



УДК 557.154.36.02 + 541.128.13

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ
В ГЕТЕРОГЕННЫХ СИСТЕМАХII. БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИЗОЦИМА НА КЛЕТКИ
*MICROCOCCLUS LYSODEIKTICUS**

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

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

Проведено теоретическое рассмотрение кинетики действия ферментов бактериолизитического типа. Обсуждаются кинетические следствия ферментативного лизиса бактериальных клеток при низкой и высокой поверхностной концентрации реакционноспособных связей нерастворимого субстрата. Рассматривается физический смысл эффективных кинетических параметров реакции ферментативного лизиса на примере расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима белка куриных яиц.

В предыдущей работе [1] нами были найдены формально-кинетические закономерности расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима. Было показано, что скорость лизиса в области малых концентраций фермента может быть описана уравнением, сходным по форме с уравнением Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]_0}{K_{\text{m(каж)}} + [S]_0}$$

и охарактеризована кажущейся константой Михаэлиса, $K_{\text{m(каж)}}$ и эффективной каталитической константой $k_{\text{кат}}$ процесса лизиса. В области относительно высоких концентраций фермента скорость лизиса хорошо описывается с помощью уравнения, выведенного в работе [1] для скорости ферментативной реакции при условии сравнимости начальных концентраций фермента и субстрата.

В настоящей статье предпринята попытка рассмотреть некоторые возможные механизмы лизиса бактериальных клеток, которые могут привести к подобным формально-кинетическим закономерностям, и на основе этих механизмов дать интерпретацию полученных результатов.

Для выяснения физического смысла кинетических кривых уменьшения мутности суспензии бактериальных клеток в процессе ферментативного расщепления их оболочек нами было проведено изучение средних размеров частиц суспензии в ходе лизиса. Для этого определялся спектр мутности суспензии бактериальных клеток в интервале длин волн 400—650 нм в отсутствие лизоцима, а также в ходе лизиса на глубинах от 15

* Сообщение I см. [1].

Значения показателя x в формуле Рэлея для бактериальных суспензий в отсутствие лизоцима (1—3) и для различной глубины ферментативного лизиса бактериальных клеток (4—7)

Номер опыта	Условия опыта	x
1	Концентрация суспензии, мг/мл	1,38
2		1,40
3		1,30
4	Глубина превращения, %	1,36
5		1,45
6		1,50
7		1,40

Средняя величина $x = 1,4 \pm 0,1$

до 82% превращения (таблица). Линеаризация полученных данных проводилась на основании закона Рэлея

$$R = B \frac{cV^2}{\lambda^x},$$

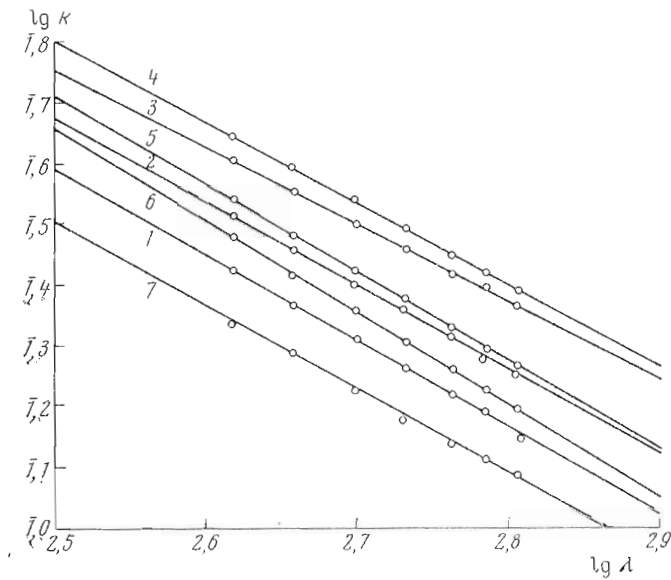
где R — светорассеяние, c — частичная концентрация, V — средний объем частицы, λ — длина волны, B — коэффициент. Из рисунка видно, что рассеяние света суспензией бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* как в отсутствие фермента, так и в ходе лизиса подчиняется закону Рэлея. Из данных таблицы следует, что показатель x в формуле Рэлея и, следовательно, средний размер частиц суспензии бактериальных клеток практически не изменяется в ходе лизиса и равен размеру частиц в отсутствие фермента. Средний радиус частиц суспензии бактериальных клеток, соответствующий найденному значению показателя $x = 1,4 \pm 0,1$ (таблица), был определен с использованием соответствующей калибровочной кривой [2] и оказался равным $8000 \pm 1000 \text{ \AA}$. Эта величина согласуется с размерами бактериальных клеток [3, 4], и ее можно приписать размеру отдельных бактерий, а не их частей или ассоциатов. Вывод о том, что размеры частиц не изменяются в ходе ферментативного лизиса, означает, что образующиеся фрагменты клеток достаточно малы и не вносят вклада в величину мутности реакционной смеси в условиях эксперимента. Таким образом, кинетические кривые уменьшения оптической плотности бактериальной суспензии под действием лизоцима, полученные в настоящей работе, характеризуют падение концентрации целых бактериальных клеток в результате их распада.

