

К. М. БЕНДЕЦКИЙ, В. Л. ЯРОВЕНКО

ОБ АНОМАЛЬНОЙ КИНЕТИКЕ ПРИ МЕХАНИЗМЕ ДВУХТАКТНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 27 V 1975)

При трансферазных реакциях сахаридов часто имеет место такое состояние, при котором субстрат-донор является одновременно косубстратом-акцептором. Такая возможность реализуется при ферментативном трансглюкозилировании полисахаридов ⁽¹⁾ и олигосахаридов ^(2, 3) в условиях, когда концентрация субстрата превосходит концентрации продуктов (начальные этапы превращения субстрата). В частности, при трансглюкозилировании мальтозы фермент переносит глюкозил от одной молекулы мальтозы на другую. В этих условиях уравнение скорости, отвечающее механизму двухтактного замещения («пинг-понг»-механизм) для различных субстрата S_1 и косубстрата S_2

$$v_r = \frac{V_m[S_1][S_2]}{K_2[S_1] + K_1[S_2] + [S_1][S_2]}$$

(V_m — максимальная скорость ферментативного переноса остатка от S_1 к S_2 , K_1 и K_2 — донорная и акцепторная константы равновесия), превращается в уравнение вида Михаэлиса — Ментен для одного субстрата, $S_{1,2}$:

$$v_r = \frac{V_m[S_{1,2}]}{K_1 + K_2 + [S_{1,2}]}, \quad (1)$$

где $S_1 = S_2 = S_{1,2}$.

Однако экспериментальные данные показывают, что зависимость начальной скорости трансглюкозилирования мальтозы v_r от ее начальной концентрации $[S_{1,2}]$ описывается сигмоидной кривой ^(1, 4). Аномальную кинетику трансглюкозилирования мальтозы можно объяснить, опираясь на механизм с образованием тройного комплекса. Уравнение, отвечающее этому механизму для различных субстрата и косубстрата

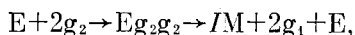
$$v_r = \frac{V_m[S_1][S_2]}{K_1'K_2 + K_2[S_1] + K_1[S_2] + [S_1][S_2]} \quad (2)$$

(K_1' — константа диссоциации комплекса фермента с субстратом ES_1). Если $S_1 = S_2 = S_{1,2}$, то

$$v_r = \frac{V_m[S_{1,2}]^2}{K_1'K_2 + (K_1 + K_2)[S_{1,2}] + [S_{1,2}]^2}. \quad (3)$$

Кривая, выражаемая уравнением (3), имеет точку перегиба и таким образом формально отвечает зависимости $v_r([S_{1,2}])$, наблюдаемой при трансглюкозилировании мальтозы.

Образование тройного комплекса вида Eg_2g_2 (g_2 — мальтоза) соответствует представлению Сугавара, который наблюдал, что первичным продуктом превращения мальтозы при действии на нее трансглюкозилазы из *Aspergillus oryzae* была изомальтоза ⁽⁵⁾. Наиболее вероятный путь превращения мальтозы в этих условиях:



где IM — изомальтоза, g_1 — глюкоза. Возможность образования тройного комплекса при трансглюкозилировании субстратов кислой α -глюкозидазой из мышцы кролика обсуждалась Палмером ⁽¹⁾, который выдвинул предположение о существовании у фермента донорного и акцепторного активных центров. Взаимодействие этих центров определяет образование тройного комплекса и объясняет немихаэлисову кинетику трансглюкозилирования мальтозы. Однако работы Палмера и ряда других исследователей ^(1-3, 4, 5) показали, что первичными продуктами трансглюкозилирования мальтозы являются триозы. Хотя первичное образование триоз можно рассматривать в рамках механизма с образованием тройного комплекса, более вероятным в этих условиях представляется механизм с замещением фермента («пинг-понг»-механизм), который отражается следующими уравнениями:

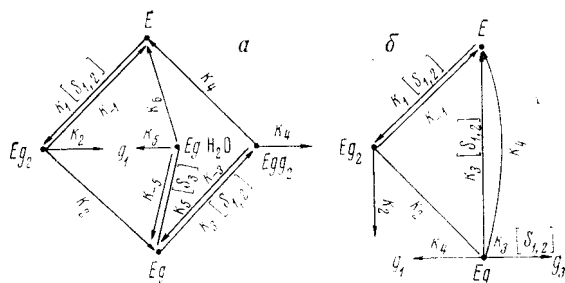
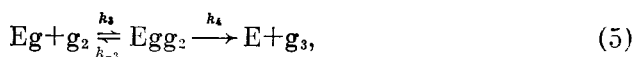
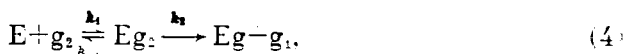
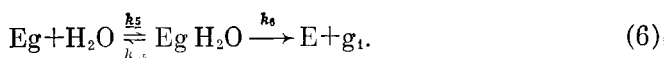


Рис. 1. Графы для трансглюкозилирования и гидролиза мальтозы в рамках механизма двухтактного замещения. a — полный граф; b — граф, не учитывающий образование комплексов фермента с косубстратами. g_1, g_3 — продукты реакции — глюкоза и триоза соответственно; Eg_2 — комплекс фермента с мальтозой; Eg — замещенная форма фермента (фермент — глюкозил); Egg_2 и EgH_2O — комплексы замещенной формы фермента с косубстратами — мальтозой и водой соответственно



где g_3 — триоза, Eg_2 — комплекс фермента с мальтозой, Eg — замещенная форма фермента (фермент-глюкозил), Egg_2 — комплекс замещенной формы фермента с мальтозой. В уравнениях (4) и (5) отражены первые этапы превращения мальтозы, когда $[g_2] \gg [g_1], [g_3]$.

