

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 577.151.35, 577.151.45

ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗА: РЕТРОСПЕКТИВА ИЗУЧЕНИЯ КИНЕТИКИ И ТЕРМОДИНАМИКИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ РЕАКЦИЙ**Николай Владимирович Панин^{1,2}, Дорел Феодорович Гуранда¹, Ирина Владимировна Шаповалова³, Витас Швядас^{2,3}**¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский вычислительный центр³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики**Автор, ответственный за переписку:** Витас Швядас, vytas@belozersky.msu.ru

Аннотация. В обзоре рассмотрен вклад работ, выполненных в научной школе Ильи Васильевича Березина, в изучение кинетики и термодинамики реакций, катализируемых пенициллинацилазами. Обсуждаются методы определения активности пенициллинацилаз, обратимость ферментативного гидролиза ряда пенициллинов, цефалоспоринов и родственных соединений, влияние β -лактамного кольца на термодинамику синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов путем прямой конденсации и в результате ацильного переноса, вопросы оптимизации условий ферментативного ацильного переноса и использования пересыщенных растворов реагентов. Рассмотрена роль хромогенных субстратов в изучении пенициллинацилазы, возможности применения методов титрования активных центров фермента и создания «умных» катализаторов на основе пенициллинацилазы при формировании конъюгатов со стимул-чувствительными полимерами.

Ключевые слова: пенициллинацилаза, кинетика действия, бета-лактамные антибиотики, ферментативная модификация, титрование активных центров, хромогенные субстраты, изучение труднодетектируемых реакций, умные биокатализаторы

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-4-334-352

Список сокращений: 7-АДЦК – 7-аминодезацетоксицефалоспороновая кислота, ФГ – D-фенилглицин, ЦЛ – цефалексин, НИРАВ – 2-нитро-5-(фенилацетил)аминобензойная кислота, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-71-30003).

Для цитирования: Панин Н.В., Гуранда Д.Ф., Шаповалова И.В., Швядас В.К. Пенициллинацилаза: ретроспектива изучения кинетики и термодинамики практически значимых реакций // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 4. С. 334–352.

SCIENTIFIC REVIEW

**PENICILLIN ACYLASE: A RETROSPECTIVE OF STUDYING
THE KINETICS AND THERMODYNAMICS OF PRACTICALLY
SIGNIFICANT REACTIONS**

Nikolay V. Panin^{1,2}, Dorel T. Guranda¹, Irina V. Shapovalova³, Vytas K. Švedas^{2,3}

¹ Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology

² Lomonosov Moscow State University, Research Computing Center

³ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics

Corresponding author: Vytas K. Švedas, vytas@belozersky.msu.ru

Abstract. The review considers the contribution of works carried out at the scientific school of Ilya Vasilievich Berezin to the study of the kinetics and thermodynamics of penicillin acylase-catalyzed reactions. Methods for determining the activity of penicillin acylases, the reversibility of the enzymatic hydrolysis of a number of penicillins, cephalosporins and related compounds, the influence of the β -lactam ring on the thermodynamics of the synthesis of new penicillins and cephalosporins by direct condensation as well as by acyl transfer, the issues of optimizing the conditions for enzymatic acyl transfer and the use of supersaturated reagent solutions are discussed. The role of chromogenic substrates in the study of penicillin acylase, the possibility of using the methods of titration of active sites of the enzyme and the creation of “smart” biocatalysts based on penicillin acylase due to the formation of conjugates with stimulus-sensitive polymers are considered.

Keywords: penicillin acylase, kinetics of action, titration of enzyme active sites, chromogenic substrates, study of difficult-to-detect reactions, beta-lactam antibiotics, enzymatic modification, smart biocatalysts

Abbreviations: 7-ADCA – 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid, Phg – D-phenylglycine, CL – cephalixin, NIPAB – 2-nitro-5-(phenylacetyl)aminobenzoic acid, HPLC – high performance liquid chromatography.

Financial Support. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 21-71-30003).

For citation: Panin N.V., Guranda D.T., Shapovalova I.V., Švedas V.K. Penicillin Acylase: a Retrospective of Studying the Kinetics and Thermodynamics of Practically Significant Reactions // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 4. S. 334–352.

Трудно найти другой фермент, который был бы столь необычен по истории научных исследований и практической значимости в медицинской промышленности как пенициллинацилаза (еще известна как пенициллинамидаза или пенициллинамидогидролаза). На разных этапах изучения использовали несколько названий этого фермента, однако во избежание путаницы в настоящем обзоре будет использовано одно название, независимо от того, как фермент именовался в тех или иных статьях своего времени. История пенициллинацилазы – не тот случай, когда при изучении фермента открывали уникальные ка-

талитические свойства и потом применяли их для решения практических проблем. Пенициллинацилазу целенаправленно искали для решения практической задачи – масштабного получения ядра пенициллинов 6-аминопенициллановой кислоты расщеплением доступного природного бензилпенициллина, высокопроизводительные промышленные процессы получения которого были хорошо налажены уже в конце 50-х годов XX в., чтобы затем синтезировать более эффективные его аналоги. Многочисленные попытки поиска более эффективных пенициллинов в 50-е годы за счет оптимизации микробиологического синтеза с

добавлением различных компонентов в питательную среду привели к получению единственного препарата – кислотоустойчивого феноксиметилпенициллина, который можно было применять *per os*, и стало понятно, что для промышленного получения новых антибиотиков этого ряда нужно наладить производство 6-аминопенициллановой кислоты – ядра пенициллинов [1]. Сложность задачи заключалась в том, что было необходимо найти фермент, способный расщеплять стабильную амидную связь в боковой цепи пенициллина, не затрагивая лабильную амидную связь бета-лактамного кольца (рис. 1).

К этому моменту были уже весьма хорошо известны другие, вредоносные ферменты – пенициллиназы или β -лактамазы, способные решать более легкую задачу – избирательно раскрывать лабильное бета-лактамное кольцо и лишать соединение его антибиотических свойств. Если добавить тот факт, что бета-лактамное кольцо могло довольно легко разрушаться даже в отсутствие β -лактамаз, например, в присутствии ионов металлов, в кислой или щелочной среде, а пенициллин мог претерпевать различные перегруппировки, то поиск фермента, способного расщеплять значительно более устойчивую связь, не затрагивая лабильную, представлялся трудно разрешимой задачей. Тем не менее, практически одновременно в разных лабораториях такой фермент был найден, что положило начало производству широко доступных бета-лактамных антибиотиков (полусинтетических пенициллинов, а впоследствии цефалоспоринов). Первые сообщения о расщеплении природных пенициллинов неко-

торыми штаммами *Penicillium* и *Aspergillus* были сделаны авторами [2, 3] в начале 50-х годов, хотя есть сомнения в том, что продуктом биокаталитического превращения действительно была 6-аминопенициллановая кислота. Воспроизвести эти результаты (или открыть пенициллинацилазную активность) удалось лишь в 1960 г. практически одновременно в разных лабораториях [4–7]. Без преувеличения можно сказать, что благодаря открытию пенициллинацилаз, их изучению и последующему практическому использованию стали доступны весьма дешевые антибиотики широкого спектра действия, которые до последнего времени занимают около половины мирового рынка.

Перед авторами настоящего обзора стояла задача рассмотреть вклад работ, выполненных в научной школе Ильи Васильевича Березина, в изучение и применение пенициллинацилаз.

Определение активности пенициллинацилаз

Разработка количественных методов определения активности фермента имеет принципиальное значение для проведения кинетических исследований, а без понимания кинетики ферментативных реакций невозможна оптимизация их практического использования. Изучение кинетических особенностей действия пенициллинацилазы сыграло важную роль как для раскрытия механизма действия, так и для промышленного применения фермента. На стадии поиска и первичной характеристики достаточно было понимать, что искомый фермент способен расщеплять природный бензилпенициллин с образованием

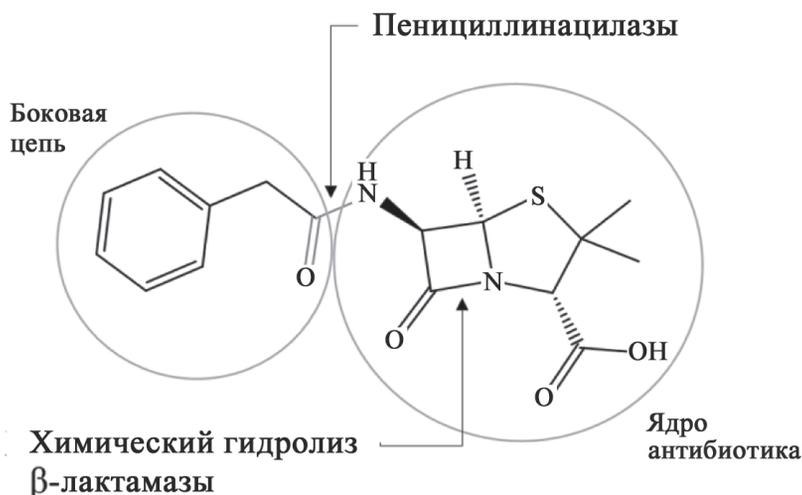


Рис. 1. Строение молекулы бензилпенициллина (пенициллина G). Стрелками показаны связи, расщепляемые пенициллинацилазами, β -лактамазами и в результате химического гидролиза, а также структурные фрагменты – боковая цепь и ядро антибиотика (остаток 6-аминопенициллановой кислоты)

