



УДК 577.154.36.02 + 541.128.13

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ
В ГЕТЕРОГЕННЫХ СИСТЕМАХI. КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСЩЕПЛЕНИЯ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИЗОЦИМА

Березин И. В., Клесов А. А., Рабинович М. Л.

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

Разработан теоретический подход к изучению кинетики ферментативных процессов, протекающих в условиях сравнимости начальных концентраций фермента и субстрата. Предлагается использовать данный метод для изучения кинетики ферментативных реакций с нерастворимым субстратом или ферментом, где невозможно заранее определить концентрацию нерастворимого компонента. В качестве примера демонстрируется применимость метода для описания кинетики процесса лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима из белка куриных яиц. Для данного процесса найдены значения $K_m(\text{как}) = 4,2 \cdot 10^{-8}$ М и $k_{\text{кат}}(\text{как}) = 9,5 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹.

Многие ферментативные реакции, проходящие в гетерогенных системах, представляют значительный интерес как в научном, так и в прикладном (технологическом или медицинском) аспектах. Типичным примером таких реакций является гидролиз клеточных стенок микроорганизмов, катализируемый бактериолитическими ферментами — гликозидазами, амидазами, пептидазами и т. д. (в своем обзоре Строминджер и Гузен [1] насчитывают свыше 60 ферментов подобного типа). В гетерогенных системах реагируют многие гликозилтрансферазы, амилазы, целлюлазы, декстраназы, хитиназы и другие ферменты. Для каждого из этих ферментов специфична реакция превращения (в частности, дегградация) водонерастворимого природного субстрата. Однако до настоящего времени в литературе не имеется ни одной работы, в которой были бы определены кинетические параметры подобных ферментативных реакций. Одной из причин этого является неопределенность в оценке «концентрации» полимерного нерастворимого субстрата в реакционной системе и, как следствие, невозможность определения величины константы Михаэлиса ферментативной реакции при использовании классического уравнения Михаэлиса — Ментен. Помимо этого основные подходы к изучению кинетики ферментативных реакций опираются на положение о преобладании начальной концентрации субстрата в растворе по сравнению с начальной концентрацией фермента ($[S]_0 \gg [E]_0$), что является основным условием кинетики «михаэлисовского» типа. В случае же нерастворимого субстрата в принципе невозможно а priori установить соотношение между концентрациями фермента и субстрата в гетерогенной реакционной системе. Это же можно отнести и к многочисленным реакциям ферментативного

превращения растворимых полимерных субстратов, число расщепляемых связей у которых неизвестно.

В настоящей статье разработан подход к расчету кинетических параметров ферментативных реакций немихаэлисовского типа, который позволяет проводить кинетический анализ ферментативных реакций, протекающих в гетерогенных системах (в общем случае независимо от того, субстрат или фермент нерастворимы в условиях опыта). Предлагаемый подход позволяет также проводить кинетический анализ любых гомогенных ферментативных реакций, в которых концентрация «активных центров» фермента или субстрата неизвестна. В этом случае метод позволяет определять абсолютную концентрацию активных центров фермента или субстрата, исходя из кинетических данных.

Экспериментальное подтверждение предлагаемых закономерностей проведено на примере кинетического анализа реакции расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*, катализируемой лизоцимом.

Теоретическая часть. Простейшей схемой для описания кинетики ферментативных реакций является так называемая двухстадийная схема Михаэлиса



в которой E — фермент, S — субстрат, ES — фермент-субстратный комплекс, k_2 — константа скорости первого порядка распада фермент-субстратного комплекса с образованием продуктов реакции P и регенерацией фермента. В качестве основного приближения в дальнейшем будем считать, что скорость образования и диссоциации фермент-субстратного комплекса достаточно большая, так что в ходе ферментативной реакции комплекс ES находится в квазиравновесном состоянии с исходными субстратом и ферментом, определяемом константой диссоциации фермент-субстратного комплекса:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}. \quad (2)$$

