



УДК 577.156.3.02

НОВЫЕ ХРОМОФОРНЫЕ СУБСТРАТЫ α -ХИМОТРИПСИНА

Дьяченко Е. Д., Волкова Л. И., Козлов Л. В.,
Антонов В. К.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемлякина
Академии наук СССР, Москва

Синтезированы субстраты α -химотрипсина — производные *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина: метиловый, этиловый и *n*-нитрофениловый эфиры, амид, метиламид, гидразид, анилид, *n*-нитроанилид, глицинамид и *L*-аланинамид. Различия в светопоглощении нитрохромофора в субстратах и продуктах реакции гидролиза позволяют следить за ферментативным процессом спектрофотометрически. Определены кинетические константы гидролиза хромофорных субстратов химотрипсином при рН 7,0 и 25°.

Ранее [1] мы показали, что наличие полярографически активных группировок в молекуле субстрата позволяет с высокой чувствительностью регистрировать ферментативную реакцию. Эффективной хромофорной и полярографически активной является нитрогруппа, которую вводили в неспецифическую часть субстратов α -химотрипсина: *n*-нитрофениловые эфиры, *n*-нитроанилиды [2, 3], ограничивая тем самым тип субстратов. Хромофорный характер тирозинового остатка позволяет исследовать гидролиз некоторых пептидов [4], однако небольшая величина $\Delta\epsilon$ не дает возможности проводить исследования при низких концентрациях пептидов и ограничивает чувствительность метода. В связи с этим нам представлялось перспективным использовать субстраты с хромофорной меткой в специфической, аминокислотной части, различающиеся характером гидролизуемой связи, что позволило бы следить за гидролизом разных субстратов с помощью одного метода. Такими хромофорными субстратами могли бы быть производные *L*-*n*-нитрофенилаланина. Пептиды, содержащие остаток *L*-*n*-нитрофенилаланина, применяются в качестве хромофорных субстратов пепсина [5]. Было показано также, что метиловый и этиловый эфиры *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина гидролизуются α -химотрипсином [6], однако в этих исследованиях за гидролизом следили титриметрически, а спектрофотометрических измерений не проводили.

Нами были синтезированы известные [6] метиловый и этиловый эфиры *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина и впервые получены его амид, метиламид, гидразид, анилид, *n*-нитроанилид, глицинамид, *L*-аланинамид и *n*-нитрофениловый эфир. Ряд промежуточных соединений, необходимых для синтеза этих субстратов, также получен впервые.

Удобным методом регистрации гидролиза синтезированных субстратов оказались спектрофотометрические измерения при 310 нм. Значения мо-

Сокращения даны в соответствии с рекомендациями IUPAC — IUB (1974) J. Mol. Biol., 55, 299: ONp — *n*-нитрофенокси, Phe (NO₂) — *L*-*n*-нитрофенилаланин, ДМФА — диметилформамид.

Таблица 1

Молярные экстинкции (ϵ) субстратов и некоторых продуктов, а также $\Delta\epsilon$ для полного гидролиза субстратов при 310 нм (0,2 М фосфатный буфер, pH 7,0; 3% ДМФА)

Вещество *	ϵ	$\Delta\epsilon$
AcPhe(NO ₂)-OMe	3697	1636
»	2000 **	1300 **
AcPhe(NO ₂)-OEt	3733	1600
AcPhe(NO ₂)-NH ₂	3900	1433
»	1100 ***	550 ***
AcPhe(NO ₂)-NHMe	4132	1201
AcPhe(NO ₂)-NHNH ₂	3763	1570
AcPhe(NO ₂)-NHC ₆ H ₅	2900	2453
AcPhe(NO ₂)-NHC ₆ H ₄ NO ₂	11200	3957
AcPhe(NO ₂)-GlyNH ₂	3913	1420
AcPhe(NO ₂)-AlaNH ₂	3933	1400
AcPhe(NO ₂)-ONp(pH 5,0)	5600 ***	8170 ***
AcPhe(NO ₂)OH	5333	
»	3300 **	
»	1650 ***	
» (pH 5,0)	4940 ***	
NH ₂ C ₆ H ₄ NO ₂	1910	
NH ₂ C ₆ H ₅	20	
NO ₂ C ₆ H ₄ NO ₂	8830 ***	

* Дефисом показана гидролизуемая связь.

