



ной среде (см. рис. 2, 2). При этой же температуре и рН 7,4 снята зависимость скорости реакции от концентрации НАДФ·Н<sub>2</sub> (см. рис. 1, 2), из которой следует, что в отсутствие НАДФ·Н<sub>2</sub> реакция не идет, а при концентрациях НАДФ·Н<sub>2</sub>, больших 0,003 мол/л, скорость реакции достигает постоянной величины.

При 37° найдены оптимальные значения рН для двух буферов — фосфатного и трис-НСI: максимальные скорости реакции достигаются при работе с трис-НСI-буфером, рН 8,14 (см. рис. 3, 1).

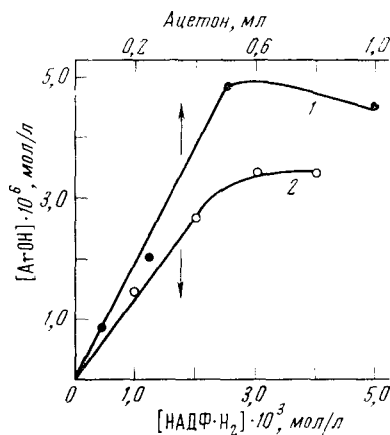


Рис. 1

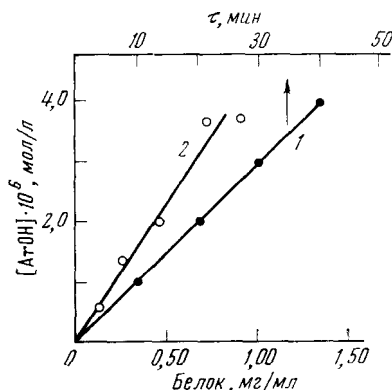


Рис. 2

Рис. 1. Влияние на реакцию содержания ацетона (1) и концентрации НАДФ·Н<sub>2</sub> (2) в инкубационной смеси при 37°, рН 7,4. 1 — 0,96 мг на 1 мл белка, [НАДФ·Н<sub>2</sub>] = 0,002 мол/л, [AgH] = 0,001 мол/л; 2 — 0,50 мг на 1 мл белка 1 мл ацетона, [AgH]<sub>0</sub> = 5 · 10<sup>-4</sup> мол/л

Рис. 2. Влияние времени инкубации (1) и концентрации белка (2) на реакцию. 1 — 30°, рН 7,4, [AgH]<sub>0</sub> = [НАДФ·Н<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 0,001 мол/л; 2 — 37°, те же условия

При 20–37° изучены зависимости скорости реакции от начальной концентрации AgH (см. рис. 4). Эти зависимости хорошо описываются уравнением Михаэлиса — Ментен. Из спрямлений кривых по уравнению Лайкуивера — Берка (см. рис. 4) были вычислены значения констант Михаэлиса  $K_M$  и констант скорости распада фермент-субстратного комплекса  $k_2$ .

Таблица 1

Величины констант Михаэлиса и констант скорости распада фермент-субстратного комплекса  $k_2$

$t, ^\circ\text{C}$	$k_2 \cdot [E]_0 \cdot 10^9$ , мол/л·сек	$k_2 \cdot 10^2$ , сек <sup>-1</sup>	$K_M \cdot 10^4$ , мол/л
20	2,22	0,55	0,60
25	3,85	0,96	0,85
30	5,88	1,47	0,80
37	8,33	2,08	1,58

Таблица 2

Сравнение констант Михаэлиса при микросомальном гидроксигировании

Субстрат	$t, ^\circ\text{C}$	рН	$K_M$ мол/л	Литературный источник
Нафталин	37	8,14	1,58 · 10 <sup>-4</sup>	Данная работа
Октадекан	37	7,50	0,80 · 10 <sup>-4</sup>	(8)
Декан	37	8,10	5,00 · 10 <sup>-4</sup>	(9)
Деканоат	37	8,10	2,60 · 10 <sup>-3</sup>	(10)

Все эти зависимости получены при работе с содержанием микросомального белка 0,512 мг/мл, причем 1 мг белка содержит 0,8 нмоля цитохрома Р-450, что хорошо согласуется с литературными данными (5). Мольная концентрация цитохрома Р-450 составляла в наших опытах 4,0 · 10<sup>-7</sup> мол/л. Величины констант  $k_2$  были получены с использованием этого значения

$[E]_0 = 4,0 \cdot 10^{-7}$  мол/л. В табл. 1 представлены значения  $K_M$  и  $k_2$  для разных температур.

Зависимость констант скорости  $k_2$  от температуры в интервале 20–30° хорошо описывается уравнением Аррениуса, по которому вычислена энергия активации распада фермент-субстратного комплекса, равная 18,0 ккал/моль. Константа скорости распада фермент-субстратного комплекса равна  $1,50 \cdot 10^{11} \exp(-18000/RT)$  сек<sup>-1</sup>. Активационные параметры

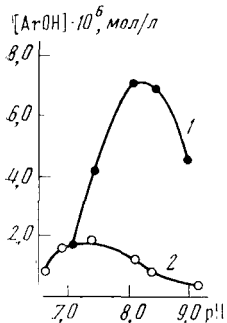


Рис. 3

Рис. 3. Влияние рН на реакцию при 37°,  $[ArH]_0 = [НАДФ \cdot Н_2] = 0,001$  мол/л и концентрации белка 0,85 мг/мл. 1 – трис-НСI-буфер, 2 – фосфатный буфер