Если концентрация субстрата намного превышает концентрацию фермента ($[S]_0 \gg [E]_0$), что является обычным условием изучения кинетики ферментативных реакций, выражение для начальной скорости реакции (1) можно записать в виде

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0}. \quad (3)$$

При наличии дополнительных стадий в схеме (1) определяемые из эксперимента константы k_2 и K_s являются эффективными величинами, которые в этом случае называют соответственно «каталитической константой» и «кажущейся константой Михаэлиса» ферментативной реакции:

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]_0}{K_{\text{м(как)}} + [S]_0}. \quad (4)$$

Как видно из сопоставления выражений (3) и (4), наличие дополнительных стадий в схеме ферментативной реакции принципиально не изменяет вид уравнения скорости.

Уравнение (3) или (4) (так называемое уравнение Михаэлиса — Ментен) — основное уравнение кинетики простых ферментативных реакций, иллюстрирующее гиперболическую зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата и линейную — от начальной концентрации фермента.

В отдельных случаях кинетические исследования ферментативных реакций удобно проводить в условиях избытка фермента по сравнению с суб-

стратом (например, при малой растворимости субстрата в воде или при высоком молекулярном весе субстрата). Детальный кинетический анализ подобного рода систем проводится в монографии [2]. Здесь отметим только, что выражение для начальной скорости ферментативной реакции, протекающей в квазиравновесном режиме (см. выше) при условии $[E]_0 \gg [S]_0$, симметрично классическому уравнению Михаэлиса — Ментен относительно концентраций реагентов. Так, при избытке фермента начальная скорость реакции (1) гиперболически зависит от начальной концентрации фермента и линейно — от начальной концентрации субстрата:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s + [E]_0} \quad (5)$$

Рассмотрим случай, когда концентрация субстрата сравнима по величине с концентрацией фермента ($[S]_0 \sim [E]_0$), и выведем уравнение скорости ферментативной реакции, протекающей по двухстадийному механизму (1) при условии быстрого установления равновесия на стадии образования фермент-субстратного комплекса.

Особенностью обработки схемы (1) в случае $[S]_0 \sim [E]_0$ является необходимость использования уравнений материального баланса как по ферменту (уравнение (6)), так и по субстрату (уравнение (7)):

$$[E]_0 = [E] + [ES], \quad (6)$$

$$[S]_0 = [S] + [ES]. \quad (7)$$

Зависимость между начальной скоростью ферментативной реакции и начальными концентрациями субстрата и фермента в этом более сложном случае может быть найдена следующим образом: если обозначить отношение $[ES]/[E]$ через σ , то выражение для константы равновесия (2) можно записать в виде $K_s = [S]/\sigma$; текущая концентрация субстрата отсюда равна $[S] = K_s \sigma$. Для того чтобы выразить квазиравновесную концентрацию фермент-субстратного комплекса через $[E]_0$ и σ , разделим обе части уравнения (6) на $[ES]$:

$$\frac{[E]_0}{[ES]} = 1 + \frac{[E]}{[ES]}.$$

Проведя несложные преобразования, получим

$$[ES] = \frac{\sigma [E]_0}{1 + \sigma}. \quad (8)$$

Подставляя полученные выражения для $[S]$ и $[ES]$ в уравнение материального баланса по субстрату (7) и преобразуя его, найдем

$$\frac{1}{1 + \sigma} = \frac{[S]_0}{\sigma [E]_0} - \frac{K_s}{[E]_0}. \quad (9)$$

Найдем теперь связь между величиной σ и измеряемой на опыте начальной скоростью ферментативной реакции v . Из схемы (1) следует, что $v = k_2 [ES]$. Так как максимальная скорость реакции, определяемая при данной концентрации фермента при условии $[S]_0 \gg K_s$ и $[S]_0 \gg [E]_0$, равна $V = k_2 [E]_0$, то

$$\frac{V}{v} = \frac{[E]_0}{[ES]}. \quad (10)$$

Комбинируя выражения (8) и (10), получим

$$\sigma = \frac{1}{V/v - 1}. \quad (11)$$

Таким образом, каждому значению экспериментально определяемой начальной скорости реакции v соответствует определенное значение σ , т. е. ряд значений σ , соответствующих ряду значений $[S]_0$, может быть вычислен из кинетических данных, если в независимом опыте будет найдено значение максимальной скорости V .