В настоящей работе показано, что в рамках механизма двухтактного замещения существует возможность описания аномальной кинетики трансглюкозилирования. Эта возможность реализуется, если учитывать взаимодействие замещенной формы фермента Eg со вторым косубстратом — водой. Такое взаимодействие вытекает из экспериментальных наблюдений, так как очевидно, что наблюдаемый, как правило, более высокий выход глюкозы, по сравнению с выходом триоз на начальных этапах превращения мальтозы ^(1, 2, 4), определяется переносом части глюкозилов на воду. Таким образом, в начале реакции имеется система, состоящая из одного субстрата (мальтозы) и двух косубстратов (мальтозы и воды), конкурирующих между собой за переносимые ферментом глюкозилы. На рис. 1а представлен полный граф, отвечающий механизму двухтактного замещения с учетом указанных условий. Граф отражает следующую совокупность уравнений: (4), (5), а также уравнение для взаимодействия замещенной формы фермента с водой:



Применяя для расчета графа методы, изложенные в работе ⁽⁷⁾, определяем начальную скорость трансглюкозилирования:

$$v_T = \frac{V_{M,T}[S_{1,2}]^2}{\frac{K_1 K_2}{K_3} \left(\frac{k_6}{k_2} + \frac{k_6}{k_4} \right) [S_3] + \left\{ K_1 + K_2 + \frac{K_2}{K_3} \left(1 + \frac{k_6}{k_2} \right) [S_3] \right\} [S_{1,2}] + [S_{1,2}]^2}, \quad (7)$$

где $[S_{1,2}]$ и $[S_3] = \text{const}$ — начальные концентрации мальтозы и второго косубстрата — воды соответственно,

$$K_1 = \frac{k_4(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_4)}, \quad K_2 = \frac{k_2(k_{-3} + k_4)}{k_3(k_2 + k_4)}, \quad K_3 = \frac{k_{-5} + k_6}{k_5}, \quad V_{M,T} = \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} [E]$$

($[E]$ — начальная концентрация фермента). Смысл констант скорости k_i и k_{-i} виден из уравнений (4)–(6) и графа на рис. 1а. Кривая, отвечающая уравнению (7), имеет точку перегиба. Таким образом, в рамках механизма двухтактного замещения получили модель, способную адекватно описать аномальную кинетику трансглюкозилирования.

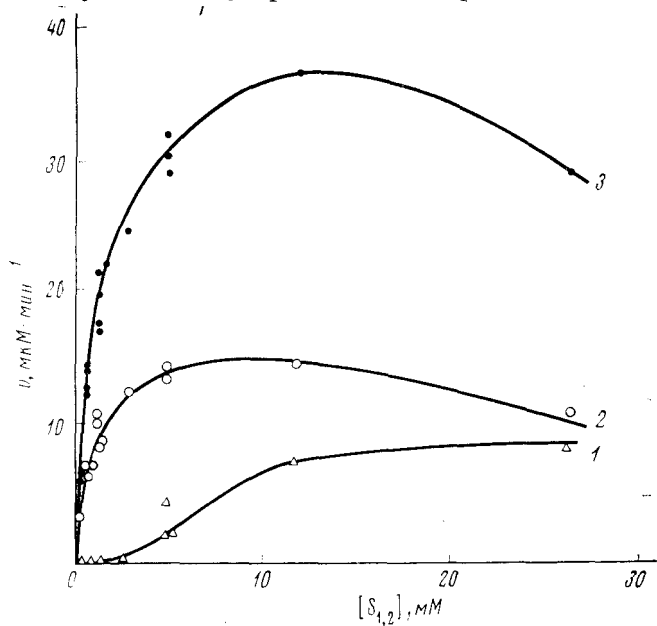


Рис. 2. Зависимость начальных скоростей трансглюкозилирования (1), гидролиза (2) и выхода глюкозы (3) от концентрации мальтозы $[S_{1,2}]$ при действии на нее трансглюкозилазы из *Aspergillus awamori*

При $K_3 = 0$ уравнение (7) вырождается в уравнение (1). Это обстоятельство является математическим выражением обсуждавшегося выше факта: действие второго косубстрата — воды определяет аномальную кинетику трансглюкозилирования мальтозы в рамках механизма двухтактного замещения. Очевидно также, что уравнение (7), эквивалентное по форме уравнению (3), при условии $S_1 \neq S_2$ преобразуется в уравнение вида (2). Таким образом, нарушение условия $S_1 = S_2$ приводит к восстановлению михаэлисовой кинетики, так как зависимости $v_T^{-1}([S_1]^{-1})$ при $[S_2] = \text{const}$ и $v_T^{-1}([S_2]^{-1})$ при $[S_1] = \text{const}$ линейны.