6-аминопенициллановой кислоты. Для дальнейшего изучения свойств фермента и кинетики катализируемой реакции были разработаны разные методы, в первую очередь, для определения 6-аминопенициллановой кислоты. Методы слежения за протеканием реакций, катализируемых пенициллинацилазой, можно разделить по определению продукта, образующегося при превращении субстрата – кислоты или аминокислоты, а также по пригодности метода для непрерывного слежения за ферментативным превращением или необходимости отбора проб реакционной смеси и последующего анализа. При этом следует обратить внимание на чувствительность методов, которая определяет возможность слежения за превращением субстратов в разной концентрации, что оказалось важным при исследовании пенициллинацилаз.

На первых этапах изучения кинетики действия пенициллинацилазы применяли в основном метод определения продукта ферментативного гидролиза 6-аминопенициллановой кислоты после модификации *n*-диметиламинобензальдегидом и спектрофотометрической регистрации образующегося продукта [8, 9]. Ввиду низкой чувствительности этого метода (коэффициент молярной экстинкции регистрируемого производного при 415 нм составлял $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), а также других доступных в то время методов слежения за этой реакцией, можно было регистрировать превраще-

ние лишь сильно концентрированных растворов субстрата и изучать зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации бензилпенициллина выше 1 мМ. Эти исследования показали, что пенициллинацилаза обладает невысоким сродством к бензилпенициллину и значения константы Михаэлиса в реакции его гидролиза, определенные разными авторами [10–13], находятся в интервале 0,74–7,7 мМ (табл. 1).

Как показали дальнейшие исследования, фермент на самом деле куда более специфичен к ацильной группе субстрата и ошибка в определении значения K_M в ранних работах составляла почти три порядка (табл. 1). Причиной ошибок в определении значений кинетических параметров, как оказалось, было эффективное ингибирование пенициллинацилазы продуктом реакции – фенилуксусной кислотой. Более глубокое понимание кинетики действия фермента стало возможным благодаря применению более чувствительных методов непрерывного слежения за протеканием реакции с использованием не только анализа зависимости начальной скорости от концентрации субстрата, но и так называемой интегральной кинетики, т.е. анализа полных кинетических кривых вплоть до исчерпывающего превращения субстрата в продукты реакции [14–15]. Это позволило обнаружить определяющее значение роли ацильной группы в узнавании пенициллинацилазой своих

Т а б л и ц а 1

Значения константы Михаэлиса и константы конкурентного ингибирования продуктом реакции (фенилуксусной кислотой) в реакциях гидролиза пенициллина, катализируемого пенициллинацилазами

K_M , мкМ	$K_{инг.}^{ФУК}$, мкМ	Условия	Литература
4,6±0,2	42±4	pH 7,5; 20 °С	[14, 15]
20	200	pH 8,1	[16]
5,0±1,3	–	pH 7,0	[17]
8,5	50	pH 7,8; 37 °С	[18]
45	–	pH 7,5; 37 °С	[19]
38	–	pH 7,6; 30 °С	[20]
170–180	–	–	[21]
740	4800	pH 7,5; 37 °С	[10]
770	5800	pH 8,0; 27 °С	[10]
670	4800	–	[11]
7700	–	pH 7,0; 37 °С	[12]
1350–1590	–	pH 8,0; 30 °С	[13]

субстратов и указало на широкую субстратную специфичность по отношению к «уходящей» группе, т.е. аминокфрагменту.

Интерес к практическому использованию пенициллинацилазы стимулировал разработку и применение методов интегральной кинетики при описании протекания ферментативной реакции от самого начала вплоть до исчерпывающего превращения субстрата в продукты. С исследовательской точки зрения анализ интегральной кинетики позволял проверить адекватность значений кинетических параметров, определенных по зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата (если полная кинетическая кривая, рассчитанная с использованием «начальных» кинетических параметров, соответствовала кривой, определенной экспериментально). С практической точки зрения это позволяло получить математическую модель для описания и поиска оптимальных условий проведения процесса. Любопытна маленькая хитрость, которая пригодилась на ранних этапах изучения пенициллинацилазы, когда препарат фермента был доступен в весьма ограниченном количестве. Это было возможно только при использовании метода интегральной кинетики. При изучении кинетики ферментативного гидролиза 7-фенилацетамидодезацетоксицефалоспороановой кислоты, приводящего к получению 7-аминодезацетоксицефалоспороановой кислоты – одного из ядер цефалоспоринов, фермент использовали для последовательного проведения нескольких циклов: после полного превращения первой порции субстрата в реакционную смесь добавляли вторую порцию субстрата, после ее превращения добавляли следующую и так 5–6 раз [22]. Такой эксперимент с расходом одной порции фермента позволил установить параметры ферментативного гидролиза K_M и V_M , определяющие кинетику реакции, где K_M – константа Михаэлиса, V_M – максимальная скорость ферментативной реакции, $K_{инг.}$ – константа конкурентного ингибирования продуктом реакции (фенилуксусной кислотой), а также убедиться в стабильности фермента в реакционной смеси.

Обратимость ферментативного гидролиза пенициллинов

Уже в первых работах, где сообщалось об обнаружении пенициллинацилазы, отмечалась обратимость ферментативного гидролиза бензилпенициллина [4–7, 23]. Парадоксально, что термодинамику обратимых реакций гидролиза/синтеза амидной связи в боковой цепи бета-лактамовых антибиотиков в водной среде можно ис-

следовать только с использованием ферментов, способных катализировать эти реакции. Дело в том, что соединения содержат лабильное бета-лактамовое кольцо, которое в водной среде необратимо разрушается в первую очередь и в отсутствие специфического катализатора гидролиз идет по другому пути, а интересующая нас реакция составляет лишь ничтожную долю протекающих превращений. Исследование термодинамики обратимой реакции гидролиза/синтеза ряда бета-лактамовых антибиотиков с использованием пенициллинацилазы позволило определить значения констант равновесия этих реакций и их зависимости от кислотности среды [24–26]. Следует обратить внимание, что речь идет о термодинамике реакции гидролиза N-ациламидной связи, образованной боковым ацильным радикалом с ядром антибиотика (рис. 1), а не о реакции расщепления бета-лактамового кольца, которая в водной среде является необратимой. Было показано, что термодинамический оптимум синтеза пенициллинов и цефалоспоринов достигается в кислой среде (при $pH < 5$) и в дальнейшем снижается при переходе к сильнокислым средам (рис. 2).

Анализ pH-независимой составляющей свободной энергии реакции и компонента, связанного с ионизацией реагентов, позволил сделать вывод о том, что термодинамика ферментативного синтеза амидной связи в бета-лактамовых соединениях в водной среде отличается от термодинамики подобной связи в N-ацилированных аминокислотах и пептидах главным образом за счет существенно более низкого вклада ионизации аминок компонента. Благодаря низким значениям pK (4,6–4,9) аминок групп ядер пенициллинов и цефалоспоринов, ионизация этих компонентов в водной среде оказывает значительно меньшее влияние на сдвиг равновесия реакции в сторону гидролиза и способствует синтезу. Так, при разрушении бета-лактамового кольца б-аминопенициллановой кислоты pK аминок группы возрастает от 4,6 до 8,9. Наглядным примером, демонстрирующим важность бета-лактамового кольца для термодинамики синтеза бензилпенициллина в водной среде, служит изменение значения константы равновесия при расщеплении бета-лактамового кольца: даже в оптимальных условиях значение свободной энергии синтеза бензилпенициллоновой кислоты хуже соответствующего значения для синтеза бензилпенициллина на 16 кДж/М. Анализ термодинамики обратимой реакции гидролиза различных бета-лактамовых антибиотиков показал, что ферментативный синтез этих соединений в водной среде возможен, однако хорошего