** При 320 нм.

*** При 330 нм.

лярных экстинкций субстратов и некоторых продуктов гидролиза и $\Delta\epsilon$ при полном гидролизе субстратов приведены в табл. 1.

Кинетику гидролиза α -химотрипсином всех субстратов изучали в одних и тех же условиях: 0,2 М фосфатный буфер (pH 7,0), 3% (по объему) ДМФА, 25°. Исключение составляли анилид и *L*-аланинамид *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина, для повышения растворимости которых в систему вводили большие количества ДМФА (соответственно 20 и 15%) и *n*-нитрофениловый эфир, гидролиз которого изучали при pH 5,0. Константы скорости гидролиза анилида и *L*-аланинамида *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина пересчитывали с учетом ингибирования растворителем, константу ингибирования которого при гидролизе метилового эфира *N*-ацетилфенилаланина нашли равной $1,53 \pm 0,27$ М. Величины $k_{кат}$ и $k_{кат}/k_m$ (как гидролиза *n*-нитрофенилового эфира *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина при pH 7,0 были рассчитаны из данных, полученных при pH 5,0 с использованием величин pK_1 7,3 для k_{+3} и pK_1 6,9 для k_{+2} [7]. Значения кинетических констант приведены в табл. 2 в порядке уменьшения величин $k_{кат}/K_m$ (как).

Для сравнения следует указать, что, по литературным данным [6], метиловый и этиловый эфиры *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина имеют соответственно $k_{кат}$ 21,9 и 20 с⁻¹ и K_m (как) 1,4 и 1,3 мМ при гидролизе α -химотрипсином в 0,01 М трис-HCl-буфере (pH 8,0), 0,1 М KCl, 0,05 М CaCl₂ при 30°.

Почти все изученные вещества оказались хорошими субстратами α -химотрипсина. Исключение составляет метиламид *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина, практически не гидролизуемый ферментом. Плохой гидролиз метиламидов наблюдается и в случае других *N*-замещенных аминокислот [8, 9]. По данным ингибирования гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина, он связывается ферментом весьма прочно. При этом, вероятно, образуется непродуктивный комплекс. «Правильная» сорбция субстрата в активном центре фермента реализуется, по видимому, чрезвычайно редко.

Кинетические константы гидролиза α -химотрипсина (0,2 М фосфатный буфер, рН 7,0; 3% ДМФА, 25°)

Субстрат	Концентрация, М		$k_{кат}$, с ⁻¹	$K_M(каж)$, М	$k_{кат}/K_M(каж)$, М ⁻¹ с ⁻¹
	субстрата	фермента			
AcPhe(NO ₂)-ONp	(0,76—2,62)·10 ⁻⁵	10 ⁻⁸	3,94 ± 1,29	6,46 ± 2,09	(6,4 ± 0,6)·10 ⁴
»	»	»	264 ± 86		(287 ± 26)·10 ⁴
AcPhe(NO ₂)-OEt	(0,1—1)·10 ⁻³	5·10 ⁻⁸	2,94 ± 0,37	45,2 ± 6,2	6501 ± 366
AcPhe(NO ₂)-OMe	(0,1—1)·10 ⁻³	10 ⁻⁷	1,47 ± 0,16	38,0 ± 4,9	3871 ± 264
AcPhe(NO ₂)-AlaNH ₂ *	(5—31)·10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	(3,37 ± 0,56)·10 ⁻²	57,8 ± 10,0	58,3 ± 0,7
»	»	»	»	25,4 ± 4,4	132,8 ± 4,6
AcPhe(NO ₂)-NHCO ₂ H ₄ NO ₂	(1—5)·10 ⁻⁵	3·10 ⁻⁶	(4,88 ± 0,55)·10 ⁻³	7,30 ± 0,85	67 ± 2
AcPhe(NO ₂)-NHCO ₂ H ₅ **	(3—42)·10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	(8,4 ± 3,4)·10 ⁻⁴	55,5 ± 22,3	1,52 ± 0,04
»	»	»	»	20,5 ± 8,2	4,11 ± 0,11
AcPhe(NO ₂)-NHMe	10 ⁻²	4·10 ⁻⁴	1,4·10 ⁻⁴	5	2,8
AcPhe(NO ₂)-NH ₂	(5—30)·10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	(4,77 ± 0,40)·10 ⁻³	242 ± 18	2,25 ± 0,04
AcPhe(NO ₂)-HNHNH ₂	(5—30)·10 ⁻⁴	4,8·10 ⁻⁵	(2,12 ± 0,18)·10 ⁻³	174 ± 16	1,22 ± 0,04
AcPhe(NO ₂)-GlyNH ₂	(5—30)·10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	(2,25 ± 0,23)·10 ⁻³	253 ± 29	0,89 ± 0,05

* 15% ДМФА.

