кислоты был синтезирован на кафедре химической энзимологии МГУ Т. Е. Васильевой по стандартной методике [20].

Кинетику ферментативного гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты изучали с использованием скоростного 16-канального анализатора GEMSAEC (Electronucleonics, США) при длине волны 400 нм. Прибор работает в режиме автоматического заполнения спектрофотометрических ячеек (15 рабочих кювет и одна кювета сравнения) исходными растворами, измерения кинетики выделения продукта одновременно в 15 кюветах, обработки экспериментальных данных и вывода их на печать. Тefлоновый ротор прибора с 16 ячейками, разделенными на три камеры, первоначально заполняется с помощью четырех шприцев (объем от 0,02 до 1 мл), причем растворы фермента и субстрата помещаются в камеры, отделенные друг от друга. После заполнения ячеек ротор помещают в измерительный блок, где при быстром вращении содержимое камер выдавливается в соответствующие кюветы прибора, дополнительно перемешивается пробулькиванием воздуха, после чего начинается регистрация кинетической кривой. В каждой кювете возможно определение до 20 значений оптической плотности раствора с постоянными (заранее заданными) интервалами времени. Полученные данные изменения оптической плотности во времени в каждой кювете поступают в компьютер РДР/8Е, обрабатываются по составленной программе, и соответствующие значения начальных скоростей ферментативной реакции выводятся на печать. Для учета «мертвого» времени реакции (для GEMSAEC оно составляет 26 с) прибор приводит учет протекания реакции до начала регистрации по специальной программе, основываясь на первых измерениях оптической плотности раствора и величине коэффициента экстинкции продукта реакции. Обработку экспериментальных данных и расчет средних квадратичных ошибок кинетических параметров проводили по программам, составленным сотрудником кафедры химической энзимологии МГУ А. С. Белоусовым.

Типичный эксперимент осуществляли, создавая в реакционной смеси необходимую концентрацию ингибитора (или двух ингибиторов в случае двухкомпонентного ингибирования). Растворы субстратов готовили в диметилсульфоксиде и добавляли при заполнении такой объем, чтобы концентрация растворителя в системе была равна 1%. Кинетические эксперименты проводили при 25°, рН 7 (0,1 М фосфатный буфер).

Кинетику ферментативного гидролиза бензилпенициллина изучали с использованием регистрирующего рН-стата (Radiometer ТТТ-1с, Дания) титрованием щелочью (0,01 и КОН) образующейся в реакции фенилуксусной кислоты. Все эксперименты проводили при температуре $25 \pm 0,2^\circ$ в 0,1 М растворе КСl при рН 7 и 7,5 в безбуферной среде. Опыты проводили в токе азота, используя ячейку объемом 20 мл. Во всех опытах вели контроль за неферментативным гидролизом и в случае необходимости вводили поправку. Типичный эксперимент осуществляли следующим образом: раствор фермента и ингибитора выдерживали при рН 7 или 7,5 при перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой ячейке 3—5 мин, затем в ячейку вводили 0,1 мл раствора бензилпенициллина и через 10—15 с начинали запись кривой титрования. Так как константа Михаэлиса гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой, имеет крайне низкое значение ($3,1 \cdot 10^{-6}$ М [16]), кинетический анализ обычно проводили с использованием полных кинетических кривых [16, 20]. При регистрации полных кривых реакция практически заканчивалась через 10—20 мин в зависимости от концентрации фермента и ингибитора. Константы ингибирования оказались одинаковыми при рН 7 и 7,5.

Авторы благодарят чл.-кор. АН СССР проф. И. В. Березина за интерес и постоянную помощь в работе, а также проф. Е. М. Савицкую и П. С. Ныс за любезное предоставление препарата пенициллинамидазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Huang H. T., Seto T. A., Shull G. M. (1963) *Appl. Microbiol.*, **11**, 1—6.
2. Sjöberg B., Nathorst-Wesfelt L., Ortengren B. (1967) *Acta chem. scand.*, **21**, 547—551.
3. Cole M. (1969) *Biochem. J.*, **115**, 733—739.
4. Швядас В. К., Клесов А. А., Ныс П. С., Савицкая Е. М., Березин И. В. (1976) *Антибиотики*, **21**, 698—704.
5. Lucente G., Romeo A., Rossi D. (1965) *Experientia*, **21**, 317—324.
6. Cole M. (1969) *Biochem. J.*, **115**, 741—745.
7. Швядас В. К. (1976) Канд. дис. «Кинетика и механизм действия пенициллин-амидазы», М.
8. Kutzbach C., Rauenbusch H. (1974) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **354**, 45—53.
9. Chiang D., Bennett R. E. (1967) *J. Bacteriol.* **93**, 302—308.
10. Каррингтон Т. Р. (1972) *Антибиотики*, **17**, 197—204.
11. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клесов А. А. (1971) *Биохимия*, **36**, 108—117.
12. Клесов А. А., Андреев В. М., Березин И. В. (1974) *Биохимия*, **39**, 1222—1230.
13. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. (1971) *FEBS Lett.*, **15**, 121—124.
14. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) *Int. J. Chem. Kinet.*, **6**, 801—811.
15. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, с. 77—111, Изд. МГУ.
16. Березин И. В., Клесов А. А., Швядас В. К., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1974) *Антибиотики*, **19**, 880—887.
17. Березин И. В., Клесов А. А., Марголин А. Л., Ныс П. С., Савицкая Е. М., Швядас В. К. (1976) *Антибиотики*, **21**, 411—415.
18. Rosenberry T. L. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3834—3838.
19. Waker E. J., Ralston G. B., Darvey I. G. (1975) *Biochem. J.*, **147**, 425—433.
20. Helferich B., Böshagen H. (1959) *Chem. Ber.*, **92**, 2813—2827.
21. Клесов А. А., Березин И. В. (1972) *Биохимия*, **37**, 170—183.

Поступила в редакцию
4.XI.1976

STUDY OF THE ACTIVE CENTER TOPOGRAPHY OF PENICILLIN AMIDASE FROM *E. COLI*. I. A KINETIC ANALYSIS

KLYOSOV A. A., GALAEV I. Yu., SHVYADAS V. K.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

A detailed inhibitory analysis of the active center topography of penicillin amidase from *E. coli* has been performed. The products of enzymatic hydrolysis of benzylpenicillin, 6-aminopenicillanic acid and phenylacetic acid, as well as a number of aliphatic and aromatic alcohols have been used as inhibitors. Almost all the compounds under study reveal the mixed-type inhibition, and with increasing of the chain-length of aliphatic alcohols the type of inhibition changes from purely competitive to non-competitive. Using the method of two-component inhibition, it has been shown that the penicillin amidase active center has a complex structure, and its topography changes with a variation of a substrate structure. Besides, the penicillin amidase active center has a number of binding sites for substrates and effectors, whereupon spatial interrelationships between them depend on the substrate structure.