Очевидно, что зависимость (9) в координатах $\left(\frac{1}{1+\sigma}, \frac{[S]_0}{\sigma}\right)$ должна быть прямолинейной, с абсциссой точки пересечения, равной K_s , и тангенсом угла наклона, равным $1/[E]_0$. Таким образом, изучение зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в условиях $[E]_0 \sim [S]_0$ позволяет определять абсолютную концентрацию активных центров фермента. Так как выражения (6)–(11) симметричны относительно концентраций субстрата и фермента, абсолютная концентрация «активных центров» субстрата (т. е. расщепляющихся под действием фермента связей) может быть определена обработкой экспериментальных данных в координатах $\left(\frac{1}{1+\sigma}, \frac{[E]_0}{\sigma}\right)$ при фиксированной концентрации субстрата (см. выражение (12)) и при условии $V = k_2 [S]_0$:

$$\frac{1}{1+\sigma} = \frac{[E]_0}{\sigma [S]_0} - \frac{K_s}{[S]_0}. \quad (12)$$

Если методические условия эксперимента не позволяют провести прямое определение максимальной скорости ферментативной реакции, величину V можно графически определить линеаризацией экспериментальных данных в координатах $(1/v, 1/[S]_0)$ в случае $[S]_0 \gg [E]_0$ или в координатах $(1/v, 1/[E]_0)$ в случае $[E]_0 \gg [S]_0$ (см. выражения (3) и (5)). Наконец в случае соизмеримых по величине концентраций фермента и субстрата ($[E]_0 \sim [S]_0$) можно предложить следующий метод определения максимальной скорости ферментативной реакции. Записывая выражение (11) в виде

$$\sigma = \frac{1}{k_2 [S]_0 / v - 1} \quad (13)$$

и подставляя (13) в уравнение (12), найдем

$$1 - \frac{v}{k_2 [S]_0} = \frac{k_2 [E]_0}{v} - \frac{[E]_0}{[S]_0} - \frac{K_s}{[S]_0}. \quad (14)$$

Записывая систему двух уравнений типа (14) для двух начальных концентраций субстрата $[S]_0$ и $2 [S]_0$

$$\begin{aligned} 1 - \frac{v_1}{k_2 [S]_0} &= \frac{k_2 [E]_0}{v_1} - \frac{[E]_0}{[S]_0} - \frac{K_s}{[S]_0}, \\ 1 - \frac{v_2}{2k_2 [S]_0} &= \frac{k_2 [E]_0}{v_2} - \frac{[E]_0}{2[S]_0} - \frac{K_s}{2[S]_0} \end{aligned}$$

и проводя несложные преобразования, получим

$$\frac{v_2 - v_1}{V} = 1 - k_2 [E]_0 \left(\frac{2}{v_2} - \frac{1}{v_1} \right), \quad (15)$$

где v_1 и v_2 — начальные скорости ферментативных реакций, соответствующие начальным концентрациям субстрата $[S]_0$ и $2 [S]_0$. Варьируя начальную концентрацию фермента и откладывая экспериментальные данные в координатах $\left\{ (v_2 - v_1), [E]_0 \left(\frac{2}{v_2} - \frac{1}{v_1} \right) \right\}$ из отрезков, отсекаемых полученной прямой на оси ординат и на оси абсцисс, находим значения $V = k_2 [S]_0$ и $1/k_2$ соответственно.