** 20% ДМФА.

Следует обратить внимание на необычайно высокую скорость гидролиза *n*-нитрофенилового эфира по сравнению с метиловым и этиловым эфирами *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина. Это обстоятельство может свидетельствовать о том, что для этилового и метилового эфиров определяющей скоростью реакции является стадия ацилирования фермента, а не его деацилирование, в отличие от аналогичных производных *N*-ацетил-*L*-фенилаланина и *L*-триптофана [2]. Величина $K_{m(\text{каж})}$ для эфирных субстратов *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина может соответствовать истинной величине K_s . Можно сопоставить специфичность α -химотрипсина, проявляемую на стадии связывания изучаемых субстратов, со специфичностью на стадии ацилирования фермента, поскольку величины $k_{\text{кат}}$ близки величинам k_{+2} для всех изученных субстратов, за исключением *n*-нитрофенилового эфира. Ряд специфичности в порядке возрастания $K_{m(\text{каж})}$ — убывания средства для изменяемой части субстратов — следующий: $-\text{NHMe}$, $-\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$, $-\text{NHC}_6\text{H}_5$, $-\text{L-AlaNH}_2$, $-\text{OMe}$, $-\text{OEt}$, $-\text{NHNH}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{GlyNH}_2$. Ряд специфичности в порядке уменьшения $k_{\text{кат}}$ существенно отличается от первого: $-\text{OEt}$, $-\text{OMe}$, L-AlaNH_2 , $-\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{GlyNH}_2$, $-\text{NHNH}_2$, $-\text{NHC}_6\text{H}_5$, $-\text{NHCH}_3$. Последний ряд для многих членов имеет противоположную первому последовательность. Характер каталитической активности α -химотрипсина связан с природой гидролизуемой связи [10], что будет обсуждено в одной из следующих статей. Сейчас же отметим, что правило, предложенное Ноулзом [11] («лучшее связывание — лучший катализ»), для данного ряда субстратов не соблюдается.

Экспериментальная часть

L-*n*-Нитрофенилаланин получали нитрованием *L*-фенилаланина дымящей азотной кислотой [5]. Выход 66%. Т. пл. 206—208° (разл.), $[\alpha]_D^{20} + 11,4^\circ$ (*c* 0,5; 1 н. HCl).

Метиловый эфир *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина получали по методу [6]. Выход 60%. Т. пл. 122—123°, $[\alpha]_D^{20} - 17,64^\circ$ (*c* 1; ДМФА). Найдено, %: С 54,14; Н 5,39; N 10,40. $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: С 54,13; Н 5,30; N 10,52.

Этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина [3]. Выход 72%. Т. пл. 113—114°, $[\alpha]_D^{20} - 6,9^\circ$ (*c* 1; ДМФА). Найдено, %: С 54,99; Н 5,84; N 9,60. $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: С 55,71; Н 5,75; N 10,00.

N-Ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланин [3]. Выход 70%. Т. пл. 167—168°, $[\alpha]_D^{20} - 5,0^\circ$ (*c* 1, ДМФА). Найдено, %: С 52,71; Н 4,95; N 11,03. $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: С 52,38; Н 4,80; N 11,11.

Амид *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина. 20 ммоль $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OMe}$ растворяли в 20 мл абс. метанола, предварительно насыщенного сухим аммиаком при 0°. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 4°. Растворитель упаривали в вакууме, твердый остаток дважды перекристаллизовывали из абс. этанола. Выход 80%. Т. пл. 214—215°, $[\alpha]_D^{20} - 9,0^\circ$ (*c* 1, ДМФА). Найдено, %: С 52,57; Н 5,50; N 16,27. $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$. Вычислено, %: С 52,58; Н 5,22; N 16,73.