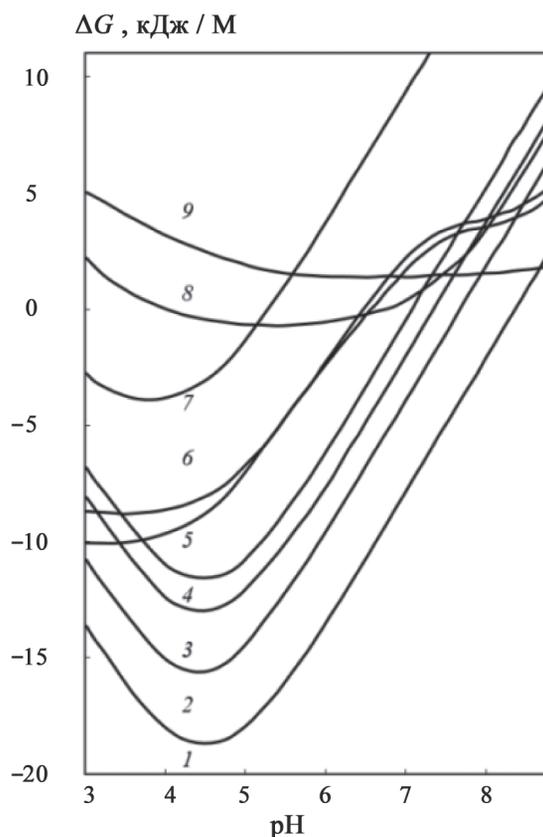


Рис. 2. pH-Зависимость изменения свободной энергии ферментативного синтеза ряда β -лактамных антибиотиков и родственных соединений (1 – 7-фенилацетамидодезацетоксицефалоспоровановая кислота, 2 – бензилпенициллин, 3 – цефалотин, 4 – цефалоридин, 5 – ампициллин, 6 – цефалексин, 7 – феноксиметилпенициллин, 8 – этиловый эфир фенилаланил-тирозина, 9 – N-фенилацетилглицин)

выхода продуктов синтеза можно добиться, лишь создавая большой избыток кислот по сравнению с ядрами антибиотиков, а в случае ампициллина, цефалексина, амоксициллина и родственных соединений это практически невозможно. Дело в том, что низкая растворимость D-фенилглицина и D-*n*-гидроксифенилглицина в водной среде недостаточна для необходимого сдвига равновесия в сторону синтеза (рис. 3).

Значительно более перспективным для синтеза этих антибиотиков является не конденсация кислоты и аминокислоты, т.е. так называемый «прямой» синтез, а ферментативный ацильный перенос, когда в качестве ацилирующего агента используется не свободная кислота, а ее активированные производные, например сложные эфиры [26, 27]. В этом случае существенно более выгодные термодинамические условия достигаются при $\text{pH} > 6$ (рис. 4).

Исследование кинетики катализируемого пенициллинацилазой переноса ацильной группы от

N-фенилацетилглицина на 6-аминопенициллановую кислоту показало, что такой синтез бензилпенициллина протекает существенно быстрее, чем «прямой» синтез, но кривая накопления продукта имеет ярко выраженный максимум [27]. Такой метод ферментативного синтеза путем переноса ацильной группы от активированного ацильного донора на подходящее аминокислотное соединение, выступающее в роли нуклеофила, впоследствии получил название кинетически контролируемый синтез [28–30].

Следует отметить, что выбор и доказательство адекватной кинетической схемы, позволяющей создать математическую модель, которая описывает изменение концентрации компонентов реакционной смеси от времени в реакциях ацильного переноса, катализируемого гидролазами в водной среде, потребовали довольно много времени. Сложность задачи заключалась в том, что в реакционной смеси протекают три как бы независимые реакции: перенос ацильной группы на нуклеофил,

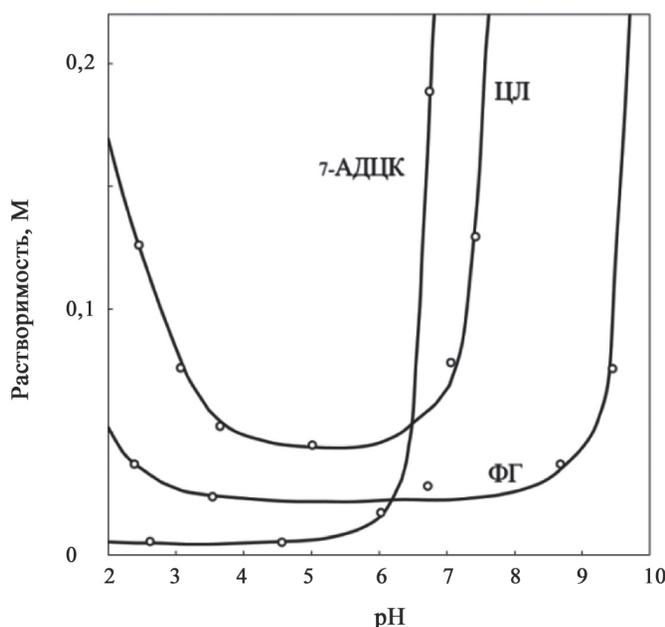


Рис. 3. pH-Зависимость растворимости компонентов ферментативного синтеза цефалексина: 7-аминодезацетоксицефалоспоровановая кислота (7-АДЦК), D-фенилглицин (ФГ), цефалексин (ЦЛ)

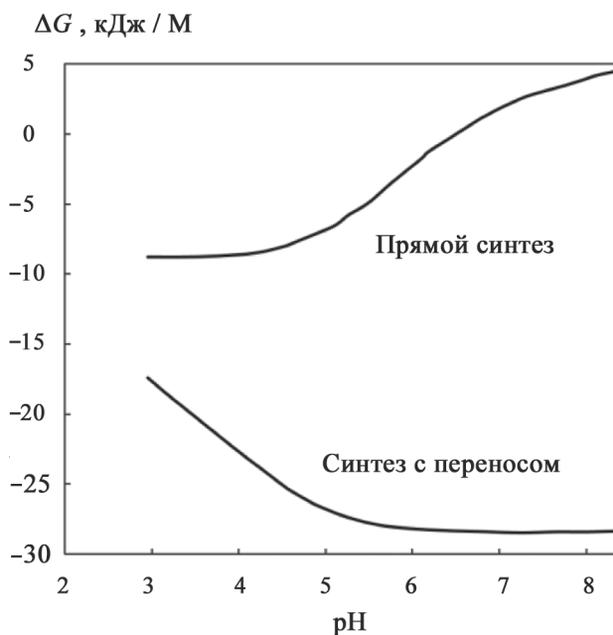


Рис. 4. pH-Зависимость изменения свободной энергии реакции при прямом синтезе цефалексина и синтезе с переносом ацильной группы с ацилирующего агента

гидролиз ацильного донора и гидролиз продукта ацильного переноса. Попытки большинства авторов упрощенно рассматривать такой процесс как протекание трех независимых реакций не позволяли ни адекватно описать его кинетику, ни проводить оптимизацию. Во внимание не принимал-

ся тот факт, что все эти превращения протекают через образование общего промежуточного соединения – ацилфермента. Эволюция понимания кинетики ацильного переноса в водной среде, катализируемого пенициллинацилазой, в конечном итоге привела к схеме 1 [31–33].

соединений S и P, а значения параметров β_0 и γ – при изучении зависимости соотношения значений начальной скорости синтеза и гидролиза (начальной скорости образования продуктов P и P₂) от концентрации нуклеофила Nu в соответствии со схемой 1.

Следует заметить, что α , β_0 и γ представляют собой комплексные параметры и являются комбинацией кинетических и равновесных констант. К сожалению, по результатам кинетических экспериментов не удается определить значения важного параметра K_n , характеризующего способность фермента образовывать комплекс ацилфермент – нуклеофил. Определение K_n позволило бы количественно характеризовать сродство фермента и специфичность к нуклеофилам, облегчило бы поиск мутантов фермента с улучшенными свойствами и сравнение ферментов из разных источников по этому показателю. Попытка использовать зависимость соотношения начальной скорости синтеза/гидролиза от концентрации нуклеофила для определения так называемой константы связывания нуклеофила [34], не учитывая все взаимодействия и образование промежуточных соединений в системе (схема 1), дает упрощенное представление и не позволяет описать поведение системы во времени.

В целом эффективность ферментативного ацильного переноса зависит от начальной концентрации реагентов (ацильного донора и

нуклеофила n_0 , s_0) и определяется свойствами катализатора, т.е. количественными характеристиками α , β_0 и γ , с использованием которых можно проводить оптимизацию процесса, сравнивать эффективность различных препаратов пенициллинацилазы и мутантов фермента на количественной основе [35, 36]. Типичный пример кинетики реакций ацильного переноса, катализируемого пенициллинацилазами, представлен на рис. 6.