Начальная скорость гидролиза мальтозы, согласно графу на рис. 1а, зависит от ее концентрации следующим образом:

$$v_T = \frac{V_{M,T} \frac{K_2}{K_3} [S_{1,2}] [S_3]}{\frac{K_1 K_2}{K_3} \left(\frac{k_6}{k_2} + \frac{k_6}{k_4} \right) [S_3] + \left\{ K_1 + K_2 + \frac{K_2}{K_3} \left(1 + \frac{k_6}{k_2} \right) [S_3] \right\} [S_{1,2}] + [S_{1,2}]^2} \quad (8)$$

где $V_{м,г} = k_6[E]$. Кривая, отвечающая уравнению (8), имеет точку максимума, так же как и кривая, описывающая зависимость начальной скорости выхода глюкозы от концентрации мальтозы,

$$v_y = \frac{2V_{м,г} \frac{K_2}{K_3} [S_{1,2}] [S_3] + V_{м,г} [S_{1,2}]^2}{\frac{K_1 K_2}{K_3} \left(\frac{k_6}{k_2} + \frac{k_6}{k_4} \right) [S_3] + \left\{ K_1 + K_2 + \frac{K_2}{K_3} \left(1 + \frac{k_6}{k_2} \right) [S_3] \right\} [S_{1,2}] + [S_{1,2}]^2} \quad (9)$$

Следует отметить, что уравнения вида (7) — (9) получаются также, если рассматривать прямой перенос глюкозилов от Eg на мальтозу и воду без образования промежуточных комплексов Eg_2 и EgH_2O . Граф, в котором отражены указанные упрощения, приведен на рис. 16. Из этого графа следуют уравнения скоростей:

$$v_T = \frac{V_{м} [S_{1,2}]^2}{K_2 K_M + (K_M + K_1 + K_2) [S_{1,2}] + [S_{1,2}]^2}, \quad (7')$$

$$v_r = \frac{K_2 V_{м} [S_{1,2}]}{K_2 K_M + (K_M + K_1 + K_2) [S_{1,2}] + [S_{1,2}]^2}, \quad (8')$$

$$v_y = \frac{2K_2 V_{м} [S_{1,2}] + V_{м} [S_{1,2}]^2}{K_2 K_M + (K_M + K_1 + K_2) [S_{1,2}] + [S_{1,2}]^2}. \quad (9')$$

Уравнения (7') — (9') аналогичны по форме соответствующим уравнениям (7) — (9), но константы в (7') — (9') имеют более простой смысл:

$$V_{м} = k_2[E], \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \quad K_1 = \frac{k_2}{k_3}, \quad K_2 = \frac{k_4}{k_3}.$$

Можно отметить, в частности, что в уравнениях (7') — (9') отражены те же условия перехода в «нормальную» кинетику: второй косубстрат отсутствует ($K_2=0$), либо субстрат не является косубстратом ($S_1 \neq S_2$).

На рис. 2 приведены экспериментальные зависимости $v_T([S_{1,2}])$, $v_r([S_{1,2}])$ и $v_y([S_{1,2}])$, наблюдавшиеся нами при превращении мальтозы под действием трансглюкозилазы из *Aspergillus awamori* (4). Можно отметить, что экспериментальные кривые имеют те же особые точки, что и соответствующие модели (7) — (9) и (7') — (9').

Таким образом, в рамках механизма двухтактного замещения получили модели аномальной кинетики превращения субстрата, отвечающие экспериментальным данным.

Приведенный материал позволяет сделать заключение, что для аномальной кинетики трансферазной реакции в рамках механизма двухтактного замещения может быть достаточным выполнение двух условий: 1) субстрат является одновременно косубстратом и 2) наряду с этим косубстратом существует другой косубстрат, конкурирующий с первым за переносимые ферментом остатки. Нарушение одного из указанных условий приводит к восстановлению «нормальной» кинетики Михаэлиса — Ментен.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт продуктов брожения
Москва

Поступило
27 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. N. Palmer, Biochem. J., v. 124, 713 (1971). ² V. N. Nigam, K. V. Giri, J. Biol. Chem., v. 235, 947 (1960). ³ J. H. Pazur, T. Ando, Arch. Biochem. and Biophys., v. 93, 43 (1961). ⁴ К. М. Бендецкий, В. Л. Яровенко и др., Биохимия, т. 39, 557 (1974). ⁵ S. Sugawara, J. Fac. Agric. Hokk. Univ., v. 52, 257 (1962). ⁶ S. Chiba, T. Shimomura, Agric. Biol. Chem., v. 30, 536 (1966). ⁷ М. В. Волькенштейн, Б. Н. Гольдштейн, Биохимия, т. 31, 541 (1966).