Метиламид *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина. В насыщенный при -25° раствор метиламина в 10 мл абс. метанола приливали раствор, содержащий 15 ммоль $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OMe}$ в 10 мл абс. метанола. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 4°. Растворитель упаривали в вакууме, твердый остаток дважды перекристаллизовывали из абс. этанола. Выход 72,5%. Т. пл. 232—233°, $[\alpha]_D^{20} - 12,0^\circ$ (*c* 1, ДМФА). Найдено, %: С 54,66; Н 5,78; N 14,93. $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$. Вычислено, %: С 54,33; Н 5,70; N 15,84.

Гидразид *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина. К раствору, содержащему 10 ммоль $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{OMe}$ в 20 мл абс. метанола, прибавляли при 0° 30 ммоль гидразин-гидрата и смесь оставляли при этой температуре на 48 ч. Выпавший осадок отфильтровывали и дважды перекристаллизовывали

из абс. метанола. Выход 91%. Т. пл. 209—210°, $[\alpha]_D^{20} -4,2^\circ$ (с 1, ДМФА).
Найдено, %: С 49,88; Н 5,66; N 21,23. $C_{11}H_{14}N_4O_4$. Вычислено, %: С 49,62;
Н 5,30; N 21,05.

N-Карбобензокси-*L*-*n*-нитрофенилаланин получали по методу [5]. Выход 86%. Т. пл. 135—136°.

Анилид N-карбобензокси-*L*-*n*-нитрофенилаланина. К раствору, содержащему 10 ммоль ZPhe(NO₂) в абс. тетрагидрофуране, прибавляли при 20° 10 ммоль свежеперегнанного анилина и раствор, содержащий 11 ммоль *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида в тетрагидрофуране. Реакционную смесь перемешивали при этой температуре 48 ч, выпавший осадок *N, N'*-дициклогексилмочевны отфильтровывали, а фильтрат упаривали досуха в вакууме. Твердый осадок дважды перекристаллизовывали из 90% водного этанола. Выход 75%. Т. пл. 236—237°. Найдено, %: С 65,80; Н 5,15; N 10,06. $C_{23}H_{21}N_3O_5$. Вычислено, %: С 65,83; Н 5,05; N 10,02.

Бромгидрат анилида L-*n*-нитрофенилаланина. К раствору, содержащему 12 ммоль анилида ZPhe(NO₂) в 15 мл ледяной уксусной кислоты, прибавляли при комнатной температуре 17 мл насыщенного раствора сухого бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте. После прекращения выделения CO₂ (1,5 ч) раствор частично упаривали в вакууме, приливали сухой эфир, выпавший осадок отфильтровывали и промывали эфиром. Выход 92%.

Анилид N-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина. К раствору, содержащему 10 ммоль бромгидрата анилида в 20 мл абс. хлороформа, одновременно прибавляли при 0° 10 ммоль триэтиламина и 12 ммоль уксусного ангидрида. Затем реакционную смесь перемешивали 2 ч при 20°, раствор промывали 3% NaHCO₃, 3% HCl, водой, сушили над MgSO₄. Растворитель упаривали в вакууме, твердый остаток дважды перекристаллизовывали из смеси ацетон — спирт — вода (2 : 2 : 1). Выход 70%. Т. пл. 266—267°, $[\alpha]_D^{20} + 48,0^\circ$ (с 1, ДМФА). Найдено, %: С 61,97; Н 5,50; N 12,31. $C_{17}H_{17}N_3O_4$. Вычислено, %: С 62,37; Н 5,25; N 12,85.

n-Нитроанилиды *N*-ацил-*L*-*n*-нитрофенилаланина получали аналогично анилиду.

n-Нитроанилид *N*-карбобензокси-*L*-*n*-нитрофенилаланина. Выход 73%. Т. пл. 202—203°. Найдено, %: С 59,33; Н 4,65; N 12,05. $C_{23}H_{20}N_4O_7$. Вычислено, %: С 59,48; Н 4,34; N 12,06.

n-Нитроанилид *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина. Выход 67%. Т. пл. 234—235°, $[\alpha]_D^{20} -91,0^\circ$ (с 1, ДМФА). Найдено, %: С 54,37; Н 4,52; N 14,85. $C_{17}H_{16}N_4O_6$. Вычислено, %: С 54,84; Н 4,33; N 15,05.