Теоретическая часть. Если весовую концентрацию суспензии клеток (выраженную, например, в мг/мл) обозначить через $[Q]$ а скорость лизиса через v' , то эта скорость будет определяться выражением

$$v', \text{ мг/мл} \cdot \text{с} = - \frac{d [Q]}{d t}.$$

Можно полагать, что клетка самопроизвольно разрушается, как только под действием фермента прочность ее оболочки упадет ниже критической (из-за расщепления определенного количества химических связей); в этом случае распад клеток происходит по закону первого порядка, $v' = k [Q]$. Естественно, константа скорости лизиса k будет зависеть от эффективности ферментативного действия на клетку, в свою очередь определяемого элементарными кинетическими параметрами ферментативной реакции.

Если обозначить скорость расщепления химических связей i -й клетки через v_i и предположить, что клетка распадается тогда, когда число рас-



Определение размера частиц суспензии бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* в отсутствие лизоцима (1—3), а также в ходе ферментативного лизиса на разных глубинах превращения (4—7). Условия опытов 1—7 см. таблицу

щепленных связей ее оболочки превысит некоторое критическое значение m , то наблюдаемая на опыте величина скорости лизиса равна

$$v' = \frac{v_i}{m} [Q].$$

Предположим, что расщепление химической связи оболочки любой из клеток в системе — равновероятное событие. Тогда, если обозначить через [C] число бактериальных клеток в единице объема, скорость расщепления связей на i -й клетке v_i в [C] раз меньше общей скорости ферментативной реакции v . Весовая ([Q]) и частичная ([C]) концентрации суспензии связаны между собой соотношением $[Q] = q [C]$, где q — вес одной бактериальной клетки. Таким образом, в итоге получаем

$$v' = \frac{v}{m} q. \quad (1)$$

Формула (1) обосновывает сделанное нами в работе [1] предположение о наличии прямой пропорциональности между экспериментально определяемой скоростью распада клеток v' и скоростью ферментативного расщепления химических связей в системе v .

Можно предложить несколько схем взаимодействия фермента с нерастворимым субстратом. Наиболее простыми из них являются две: в первой скорость ферментативной реакции определяется соотношением между концентрациями фермента и реакционноспособных связей нерастворимого субстрата (схема а), во второй — степенью заполнения поверхности субстрата адсорбированным ферментом (схема б). Рассмотрим кинетические следствия этих схем.