Производительность биокаталитического синтеза растет при повышении начальной концентрации реагентов. Поскольку ядра антибиотиков являются более дорогим компонентом, процесс стремятся проводить при некотором избытке ацильного донора. Поэтому при производстве десятков тысяч тонн полусинтетических β -лактамных антибиотиков оптимизация расхода исходных веществ представляет существенный интерес, а увеличение выхода целевого продукта является важной практической задачей.

Поиск оптимальных условий ферментативного ацильного переноса. Пересыщенные растворы реагентов

Одним из основных факторов, ограничивающих производительность биокаталитического синтеза новых β -лактамных антибиотиков методом ацильного переноса в водной среде,

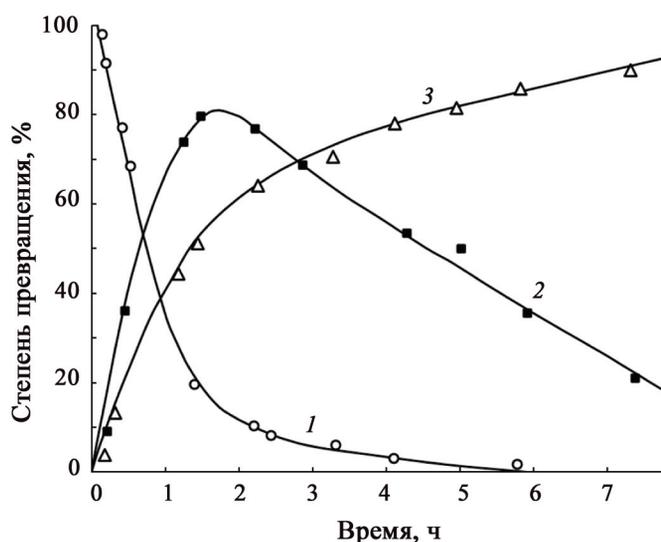


Рис. 6. Пример кинетики синтеза цефалексина с использованием ферментативного ацильного переноса. Ацильный донор – метилэфир D-фенилглицина, нуклеофил – 7-аминодезацетоксицефалоспоровая кислота. Показаны интегральные кривые изменения концентрации ацильного донора (1), продукта ацильного переноса на нуклеофил (целевого продукта синтеза цефалексина) (2) и продукта гидролиза D-фенилглицина (3)

является побочный гидролиз ацильного донора, что приводит к его непродуктивным потерям [37]. Для снижения этого вклада был предложен целый ряд подходов: оптимизация условий проведения реакции по pH [38, 39], ионной силе раствора [28] или температуре [40], множественная хеометрическая оптимизация [41], а также добавление органических растворителей [42–44]. Важное значение имеет также использование высокой концентрации ацильного донора и нуклеофила (ядра антибиотика) [45, 46]. Однако во многих случаях их ограниченная растворимость являлась сдерживающим фактором. Исследования показали, что дополнительные возможности в преодолении этого ограничения связаны с уникальной способностью ряда ацильных доноров и ядер антибиотиков образовывать весьма стабильные пересыщенные растворы. Поскольку выбор пути, по которому пойдет ацильный перенос, зависит от эффективности образования комплекса ацилфермент – нуклеофил и концентрации нуклеофила, ее увеличение сдвигает соотношение значений скорости синтеза и гидролиза в пользу синтеза. Крайне полезным в этом смысле оказалось соблюдение зависимости при переходе к пересыщенным растворам 6-аминопенициллановой и 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислот

(рис. 7). Так, например, соотношение синтез/гидролиз при синтезе цефалексина за счет использования пересыщенных растворов 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислоты может быть увеличено в несколько раз, что приводит к увеличению выхода целевого продукта на 14% [47]. Интересно, что наряду с ядрами пенициллинов и цефалоспоринов могут быть получены пересыщенные растворы и некоторых ацильных доноров, например амида *D-n*-гидроксибензилглицина, что приводит к дополнительным положительным эффектам. Таким образом, использование пересыщенных растворов исходных веществ является одним из путей повышения продуктивности ферментативного получения полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов наряду с использованием гетерогенных систем «водный раствор – осадок» [39, 45, 48] вплоть до перехода к реакциям в отсутствие растворителя [49, 50].

Роль хромогенных субстратов в изучении пенициллинацилазы

При описанном выше изучении термодинамики реакций, катализируемых пенициллинацилазой, использовали весьма трудоемкие методы определения концентрации компонентов реакционной смеси. Эти методы не позволяли

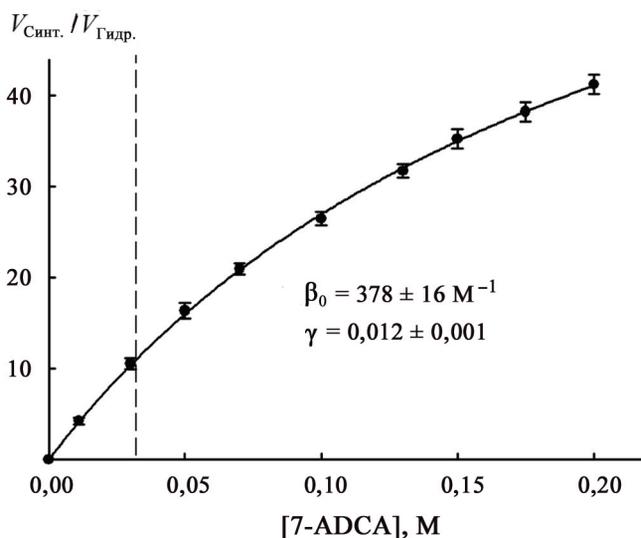


Рис. 7. Зависимость соотношения значений начальной скорости синтеза/гидролиза от концентрации нуклеофила (7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислоты) при переходе к пересыщенным растворам. Пунктирная линия показывает растворимость нуклеофила в условиях проведения реакции, экспериментальные точки справа показывают экспериментальные данные, полученные в результате создания пересыщенных растворов нуклеофила. Условия проведения реакции: pH 6,3; $T = 25^\circ \text{C}$

вести непрерывный контроль за протеканием реакций, катализируемых пенициллинацилазой, для этого необходимо осуществлять отбор проб реакционной смеси, остановку ферментативной реакции и последующее определение концентрации компонентов. Следует иметь в виду, что на ранних этапах изучения фермента были доступны низкокчувствительные методы анализа, и этот факт оказал влияние на точность определения кинетических характеристик действия фермента. Лишь впоследствии стали использовать высокочувствительные методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), но и в этом случае трудность кинетических исследований, по крайней мере на первых порах, была обусловлена трудоемкостью экспериментальной работы из-за невозможности непрерывного слежения за протеканием реакции. Поэтому при поиске новых ферментов этого семейства, первичной характеристике мутантов, изучении зависимости каталитических свойств от условий и в других кинетических исследованиях особое значение приобрели так называемые цветные (хромогенные) субстраты (табл. 2), при превращении которых образуются окрашенные продукты. Их использование позволяет легко заметить, в каких колониях появляются желтые пятна и продуцируются искомые ферменты/мутанты.

При непрерывной спектрофотометрической регистрации удобно изучать зависимость каталитических свойств пенициллинацилазы от условий проведения реакции (при изменении концентрации субстрата, pH, температуры, в присутствии или отсутствии ингибиторов и т.п.). Так, с использованием хромогенного субстрата 2-нитро-5-(фенилацетил)аминобензойной кислоты (NIPAB)

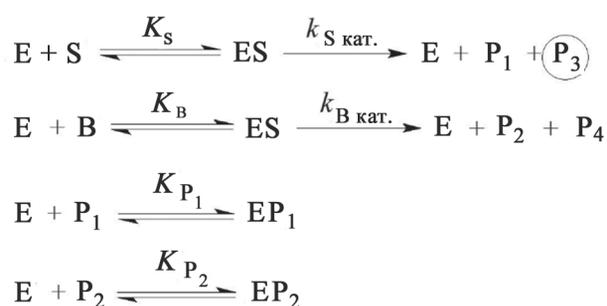
было показано высокое сродство фермента к ацильной группе [16].

Еще одной важной областью успешного использования цветных субстратов разной реакционной способности стало изучение реакций ферментативного гидролиза, так называемых «невидимых» субстратов, слежение за которыми затруднительно. В этом случае в реакционной системе присутствуют фермент и два субстрата – «видимый» (цветной) и «невидимый», а кинетика «видимой» реакции содержит информацию о «невидимой». Поскольку слежение за подавляющим большинством реакций гидролиза, катализируемых пенициллинацилазой, затруднительно, были разработаны методика синтеза цветных субстратов разной реакционной способности и подход к изучению «невидимых» реакций (схема 2) [51–53].