n-Нитрофениловый эфир *N*-карбобензокси-*L*-*n*-нитрофенилаланина. К охлажденному до 0° раствору, содержащему 10 ммоль ZPhe(NO₂) и 12 ммоль *n*-нитрофенола в ДМФА, прибавляли при перемешивании раствор, содержащий 10 ммоль *N, N'*-дициклогексилкарбодиимида в ДМФА. Реакционную смесь перемешивали 40 мин при 0° и 24 ч при 20°. *N, N'*-Дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха в вакууме, твердый остаток перекристаллизовывали из абс. этанола. Выход 40%. Т. пл. 157—158°.

Бромгидрат n-нитрофенилового эфира *L*-*n*-нитрофенилаланина. Удаление *N*-карбобензоксигруппы проводили насыщенным раствором сухого бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте, как описано выше. Выход 92%.

n-Нитрофениловый эфир *N*-ацетил-*L*-*n*-нитрофенилаланина. К охлажденной до 0° суспензии, содержащей 30 ммоль бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира Phe(NO₂) в свежеперегнанном уксусном ангидриде, прикапывали 30 ммоль триэтиламина. Через 24 ч осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха в вакууме, твердый остаток дважды перекристаллизовывали из сухого этилацетата. Выход 50%. Т. пл. 213—215°, $[\alpha]_D^{20} -54,3^\circ$ (с 1, ДМФА). Найдено, %: С 54,41; Н 4,76; N 11,0. $C_{17}H_{15}N_3O_7$. Вычислено, %: С 54,69; Н 4,05; N 11,23.

Метиловый эфир N-карбобензоксиг-L-п-нитрофенилаланил-L-аланина. К суспензии, содержащей 10 ммоль ZPhe(NO₂), в 20 мл абс. этилацетата, при комнатной температуре прибавляли L-AlaOMe (из раствора, содержащего 10 ммоль хлоргидрата эфира в 5 мл ДМФА и 10 ммоль триэтиламина) и этилацетатный раствор N,N'-дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали 2 сут, осадок отфильтровывали. Этилацетат упаривали в вакууме (20°, 11 мм). К оставшемуся раствору ДМФА приливали 300 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 3% NaHCO₃, водой, 2 н. лимонной кислотой и водой. После высушивания продукт дважды перекристаллизовывали из 70% водного этанола. Выход 70,5%. Т. пл. 168—170°, [α]_D²⁰ —16,9° (с 1, ДМФА).

Этиловый эфир N-карбобензоксиг-L-п-нитрофенилаланилглицина получали вышеописанным способом. Выход 76%. Т. пл. 150—151°, [α]_D²⁰ —23,9° (с 1, ДМФА).

Удаление N-карбобензоксигруппы в обоих дипептидах проводили обычным способом: насыщенным раствором бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте. Выход 88—92%. Бромгидраты дальнейшей очистке не подвергали.

Метиловый эфир N-ацетил-L-п-нитрофенилаланил-L-аланина. К раствору, содержащему 10 ммоль бромгидрата метилового эфира дипептида в 15 мл абс. хлороформа, при 0° прибавляли 10 ммоль триэтиламина, затем 12 ммоль уксусного ангидрида. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 20° и 24 ч при 4°. Раствор промывали последовательно водой, 3% NaHCO₃, водой, 2 н. лимонной кислотой и водой. Сушили над MgSO₄, растворитель упаривали в вакууме. Твердый остаток дважды перекристаллизовывали из смеси этилацетат — гексан. Выход 90%. Т. пл. 234—236° (180—182° изменение модификации).

Этиловый эфир N-ацетил-L-п-нитрофенилаланилглицина получали аналогично метилому эфиру. Выход 91%. Т. пл. 221—223°, [α]_D²⁰ —24,0° (с 1, ДМФА).

Амид N-ацетил-L-п-нитрофенилаланил-L-аланина. AcPhe(NO₂) AlaOMe растворяли в абс. метаноле, насыщенном аммиаком при 0°. Реакционную смесь оставляли на 48 ч при 4°. Растворитель упаривали в вакууме, твердый остаток дважды перекристаллизовывали из 80% этанола. Выход 88%. Т. пл. 271—272° (разл.), [α]_D²⁰ +11,9° (с 1, ДМФА). Найдено, %: С 52,64; Н 5,13; N 17,00. C₁₄H₁₈N₄O₅. Вычислено, %: С 52,17; Н 5,63; N 17,38.