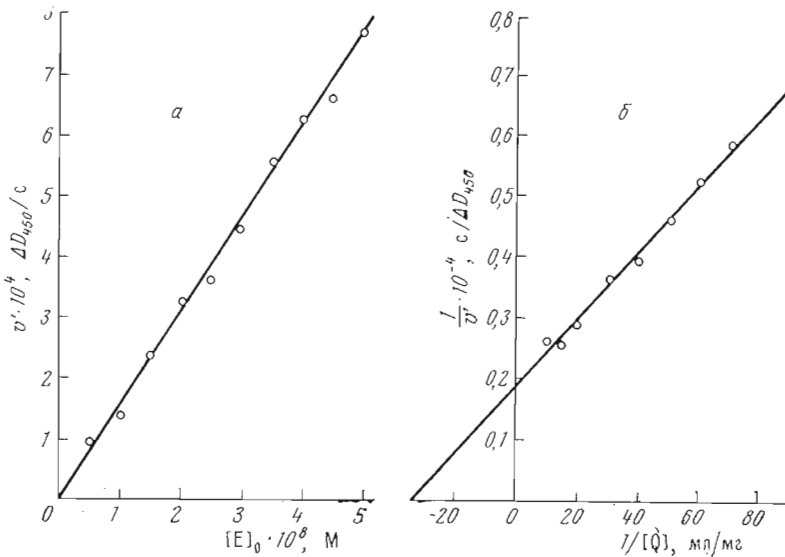


Рис. 1. Зависимость начальной скорости расщепления клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима от начальной концентрации фермента ($[Q] 0,12$ мг/мл) (а) и суспензии клеток ($[E]_0 2 \cdot 10^{-8}$ М) (б)

Кинетика расщепления бактериальных клеток под действием лизоцима. При изучении кинетики расщепления бактериальных клеток под действием лизоцима концентрацию фермента варьировали в стократном интервале ($5 \cdot 10^{-9}$ — $5 \cdot 10^{-7}$ М), а концентрацию суспензии клеток — в интервале 0,01—0,12 мг/мл. Полученные при этом зависимости начальных скоростей лизиса от начальных концентраций фермента и суспензии клеток могут быть подразделены на три характеристических типа:

1) при низкой концентрации фермента и высокой концентрации клеток наблюдается линейная зависимость начальной скорости лизиса от концентрации фермента и гиперболическая зависимость от весовой концентрации клеток $[Q]$ (рис. 1). Другими словами, в данной концентрационной области кинетика лизиса подчиняется уравнению, сходному с уравнением Михаэлиса — Ментен, которое описывает скорость ферментативной реакции при условии $[S]_0 \gg [E]_0$;

2) при дальнейшем увеличении концентрации лизоцима зависимость начальной скорости лизиса от концентраций фермента и суспензии клеток перестает соответствовать простым закономерностям, наблюдаемым при небольших концентрациях фермента. Так, в области концентраций лизоцима $2 \cdot 10^{-8}$ — $2 \cdot 10^{-7}$ М и средних (в исследуемом интервале) концентраций суспензии бактерий начальная скорость лизиса не является прямо пропорциональной концентрации фермента (см. таблицу);

Зависимость начальных скоростей расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима от начальных концентраций фермента и субстрата

$[E]_0 \cdot 10^8, \text{ М}$	$v \cdot 10^4, \Delta D_{460}/c$		$[E]_0 \cdot 10^8, \text{ М}$	$v \cdot 10^4, \Delta D_{460}/c$	
	$[Q] 0,027 \text{ мг/мл}$	$[Q] 0,054 \text{ мг/мл}$		$[Q] 0,027 \text{ мг/мл}$	$[Q] 0,054 \text{ мг/мл}$
2,15	2,9	4,1	17,2	10,0	19,0
4,3	5,1	7,8	34,4	12,0	23,8
8,6	7,9	13,0	50,0	12,6	25,2

3) при концентрациях лизоцима, превышающих $2 \cdot 10^{-7}$ М, скорость лизиса клеток прямо пропорциональна концентрации бактериальной суспензии и почти не зависит от концентрации фермента (см. таблицу).