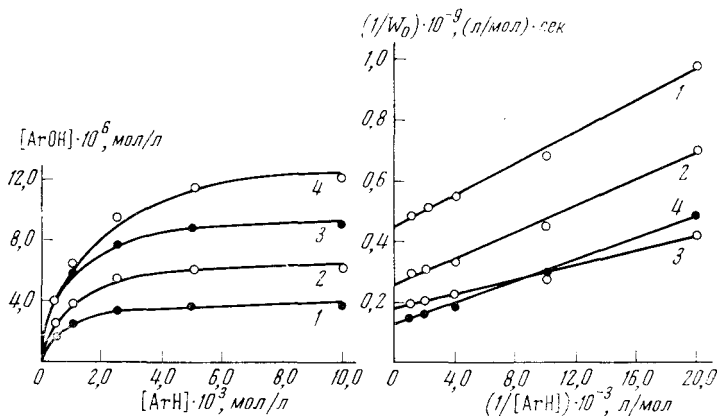


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость скорости реакции от концентрации  $[ArH]_0$  при рН 8,14,  $[НАДФ \cdot Н_2] = 0,001$  мол/л и концентрации белка 0,512 мг/мл при разных температурах. 1 – 20°, 2 – 25°, 3 – 30°, 4 – 37°

распада фермент-субстратного комплекса при 30° составляют:  $\Delta H^\ddagger = -17,4$  ккал/моль,  $\Delta S^\ddagger = -9,50$  кал/мол·град. При температурах выше 30° наблюдается отклонение от уравнения Аррениуса в сторону снижения энергии активации реакции.

Специальными опытами при 37°, рН 8,14 и  $[ArH]_0 = 5 \cdot 10^{-4}$  мол/л было показано, что донор электронов НАДФ·Н<sub>2</sub> в наших условиях может быть успешно заменен НАДФ в сочетании с глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой и глюкозо-6-фосфатом в виде натриевой соли: 0,001 мол/л НАДФ +  $2,5 \cdot 10^{-3}$  мол/л Г-6-Ф-На +  $5,0 \cdot 10^{-3}$  мг/мл Г-6-Ф-дегидрогеназы обеспечивают ту же скорость реакции, что НАДФ·Н<sub>2</sub> в концентрации 0,001 мол/л. В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что ферментная система микросом печени превращает нафталин, так же как и другие ароматические системы, в эпоксид (2, 6), который затем спонтанно или под действием ионов Н<sup>+</sup> превращается в α-нафтол. Полученные нами кинетические и термодинамические параметры, характеризующие накопление α-нафтола из нафталина, относятся к ферментативной стадии реакции, а не к неэнзиматическому превращению 1,2-нафталинокиси в α-нафтол. Этот вывод подкрепляется полученными недавно кинетическими данными, характеризующими ароматизацию аренокисей (7). Согласно (7), при 30° в водной среде нафталинокисл превращается в α-нафтол с константой скорости  $k_{эфф} = (3,0 \cdot 10^{-3} + 470 \cdot [H^+])$  сек<sup>-1</sup>. После добавления в наших опытах в инкубационную смесь трихлоруксусной кислоты  $[H^+] = 0,1$ , и, следовательно,  $k_{эфф} = 0,003 + 470 \cdot 0,1 = 47,003$  сек<sup>-1</sup>. Таким образом,  $k_{эфф}$  больше, чем на три порядка, превышает значение константы скорости распада фермент-субстратного комплекса (см. табл. 1).

Величина  $\Delta S^\ddagger = -9,5$  кал/мол·град свидетельствует о том, что процесс активации фермент-субстратного комплекса характеризуется образованием новых связей, прежде чем произойдет его распад до продуктов ре-

акции. Представляет большой интерес сравнить между собой значения констант Михаэлиса, полученные в нашей работе, с величинами, установленными для других субстратов в идентичных условиях (табл. 2).

Из табл. 2 следует, что сродство фермента с субстратом максимально для октадекана, несколько ниже для нафталина и еще ниже для декана. Константа Михаэлиса для декааноата представляется нам сильно завышенной. Для субстратов, перечисленных в табл. 2, не приходится констатировать каких-либо специфических взаимодействий с ферментом, так как константы Михаэлиса мало отличаются одна от другой. Окончательный ответ о природе фермент-субстратного взаимодействия даст лишь непосредственное изучение физико-химических свойств самого фермент-субстратного комплекса.

Институт биоорганической химии  
Академии наук БССР  
Минск

Поступило  
15 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. Booth, E. Boyland, *Biochem. J.*, v. 70, 681 (1958). <sup>2</sup> D. M. Jerina, J. W. Daly et al., *J. Am. Chem. Soc.*, v. 90, 6529 (1968). <sup>3</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, v. 193, 265 (1951). <sup>4</sup> T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, v. 239, 2379 (1964). <sup>5</sup> R. Estabrook, N. Holowinsky, *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, v. 9, 19 (1961). <sup>6</sup> D. M. Jerina, I. W. Daly, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 90, 6523 (1968). <sup>7</sup> G. J. Kasperek, T. C. Bruce, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 94, 198 (1972). <sup>8</sup> Л. М. Райzman, В. С. Белова и др., *Биохимия*, т. 36, 674 (1971). <sup>9</sup> K. Ichihara, E. Kusunose, M. Kusunose, *Biochim. et biophys. acta.* v. 176, 713 (1969). <sup>10</sup> K. Ichihara, E. Kusunose, M. Kusunose, *Biochim. et biophys. acta.*, v. 176, 704 (1969).