Амид N-ацетил-L-п-нитрофенилаланилглицина получали аналогичным образом. Выход 85%. Т. пл. 230—231°, [α]_D²⁰ —14,2° (с 1, ДМФА). Найдено, %: С 51,49; Н 5,38; N 17,26. C₁₃H₁₆N₄O₅. Вычислено, %: С 50,64; Н 5,23; N 18,18.

α-Химотрипсин — кристаллический препарат Олайнского завода химических препаратов, содержание активного фермента, определенное титрованием N-транс-циннамоилимидазолом [12], равно 70—75%.

Начальную стационарную скорость реакции ферментативного гидролиза измеряли с помощью высокочувствительного самопишущего спектрофотометра собственной конструкции с чувствительностью 0,01 ед. оптической плотности на ширину диаграммной ленты самописца (25 см) в кварцевой герметической кювете (толщина слоя 0,1 или 1 см). Измерения основаны на различиях в молярных экстинкциях субстратов и продуктов их гидролиза (рН 7,0) при 310, 320 и 330 нм. Все опыты проводили при 25° в 0,2 н. фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 3% (объемных) ДМФА. Результаты измерений обрабатывали по Лайнуиверу — Берку [13] с использованием метода наименьших квадратов. Обсчет экспериментальных данных производили с помощью ЭКВМ «Электроника-70».

Измерение начальных скоростей гидролиза AcPhe-OMe в присутствии ДМФА в качестве ингибитора проводили с помощью самопишущего рН-стата ТТТ-1с (Radiometer, Дания) при рН 7,0 и 25°. Использовали водные

растворы Ac-L-PheOMe ($2 \cdot 10^{-3}$ — $4 \cdot 10^{-4}$ M), α -химотрипсина (10^{-7} M) и свежеперегнаный ДМФА (10% объемных = 2,1 M). Ионную силу $I = 0,1$ создавали 1 н. KCl. Для ДМФА $K_1 = 1,53 \pm 0,27$ M.

ЛИТЕРАТУРА

1. Antonov V. K., Kozlov L. V., Smirnov P. N., Djachenko E. D., Surovtzev V. I. (1970) *Analyt. Biochem.*, **37**, 160—168.
2. Zerner B., Bond R. P. M., Bender M. L. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 3674—3679.
3. Nagel W., Willig F., Peschke W., Schmidt F. H. (1965) *Z. Physiol. Chem.*, **340**, 1—10.
4. Дьяченко Е. Д., Волкова Л. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) *Мол. биология*, **8**, 879—885.
5. Inouye K., Fruton J. S. (1967) *Biochemistry*, **6**, 1765—1777.
6. Yoshida N., Ishii S. (1972) *J. Biochem.*, **71**, 185—191.
7. Neurath H., Hartley B. S. (1959) *J. Cell. Comp. Physiol.*, **54**, Suppl. 1, 179—202.
8. Applewhite T. H., Niemann C. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 2208—2213.
9. Hein G., Niemann C. (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**, 1341—1355.
10. Kozlov L. V., Antonov V. K., Djachenko E. D. (1971) Abstracts 7th meeting FEBS, Varna, N 181, p. 110.
11. Knowles J. R. (1965) *J. Theoret. Biol.*, **9**, 213—228.
12. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2930—2935.
13. Lineweaver H., Burk D. (1934) *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658—666.

Поступила в редакцию
14.V.1976

NEW CHROMOPHORE SUBSTRATES OF α -CHYMOTRYPSIN

DJACHENKO E. D., VOLKOVA L. I., KOZLOV L. V.,
ANTONOV V. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The following derivatives of N-acetyl-L-p-nitrophenylalanine, which are the substrates of α -chymotrypsin, have been synthesized: methyl, ethyl and p-nitrophenyl esters, as well as amide, methylamide, hydrazide, anilide, p-nitroanilide, glycine amide and L-alanine amide. The difference in optical density for the substrates and reaction products allows to apply spectrophotometry to measure the rates of enzymatic process. The kinetic constants of α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of these substrates have been obtained at pH 7.0 and 25°.