Можно полагать, что скорость лизиса бактериальных клеток (v') пропорциональна скорости ферментативной реакции (v) лизоцима с чувствительными к его действию химическими связями на поверхности бактерий (концентрация которых равна $[S]_0$). Тогда описанные выше закономерности изменения скорости лизиса с изменением концентрации фермента и бактериальной суспензии легко объяснить тем, что ферментативная реакция в указанных выше диапазонах концентраций $[E]_0$ и $[Q]$ может проходить в трех режимах: $[E]_0 \ll [S]_0$, $[E]_0 \sim [S]_0$, $[E]_0 \gg [S]_0$. (Соотношение $[E]_0$ и $[S]_0$ не может быть установлено a priori, поскольку истинная концентрация субстрата $[S]_0$ — число чувствительных к действию лизоцима химических связей в единице объема системы — неизвестна, а известна лишь пропорциональная ей величина — весовая концентрация суспензии клеток, $[Q]$.) Так как в этих случаях скорость ферментативной реакции описывается выражениями (3), (5) и (9)—(12) (см. теоретическую часть), подобные выражения должны быть справедливы и для скорости лизиса.

Для проверки этого предположения экспериментально полученные значения скоростей лизиса v' , соответствующие начальным концентрациям $[E]_0$ в интервале $2,15 \cdot 10^{-8} - 3,44 \cdot 10^{-7}$ М, обрабатывались в координатах $\left(\frac{1}{1+\sigma}, \frac{[E]_0}{\sigma} \right)$, где $\sigma = \frac{1}{V'/v' - 1}$ (см. выражение (12)), а V' — максимальная скорость лизиса при данной весовой концентрации клеток $[Q]$. Значение максимальной скорости лизиса определялось аналогично V' для ферментативной реакции с использованием выражения (15), где v_1' и v_2' — начальные скорости лизиса, соответствующие начальным концентрациям суспензии клеток $[Q]$ и $2 [Q]$, равным 0,027 и 0,054 мг/мл (рис. 2).

Линейный вид графиков в координатах $\left(\frac{1}{1+\sigma}, \frac{[E]_0}{\sigma} \right)$ (рис. 3) свидетельствует о том, что экспериментальные данные действительно могут быть описаны выражениями, выведенными для скорости ферментативной реакции при соизмеримых начальных концентрациях фермента и субстрата. Этот вывод подтверждается также тем фактом, что обе прямые, полученные при различных начальных концентрациях суспензии, пересекаются в одной точке на оси абсцисс. Согласно теории (см. выше), эта точка соответствует значению константы Михаэлиса для данного процесса. Наконец, значения тангенсов углов наклона обеих прямых на рис. 3 также различаются в 2 раза, как и следует из теории для случая $[E]_0 \sim [S]_0$ при концентрациях субстрата, различающихся в 2 раза.

Из рис. 3 можно найти, что величина кажущейся константы Михаэлиса реакции расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*, катализируемой лизоцимом, равна $4,2 \cdot 10^{-8}$ М, а значения концентрации субстрата $[S]_0$ в данном процессе, найденные в соответствии с формулой (12) как величины, обратные тангенсу угла наклона соответствующих прямых на рис. 3, составляют $4,3 \cdot 10^{-8}$ и $8,6 \cdot 10^{-8}$ М. Концентрация суспензии клеток в этих случаях была 0,027 и 0,054 мг/мл соответственно; следовательно, на 1 г клеток приходится $1,6 \cdot 10^{-6}$ моль субстрата. С помощью этой величины можно рассчитать, что значение кажущейся константы Михаэлиса, найденное в условиях $[S]_0 \gg [E]_0$ и равное $2,8 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, соответствует $4,5 \cdot 10^{-8}$ М. Определенная таким образом величина находится в хорошем соответствии с величиной $K_{m(\text{нак})} = 4,2 \cdot 10^{-8}$ М, найденной в условиях $[E]_0 \sim [S]_0$. Это также свидетельствует в пользу того, что при выбранных соотношениях $[E]_0$ и $[Q]$ кинетика процесса расщепления бактерий под действием лизоцима может быть описана с помощью выраже-