Этот метод позволяет определять кинетические параметры K_M и V_M ферментативного гидролиза, если цветной субстрат менее реакционноспособен, чем «невидимый». Типичные кинетические кривые приведены на рис. 8. В противном случае, когда «видимый» субстрат более реакционноспособен, чем «невидимый», удастся определить только значение K_M «невидимой» реакции, а максимальную скорость необходимо устанавливать в отдельном эксперименте.

Трудно детектируемой реакцией, катализируемой пенициллинацилазой, является гидролиз целого ряда субстратов – N-ацильных производных аминокислот (аминокислот и пептидов, их амидов и сложных эфиров, аминокислот, первичных аминов), амидов карбоновых и гетероциклических кислот. Трудность детектирования может быть связана

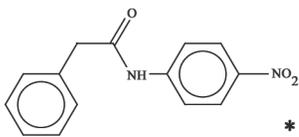
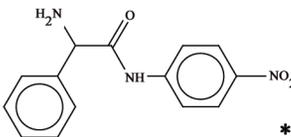
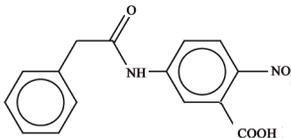
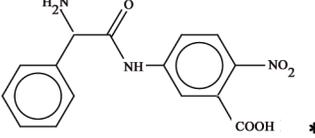
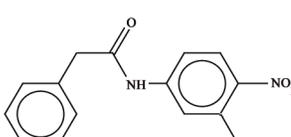
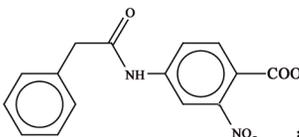
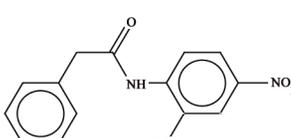
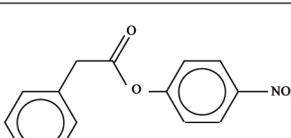
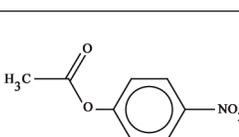
Схема 2



Кинетическая схема реакций превращения двух субстратов, катализируемых одним ферментом: «видимого» субстрата S, продуктом превращения которого является окрашенный продукт P_3 , и «невидимого» субстрата B, продукты превращения которого не регистрируются используемой системой детекции

Т а б л и ц а 2

Кинетические параметры гидролиза хромогенных субстратов, катализируемого пенициллинацилазами из *A. faecalis* (подчеркнуто) и *E. coli* (0,01 М КН₂РO₄; 0,1 М КСl; рН 7,5; 25 °С)

Субстрат	$k_{кат.}, c^{-1}$	$K_{M}, мкМ$	$k_{кат.}/K_{M}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$\epsilon_{400}, M^{-1} \cdot cm^{-1}$
 *	<u>44,1</u> 50	<u>9,0</u> 120	<u>$4,9 \cdot 10^6$</u> $4,2 \cdot 10^5$	9500
 *	<u>1,6</u> 0,8	<u>43</u> 100	<u>$3,7 \cdot 10^4$</u> $8,0 \cdot 10^3$	9500
 *	<u>95</u> 26	<u>4,5</u> 26	<u>$2,1 \cdot 10^7$</u> $1,0 \cdot 10^6$	9500
 *	<u>55</u> 10	<u>270</u> 600	<u>$2,0 \cdot 10^5$</u> $1,7 \cdot 10^4$	9500
 *	<u>1,5</u> 1,2	<u>120</u> 70	<u>$1,3 \cdot 10^4$</u> $1,7 \cdot 10^4$	10 500
 *	<u>101</u> 100	<u>5,0</u> 80	<u>$2,0 \cdot 10^7$</u> $1,3 \cdot 10^6$	700
 *	<u>41,2</u> 9,0	<u>7,4</u> 40	<u>$5,6 \cdot 10^6$</u> $2,3 \cdot 10^5$	6500
 *	<u>110</u> 300	<u>3,4</u> 60	<u>$3,2 \cdot 10^7$</u> $5,0 \cdot 10^6$	12 000
	<u>1,5</u> 3,0	<u>15</u> 50	<u>$1,0 \cdot 10^5$</u> $6,0 \cdot 10^4$	12 000

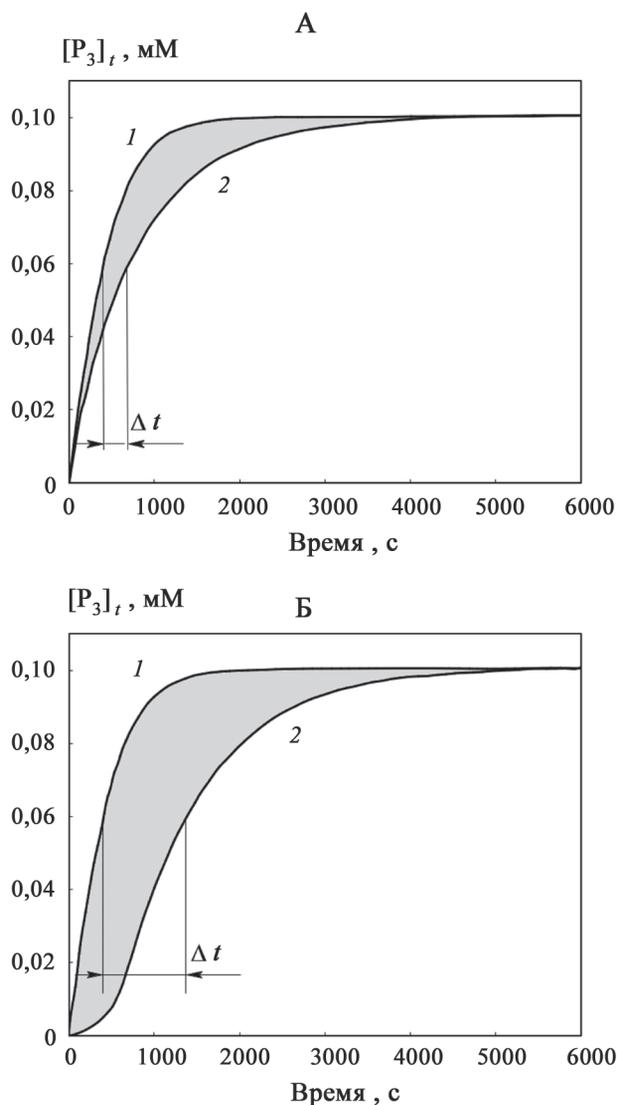


Рис. 8. Кинетические кривые 1 на рисунках А и Б показывают накопление регистрируемого системой детекции продукта P_3 в реакции ферментативного превращения «видимого» субстрата в отсутствие «невидимого» субстрата в реакционной смеси. Кинетические кривые 2 на рисунках А и Б показывают накопление продукта P_3 в реакции ферментативного превращения «видимого» субстрата в присутствии «невидимого» субстрата в реакционной смеси в соответствии со схемой 2. А – отношение $k_{кат.}/K_M$ для «невидимого» субстрата намного меньше $k_{кат.}/K_M$ для «видимого» субстрата, Б – отношение $k_{кат.}/K_M$ для «невидимого» субстрата намного больше этого значения для «видимого» субстрата

либо с невозможностью непрерывного слежения за протеканием реакции, что существенно осложняет проведение кинетических исследований, либо с низкой чувствительностью методов определения компонентов реакционной смеси, что ограничивает проведение кинетических исследований только при высокой концентрации субстратов. В обоих случаях цветные («видимые») субстраты фермента, обеспечивающие удобное непрерывное слежение за протеканием процес-

са, помогают получить информацию о кинетике труднодетектируемых реакций. С помощью такого подхода была изучена специфичность пенициллинацилазы в реакции гидролиза N-ацильных производных ряда аминокислот (табл. 3).

Титрование активных центров пенициллинацилаз

При анализе возможностей и сложности кинетических исследований в энзимологии следует

Т а б л и ц а 3

Кинетические параметры ферментативного гидролиза N-фенилацетильных производных L-α-аминокислот, катализируемого пенициллинацилазой из E. coli (0,01 М КН₂РO₄; 0,1 М КСl; рН 7,5; 25 °С)

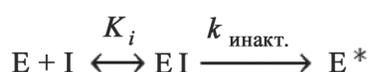
Субстрат	$k_{\text{кат.}}, \text{с}^{-1}$	$K_M, \text{мкМ}$	$k_{\text{кат.}} / K_M \cdot 10^{-6}, \text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$
Phac-L-Phe	47	1.5	31
Phac-L-Ala	270	13	21
Phac-L-norLeu	118	10	12
Phac-L-norVal	116	12	9,7
Phac-L-Phg	111	17	6,5
Phac-L-Asn	204	59	3,5
Phac-L-Leu	73	31	2,4
Phac-L-Glu	230	99	2,3
Phac-L-Arg	130	110	1,2
α-Phac-L-Lys	180	170	1,1
Phac-L-Val	11	12	0,92
Phac-L-Asp	138	230	0,60

упомануть проблему титрования активных центров ферментов, т.е. определения концентрации активного фермента в исследуемых препаратах. Это важно при сравнении каталитической активности ферментов из разных источников, а также при характеристике мутантов, создаваемых методами белковой инженерии. Титрование активных центров фермента позволяет определить значение каталитической константы ферментативной реакции и в дальнейшем сравнивать препараты на этой количественной основе. К сожалению, для большинства ферментов методы определения концентрации активных центров неизвестны. Пенициллинацилаза представляет собой редкий пример, когда титрование активных центров возможно. Интересно, что для этой цели оказалось пригодным широко известное в энзимологии соединение фенилметилсульфонилфторид, в свое время синтезированное для необратимого ингибирования α-химотрипсина и используемое для

инактивации протеаз при выделении и очистке белков. Пенициллинацилаза способна чрезвычайно эффективно связывать фенилметилсульфонилфторид и образовывать фермент-ингибиторный комплекс, что в дальнейшем приводит к ковалентной модификации ключевого каталитического остатка серина и инактивации фермента [54, 55] (схема 3).

Хотя внутримолекулярная модификация каталитического серина после связывания ингибитора в активном центре в случае α-химотрипсина и пенициллинацилазы протекает практически с одинаковой константой скорости, пенициллинацилаза способна на пять порядков более эффективно связывать ингибитор (константа скорости инактивации α-химотрипсина $5,2 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, константа связывания $K_i = 5,6 \text{ мМ}$ [56], константа скорости инактивации пенициллинацилазы $6,0 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, константа связывания $K_i = 59 \text{ нМ}$ [54]), поэтому даже в сильно разбавленных растворах под

С х е м а 3



Кинетическая схема действия необратимого ингибитора, способного связываться в активном центре фермента. E – фермент, I – необратимый ингибитор, EI – комплекс фермент-ингибитор, E* – инактивированный фермент

действием фенилметилсульфонилфторида происходит быстрая (за несколько минут) стехиометрическая инактивация пенициллинацилазы, что может быть использовано для титрования активных центров [54, 55, 57, 58]. Характерная зависимость остаточной активности пенициллинацилазы после добавления титранта (фенилметилсульфонилфторида) разной концентрации в раствор пенициллинацилазы, позволяющая определить концентрацию активных центров фермента, представлена на рис. 9.

Доказательством того, что взаимодействие с фенилметилсульфонилфторидом приводит к инаktivации остатка серина в активном центре пенициллинацилазы, является возможность реактивации фермента при добавлении специфичного для данного фермента нуклеофила 6-аминопенициллановой кислоты [54], что было установлено еще до появления соответствующих данных рентгеноструктурного анализа [59]. Разработка метода титрования активных центров пенициллинацилазы позволила определить значение каталитических констант, сравнить каталитическую активность ферментных препаратов из разных источников, а также мутантных форм фермента, полученных методами белковой инженерии.

Кроме того, появилась возможность следить за эффективностью методов иммобилизации ферментов и выявлять случаи, когда снижение активности препарата связано не с потерей активных центров, а со снижением каталитических свойств [58]. Следует отметить, что этот метод весьма активно используется в разных лабораториях для решения специальных задач:

при определении содержания активного фермента в высокоочищенных препаратах, которое проводят, чтобы убедиться, что в ходе выделения не произошла инаktivация фермента;

при определении абсолютных значений каталитических констант ферментативных реакций;

при слежении за сохранением активных центров фермента в ходе иммобилизации, сравнении мутантных форм и препаратов из разных источников [60–67].

Взаимодействие пенициллинацилазы с полиэлектролитами и конъюгаты со стимул-чувствительными полимерами. «Умные» катализаторы»

К дополнительным возможностям регуляции активности пенициллинацилазы приводит взаимодействие с полиэлектролитами, когда в зави-

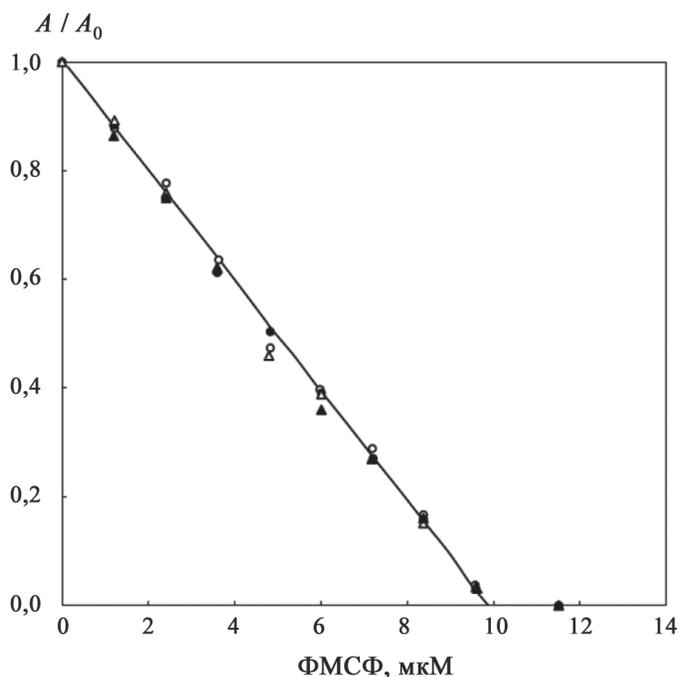


Рис. 9. Титрование активных центров пенициллинацилазы из *A. faecalis* с помощью фенилметилсульфонилфторида: зависимость остаточной каталитической активности от концентрации добавленного ингибитора. За активностью фермента одновременно следили по реакциям гидролиза 2-нитро-5-(фенилацетил)аминобензойной кислоты (●), бензилпенициллина (○), феноксиметилпенициллина (▲) и *n*-нитрофенилацетата (Δ) (0,01M фосфатный буфер; pH 6,0; 0,1 M KCl, 22 °C)

симости от того, используется поликатион или понианион, можно сдвинуть рН-зависимость каталитической активности или стабильности в ту или иную сторону [68]. При образовании так называемых стехиометрических полиэлектролитных комплексов, когда при смешении растворов противоположно заряженных полиэлектролитов происходит выпадение комплекса в осадок, возможен захват присутствующего в системе фермента и его физическая иммобилизация. Исследования показали, что эффективность иммобилизации можно увеличить, например за счет введения в структуру полиэлектролитов гидрофобных фрагментов. Такая иммобилизация является обратимой, поскольку полиэлектролитный комплекс может быть разрушен при изменении рН или при увеличении ионной силы раствора, и представляет пример возможной регуляции доступности субстрату и связанных с этим изменений активности ферментов в живых системах, содержащих природные полиэлектролиты (ДНК, РНК, полисахариды, белки), что в последнее время понимается как условия макромолекулярного краудинга [69]. Следует отметить, что подобная регуляция каталитической активности ферментов (и в широком смысле функциональной активности белков) за счет регуляции доступности, например при переходе из раствора в осадок, может осуществляться не только в результате небольших

изменений рН или ионной силы раствора, но и изменения температуры (рис. 10). Примером таких стимул-чувствительных систем могут служить конъюгаты ферментов с полимерами [70–76]. Включение ферментов в структуру полиэлектролитных комплексов в результате ковалентного присоединения к поликатиону или полианиону позволяет создать препарат иммобилизованного фермента, количественный переход которого из раствора в осадок легко регулировать незначительным изменением рН или ионной силы окружающей среды [70–75], а также температуры [76].

В этом случае можно создавать нестехиометрические полиэлектролитные комплексы, ядро которых образовано за счет весьма плотного взаимодействия противоположно заряженных цепей, окруженного солюбилизирующими «хвостами» полиэлектролита, находящегося в избытке. При незначительном изменении рН в такой системе изменяется суммарный заряд комплекса, что приводит к его выпадению в осадок. Такое же изменение кислотности среды в противоположном направлении приводит к растворению осадка (рис. 10, А).