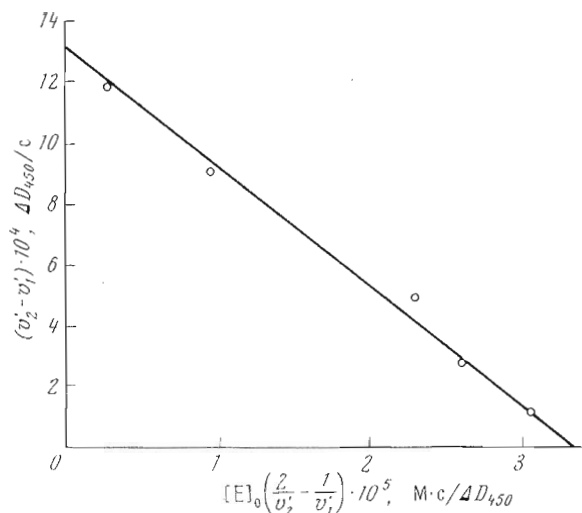


Рис. 2. Определение максимальной скорости расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима в условиях, соответствующих случаю $[E]_0 \sim [S]_0$ (см. текст). Концентрация бактериальной суспензии $[Q]$ 0,027 и 0,054 мг/мл, $[E]_0$ $2,15 \cdot 10^{-8}$ — $3,44 \cdot 10^{-7}$ М

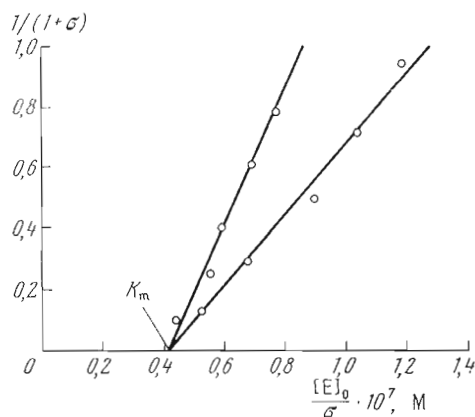


Рис. 3. Определение абсолютной концентрации субстрата и кажущейся константы Михаэлиса в реакции расщепления клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима в условиях $[E]_0 \sim [S]_0$. $[E]_0$ $2,15 \cdot 10^{-8}$ — $3,44 \cdot 10^{-7}$ М, концентрация бактериальной суспензии $[Q]$ 0,027 (а) и 0,054 мг/мл (б)

ний, выведенных для скорости ферментативной реакции, протекающей по схеме Михаэлиса (1).

Согласно уравнению (15), точка пересечения прямой на рис. 2 с осью абсцисс соответствует $1/k_{\text{кат (каж)}}$ данного процесса. Так как 1 г бактериальных клеток соответствует $1,6 \cdot 10^{-6}$ моль субстрата (см. выше), значение $k_{\text{кат (каж)}}$ ферментативного расщепления клеток *Micrococcus lysodeikticus* равно $9,5 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

Итак, формально-кинетическое описание бактериолитического действия лизоцима может быть проведено с помощью разработанного в настоящей статье общего подхода, позволяющего анализировать кинетику ферментативных реакций в условиях сравнимости начальных концентраций субстрата и фермента. Физический смысл константы Михаэлиса и каталитической константы ферментативного действия лизоцима в рассма-

триваемой гетерогенной системе, определенных с помощью данного метода, а также возможный механизм ферментативного бактериолиза, приводящий к описанным выше закономерностям, рассматриваются в сообщении [4].

Экспериментальная часть

Лизоцим белка куриных яиц (кристаллический препарат) — продукт фирмы «Reanal» (Венгрия). Концентрации запасных растворов фермента (в 0,1 М уксусной кислоте, рН 3) определяли по навеске, принимая молекулярный вес лизоцима равным 14 600 [3].