На этой основе были созданы препараты иммобилизованных обратимо растворимых препаратов фермента [72], достоинством которых является возможность проведения биокаталитических

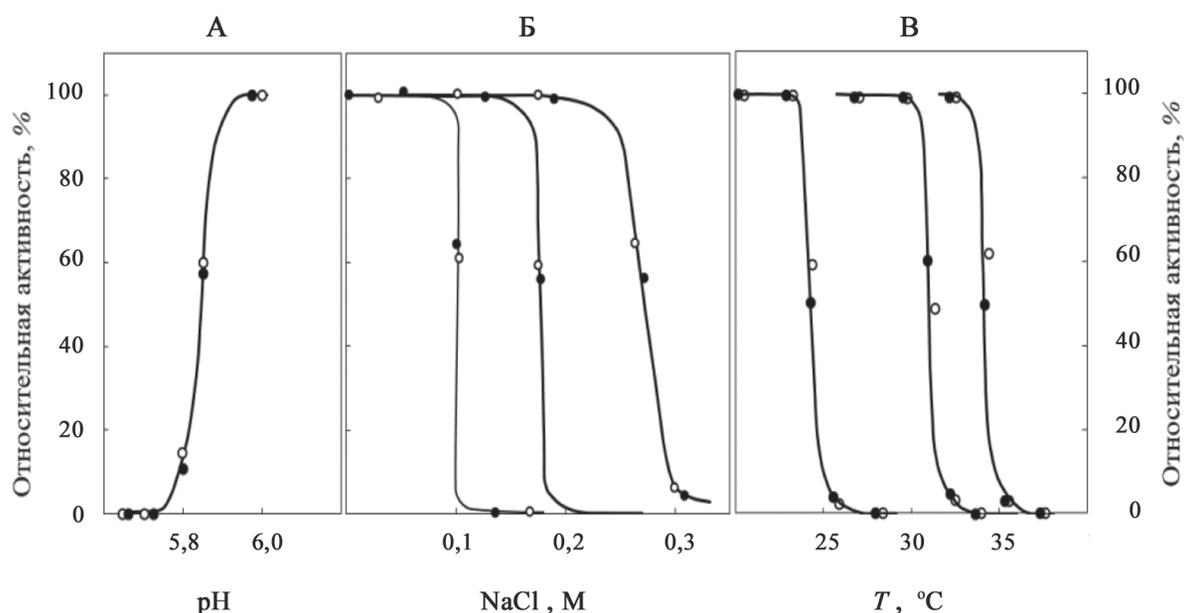


Рис. 10. Изменение каталитической активности пенициллинацилазы (○) и алкогольдегидрогеназы (●), включенных в состав нестехиометрических полиэлектролитных комплексов, образованных полиметакриловой кислотой и поли-4-винил-N-этилпиридиний бромидом, при изменении свойств реакционной среды: рН (А) и ионной силы (Б); В – зависимость изменения каталитической активности конъюгатов пенициллинацилазы (○) и α -химотрипсина (●) с поли-N-винилкапролактамом от температуры

превращений в гомогенных условиях с растворенным биокатализатором (без диффузионных осложнений) и перевода биокатализатора в осадок для его отделения после завершения процесса, чтобы потом опять растворить для последующего цикла. В первую очередь это представляет интерес в процессах превращения высокомолекулярных и плохо растворимых субстратов. Впоследствии такие стимул-чувствительные конъюгаты ферментов с полимерами получили название «умные» (smart) биокатализаторы [77–80].

Детальное изучение кинетики гидролиза бензилпенициллина, катализируемого препаратом пенициллинацилазы, включенной в состав нестехиометрического комплекса, образованного полиметакриловой кислотой и поли-4-винил-N-этилпиридинийбромидом в соотношении 3:1, в котором фермент был ковалентно присоединен к поликатиону, показало отсутствие влияния на значение константы Михаэлиса, в отличие от нативной пенициллинацилазы, некоторое снижение (в 2,5 раза) каталитической константы и изменение профиля рН-зависимости в щелочной среде, а также существенное снижение (в 50 раз) ингибирующего влияния продукта реакции – фенилуксусной кислоты [71]. Было показано, что уникальным свойством пенициллинацилазы, включенной в вышеописанный полиэлектролитный комплекс, является способность саморегуляции: благодаря чувствительности фазового состояния к ионной силе раствора и рН, реакция в зависимости от начальных условий в какой-то момент может остановиться, не достигнув полного превращения субстрата в продукты реакции [71]. Этот пример наталкивает на мысль, что подобный

принцип регуляции может реализоваться и в живых системах [80].

Заключение

Исследование кинетики реакций, катализируемых пенициллинацилазами, позволило не только разработать математические модели, описывающие изменение концентрации компонентов реакции от времени (вплоть до ее завершения), но и лучше понять молекулярные механизмы действия ферментов семейства, создать методы титрования их активных центров, регуляции каталитических свойств, разработать стимул-чувствительные биокатализаторы, а также найти более эффективные и новые пути практического применения пенициллинацилаз. Количественная характеристика препаратов пенициллинацилаз из разных источников и их мутантов на основе экспериментально определяемых кинетических параметров стала неотъемлемой частью методологии для подтверждения предсказаний биоинформатического анализа и компьютерного молекулярного моделирования при поиске более эффективных биокатализаторов, позволяющих добиться улучшения функциональных свойств и стабильности фермента. Необходимо отдать должное заслугам создателя научной школы химической энзимологии в России Ильи Васильевича Березина, его таланту и умению выбирать перспективные научные задачи, когда в 1960-е годы он решил круто изменить тему своей работы, занявшись кинетикой действия ферментов и практическим применением биокатализа. Изучение пенициллинацилаз – одно из тех направлений, где подходы, разработанные под руководством И.В. Березина, были успешно использованы и продолжают применяться.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Швядас В.К. // Имобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы. Под ред. Березина И.В., Антонова В.К., Мартиника К. Т. 2. М., 1976. С. 221.
2. Sakaguchi K., Murao S. // J. Agr. Chem. Soc. Japan. 1950. Vol. 23. P. 411.
3. Murao S. // J. Agr. Chem. Soc. Japan. 1955. Vol. 29. P. 400.
4. Rolinson G.N., Batchelor F.R., Butterworth D., Cameron-Wood J., Cole M., Eustace G.C., Hart M.V., Richards M., Chain E.B. // Nature. 1960. N 187. P. 263.
5. Claridge C.A., Gourevitch A., Lein J. // Nature. 1960. Vol. 187. P. 237.
6. Kaufmann W., Bauer K. // Naturwissenschaften. 1960. Vol. 47. P. 474.
7. Huang H.T., English A.R., Seto T.A., Shull G.M., Sovin B.A. // J. Am. Chem. Soc. 1960. Vol. 82. P. 3790.
8. Svatek E. // Czech patent. 1965. N 116959.
9. Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M.D. // Biochim. Biophys. Acta – Enzymology. 1972. Vol. 276. N 1. P. 250.
10. Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M.D. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol. 276. P. 250.
11. Lee S.B., Ryu D.D.Y. // Enzyme Microb. Technol. 1982. Vol. 4. P. 35.
12. Self D.A., Kay G., Lilly M.D., Dunnill P. // Biotechnol. Bioeng. 1969. Vol. 11. P. 337.
13. Brandl E. // Z. Physiol. Chem. 1965. Vol. 342. P. 86.
14. Березин И.В., Клесов А.А., Швядас В.К., Ныс П.С.,