Бактериальная культура *Micrococcus lysodeikticus* была выращена в отделе эволюционной биохимии Межфакультетской лаборатории биоорганической химии МГУ по методике работы [5]. Бактериальные клетки были промыты дистиллированной водой и лиофилизированы. Суспензию бактериальных клеток в буферном растворе приготавливали непосредственно перед кинетическим экспериментом.

Кинетику ферментативного расщепления бактериальных клеток изучали с использованием регистрирующего спектрофотометра SP-1800 («Pye Unicam») при длине волны 450 нм. В опытах использовали кварцевые кюветы фирмы «Pye Unicam» толщиной 1 см и объемом 3 мл. Во всех случаях определения оптической плотности растворов в кювете сравнения находился соответствующий буферный раствор.

Пропорциональность между концентрацией суспензии бактериальных клеток в буферном растворе (рН 5,0) и оптической плотностью системы (при длине волны 450 нм) соблюдается в интервале 0,01—0,15 мг бактериальных клеток/мл. В этом интервале выполняется соотношение

$$[Q], \text{мг/мл} = 0,2 D_{450}. \quad (16)$$

При концентрации суспензии бактериальных клеток, превышающей 0,15 мг/мл, наблюдается заметное отклонение от соотношения (16).

Кинетические эксперименты проводили в 0,01 М ацетатном буфере, рН 5,0. Ионную силу буферного раствора доводили хлористым калием до 0,04.

Типичный кинетический эксперимент состоял в следующем: суспензию бактериальных клеток в буферном растворе объемом 2,85 мл выдерживали в течение 3—5 мин при 25° в термостатируемой кювете спектрофотометра. Затем в кювету вводили 0,15 мл запасного раствора лизоцима и содержимое кюветы перемешивали в течение 5—7 с. Регистрацию оптической плотности реакционной системы проводили на шкале спектрофотометра в диапазоне 0 — 0,2 или 0 — 0,5 ед. опт. плотности. Во всех случаях кинетические эксперименты повторяли трижды.

При изучении кинетики расщепления бактериальных клеток, катализируемого лизоцимом, падение мутности суспензии под действием фермента не превышало 10—20%. Начальную скорость лизиса находили как тангенс угла наклона касательной к кинетической кривой в начальный период времени и выражали как изменение поглощения (D_{450}) за секунду.

Во всех кинетических экспериментах проводили предварительное испытание на спонтанное (неферментативное) уменьшение оптической плотности бактериальной суспензии. Было найдено, что во всех случаях за время, равное проведению кинетических исследований, уменьшение оптической плотности суспензии в отсутствие лизоцима было пренебрежимо малым.

Авторы выражают благодарность сотруднику отдела эволюционной биохимии МГУ А. В. Троицкому, любезно предоставившему бактериальную культуру *Micrococcus lysodeikticus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Strominger J. L., Ghuysen J.-M. (1967) *Science*, **156**, 213—221.
2. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, с. 116, Изд. МГУ.
3. Sophianopoulos A. J. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3188—3193.
4. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 689—699.
5. Perkins H. R., Rogers H. J. (1959) *Biochem. J.*, **72**, 647—654.

Поступила в редакцию
5.IX.1975

KINETICS OF ENZYMATIC REACTIONS IN HETEROGENEOUS SYSTEMS. I. THE KINETIC REGULARITIES FOR THE BACTERIAL CELL *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS* DIGESTION BY LYSOZYME

BEREZIN I. V., KLYOSOV A. A., RABINOWITCH M. L.

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

A general theoretical approach for the studying of enzymatic reactions at the commensurable enzyme and substrate concentrations has been developed. Particularly, this method could be applicable for the study of the enzyme reactions with a non-soluble substrate, where the substrate concentration cannot be determined a priori. As an example of the given approach, the kinetics of the lysozyme action on the bacterial cells *Micrococcus lysodeikticus* have been investigated and the values $k_{\text{cat(app)}} = 9.5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $K_{\text{m(app)}} = 4.2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ determined.