- Савицкая Е.М. // Антибиотики. 1974. Т. 19. № 10. С. 880.
15. Berezin I.V., Klivanov A.M., Klyosov A.A., Martinek K., Švedas V.K. // FEBS Lett. 1975. Vol. 49. N 3. P. 325.
16. Kutzbach C., Rauenbusch E. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1974. Vol. 355. P. 45.
17. Findlater J.D., Orsi B.A. // Anal. Biochem. 1974. Vol. 58. P. 294.
18. Veronese F., Franchi D., Boccu E., Guerrato A., Orsolini P. // II Farmako Ed. Sc. 1981. Vol. 36. N 7. P. 663.
19. Plaskie A., Roets E., Vanderhaeghe H. // J. Antibiot. 1978. Vol. 31. P. 783.
20. Borkar P.S., Thadani S.B., Ramachandran S. // Hind. Antibiot. Bull. 1978. Vol. 20. N 3–4. P. 81.
21. Robak M., Szewczuk A. // Acta Biochim. Pol. 1981. Vol. 28. P. 275.
22. Швядас В.К., Клесов А.А., Ныс П.С., Савицкая Е.М., Березин И.В. // Антибиотики. 1976. Т. 21. № 8. С. 698.
23. Szentirmai A. // Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 1965/66. Vol. 12. P. 395.
24. Березин И.В., Клесов А.А., Марголин А.Л., Ныс П.С., Савицкая Е.М., Швядас В.К. // Антибиотики. 1976. Т. 21. № 6. С. 519.
25. Марголин А.Л., Швядас В.К., Ныс П.С., Кольцова Е.В., Савицкая Е.М., Березин И.В. // Антибиотики. 1978. Т. 23. № 2. С. 114.
26. Švedas V.K., Margolin A.L., Berezin I.V. // Enzyme. Microb. Technol. 1980. Vol. 2. P. 138.
27. Švedas V.K., Margolin A.L., Borisov I.L., Berezin I.V. // Enzyme. Microb. Technol. 1980. Vol. 2. P. 313.
28. Kasche V., Galunsky B. // Biophys. Biochem. Res. Comm. 1982. Vol. 104. P. 1215.
29. Konecny J., Schneider A., Sieber M. // Biotechnol. Bioeng. 1983. Vol. 25. P. 451.
30. Kasche V., Haufner U., Riechmann L., Zoellner R. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1984. Vol. 434. P. 99.
31. Юшко М.И., Швядас В.К. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 12. С. 1624.
32. Youshko M.I., Chilov G.G., Shcherbakova T.A., Švedas V.K. // Biochim. Biophys. Acta: Proteins & Proteomics. 2002. Vol. 1599. N 1–2. P. 134.
33. Юшко М.И., Буханов А.Л., Швядас В.К. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 3. С. 403.
34. Alkema W.B.L., de Vries E., Floris R., Janssen D.B. // Eur. J. Biochem. 2003. Vol. 270. P. 3675.
35. Jager S.A.W., Shapovalova I.V., Jekel P.A., Alkema W.B.L., Švedas V.K., Janssen D.B. // J. Biotechnol., 2008. Vol. 133. N 1. P. 18.
36. Шаповалова И.В., Алкема В.Б.Л., Ямсцова О.В., де Врис Э., Гуранда Д.Ф., Янссен Д.Б., Швядас В.К. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 3, С. 103.
37. Bruggink A., Roos E.C., de Vroom E. // Org. Process Res. Dev. 1998. Vol. 2. P. 128.
38. Ospina S., Barzana E., Ramirez O.T., Lopez-Munquía A. // Enzyme Microb. Technol. 1996. Vol. 19. P. 462.
39. Youshko M.I., van Langen L.M., de Vroom E., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // Biotechnol. Bioeng. 2002. Vol. 78. N 5. P. 589.
40. van Langen L.M., de Vroom E., van Rantwijk F., Sheldon R.A. // FEBS Lett. 1999. Vol. 456. P. 89.
41. Boccu E., Ebert C., Gardossi L., Gianferrara T., Zacchigna M., Linda P. // Farmaco. 1991. Vol. 46. P. 565.
42. Kim M.G., Lee S.B. // J. Mol. Cat. B: Enzym. 1996. Vol. 1. P. 181.
43. Fernandez-Lafuente R., Rosell C.M., Guisan J.M. // Enzyme Microb. Technol. 1998. Vol. 23. P. 305.
44. Wei D.Z., Yang L. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2003, Vol. 78. P. 431.
45. Youshko M.I., van Langen L.M., de Vroom E., Moody H., van Rantwijk F., Sheldon R., Švedas V.K. // J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 2003. Vol. 10. P. 509.
46. Youshko M.I., van Langen L.M., De Vroom E., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // Biotechnol. Bioeng. 2001. Vol. 73. P. 426.
47. Youshko M.I., Moody H.M., Bukhanov A.L., Boosten W.H.J., Švedas V.K. // Biotechnol. Bioeng. 2004. Vol. 85. N 3. P. 323.
48. Encarnación-Gómez L.G., Bommarius A.S., Rousseau R.W. // React. Chem. Eng. 2016. Vol. 1. 321.
49. Youshko M.I., Švedas V.K. // Adv. Synth. Cat. 2002. Vol. 344. N 8. P. 894.
50. Юшко М.И., Синев А.В., Швядас В.К. // Биохимия. 1999. Т. 64. № 10. С. 1415.
51. Чельцов А.В. Анализ кинетики одновременного превращения нескольких субстратов, катализируемого одним ферментом. Дипломная работа, химический факультет МГУ, кафедра химической энзимологии. М., 1996.
52. Садыбеков А.А. Изучение интегральной кинетики одновременного превращения ферментом нескольких субстратов. Дипломная работа, химический факультет МГУ, кафедра химической энзимологии. М., 2013.
53. Cheltsov A., Guranda D., Beltser A., Švedas V. Enzymatic hydrolysis of two competing substrates catalyzed by single enzyme, Abstracts of Int. Conf. Biocatalysis-98: Fundamentals and applications. Pushchino, Russia, 1998. P. 62.
54. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Клесов А.А., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1977. Т. 3. С. 546.
55. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Клесов А.А., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 232. N. 5. С. 1127.
56. Gold A.M., Fahrney D. // Biochemistry. 1964. Vol. 3. P. 783.
57. Švedas V., Guranda D., van Langen L., van Rantwijk F., Sheldon R. // FEBS Lett. 1997. Vol. 417. P. 414.
58. Van Langen L.M., Janssen M.H.A., Oosthoek N.H.P., Pereira S.R.M., Švedas V.K., Van Rantwijk F., Sheldon R.A. // Biotechnol. Bioeng. 2002. Vol. 79. N 2. P. 224.
59. Duggleby H., Tolley S., Hill C. // Nature. 1995. Vol. 373. P. 264.

60. Liese A., Hilterhaus L. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42. P. 6236.
61. Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. // *Chem. Soc. Rev.* 2009. Vol. 38. P. 453.
62. Bolivar J.M., Eisl I., Nidetzky B. // *Catalysis Today.* 2016. Vol. 259. N 1. P. 66.
63. Pchelintsev N.A., Youshko M.I., Švedas V.K. // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2009. Vol. 56. N 4. P. 202.
64. Margolin A.L., Švedas V.K., Berezin I.V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. Vol. 616. P. 283.
65. Montes T., Grazú V., Manso I., Galán B., López-Gallego F., González R., Hermoso J.A., García J.L., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. // *Advanced Synthesis and Catalysis.* 2007. Vol. 349. N 3. P. 459.
66. Jager S.A.W., Jekel P.A., Janssen D.B. // *Enzyme and Microbial Technology.* 2007. Vol. 40. N 5. P. 1335.
67. Ignatova Z., Stoeva S., Galunsky B. // *Biotechnology Lett.* 1998. Vol. 20. P. 977.
68. Стрельцова З.А., Швядас В.К., Максименко А.В., Клёсов А.А., Браудо Е.Е., Толстогузов В.Б., Березин И.В. // *Биоорганическая химия.* 1975. Т. 1. № 10. С. 1464.
69. Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Uversky V.N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15. P. 23090.
70. Марголин А.Л., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Швядас В.К., Кабанов В.А., Березин И.В. // *Докл. АН СССР.* 1980. Т. 253. С. 1508.
71. Margolin A.L., Izumrudov V.A., Zezin A.B., Švedas V.K., Kabanov V.A., Berezin I.V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. Vol. 660. N 2. P. 359.
72. Margolin A.L., Izumrudov V.A., Zezin A.B., Švedas V.K. // *Biotechnol. Bioeng.* 1982. Vol. 24. P. 237.
73. Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Швядас В.К., Кабанов В.А. // *Докл. АН СССР.* 1983. Т. 272. № 1. С. 230.
74. Изумрудов В.А., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Зезин А.Б., Швядас В.К., Кабанов В.А. // *Докл. АН СССР.* 1983. Т. 269. № 3. С. 631.
75. Марголин А.Л., Изумрудов В.А., Шерстюк С.Ф., Зезин А.Б., Швядас В.К. // *Молек. Биол.* 1983. Т. 17. № 5. С. 1001.
76. Кирш Ю.Э., Галаев И.Ю., Карапутадзе Т.М., Марголин А.Л., Швядас В.К. // *Биотехнология.* 1987. Т. 3. № 2. С. 184.
77. Галаев И.Ю. // *Успехи химии.* 1995. Т. 64. № 5. С. 505.
78. Roy I., Sharma S., Gupta M.N. // *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 2004. Vol. 86. P. 159.
79. Shakya A.K., Nandakumar K.S. // *J. R. Soc. Interface.* 2018. Vol. 15. P. 20180062.
80. Muronetz V.I., Pozdyshev D.V., Semenyuk P.I. // *Polymers.* 2022. Vol. 14. N 19. P. 4204.

Информация об авторах

Панин Николай Владимирович – ст. науч. сотр. НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского; сотр. лаборатории информатики Научно-исследовательского вычислительного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (panin@belozersky.msu.ru);

Гуранда Дорел Феодорович – ст. науч. сотр. НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, канд. хим. наук (dorel@belozersky.msu.ru);

Шаповалова Ирина Владимировна – ст. препод. факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (shapoval@belozersky.msu.ru);

Швядас Витаутас-Юозас Каятоно – профессор факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией информатики Научно-исследовательского вычислительного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (vytas@belozersky.msu.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.04.2023;
одобрена после рецензирования 12.04.2023;
принята к публикации 14.04.2023.