а) *Поверхностная концентрация реакционноспособных связей нерастворимого субстрата мала.* В том случае, когда величина поверхности клетки, приходящаяся на одну реакционноспособную связь, существенно больше величины поверхности, занимаемой одной молекулой фермента при степенях заполнения, близких к единице, кинетическое насыщение субстрата ферментом может наступить уже при малых степенях заполнения по-

верхности. При этом фермент, находящийся в растворе, быстро диффундирует к поверхности субстрата и образует фермент-субстратный комплекс с участком, содержащим химическую связь, способную расщепляться под действием данного фермента. После прохождения реакции фермент быстро диффундирует обратно в раствор и может далее атаковать другой участок поверхности субстрата, содержащий реакционноспособную связь. В этом случае скорость ферментативной реакции будет пропорциональна концентрации фермент-субстратного комплекса, и при малых концентрациях фермента по сравнению с начальной концентрацией реакционноспособных связей субстрата ($[E]_0 \ll [S]_0$) будет иметь место обычная (задаваемая уравнением Михаэлиса — Ментен) зависимость начальной скорости ферментативной реакции от начальных концентраций фермента и субстрата. Однако для реакций нерастворимого субстрата в отличие от растворимого обычно не представляется возможным заранее определить начальную его концентрацию. Можно лишь утверждать, что эффективная концентрация нерастворимого субстрата равна поверхностной концентрации реакционноспособных связей, умноженной на величину поверхности субстрата в единице объема системы. Поверхностная концентрация связей в данном случае есть величина, зависящая только от плотности упаковки полимерных фрагментов, содержащих данную связь, на поверхности субстрата. Величина поверхности в единице объема определяется степенью дисперсности субстрата и его весовой концентрацией. Поскольку для бактериальных клеток поверхностная концентрация связей, чувствительных к действию лизоцима, и степень дисперсности — величины постоянные в начальный период ферментативной реакции, начальная концентрация субстрата определяется только весовой концентрацией клеток $[Q]$.

Концентрация субстрата $[S]_0$ будет равна $n [C]$, где n — число химических связей на поверхности одной клетки, способных расщепляться лизоцимом, и при условии $n [C] \gg [E]_0$ скорость ферментативной реакции в системе может быть записана в виде

$$v = \frac{k_2 [E]_0 n [C]}{K_s + n [C]}, \quad (2)$$

где K_s — константа диссоциации элементарного комплекса фермент — клетка, k_2 — константа скорости расщепления элементарной химической связи в фермент-субстратном комплексе. Комбинируя уравнение (2) и уравнение (1), определяющее связь между скоростью распада клеток и скоростью ферментативного гидролиза связей в системе, и учитывая, что $[Q] = q [C]$, найдем

$$v' = \frac{q \frac{k_2}{m} [E]_0 [Q]}{q \frac{K_s}{n} + [Q]}. \quad (3)$$

Выражение (3) связывает скорость физического процесса — растворения бактериальных клеток — с параметрами элементарного ферментативного процесса (k_2 и K_s) и напоминает по форме уравнение Михаэлиса — Ментен. Обработка этого выражения в координатах ($1/v'$, $1/[Q]$), соответствующих координатам Лайнуивера — Берка, позволяет определить значения эффективных параметров процесса распада клеток — константы Михаэлиса

$$K_m = qK_s/n \quad (4)$$

и максимальной скорости процесса

$$V' = qk_2 [E]_0/m. \quad (5)$$

Величина эффективной константы скорости второго порядка $V'/K_m [E]_0$ равна $\frac{n}{m} \cdot \frac{k_2}{K_s}$ и превосходит величину k_2/K_s в постоянное число раз (так как общее число связей, доступных действию фермента на одной клетке (n), больше критического числа связей (m), разрыв которых приводит к распаду клетки).

Рассматривая аналогичным образом случай избытка фермента в растворе по отношению к субстрату, $[E]_0 \gg n [C]$, получим для скорости лизиса выражение

$$v' = \frac{k_2 \frac{n}{m} [E]_0 [Q]}{K_s + [E]_0}, \quad (6)$$

вид которого аналогичен выражению для скорости ферментативной реакции в растворе при условии $[E]_0 \gg [S]_0$ (см. работу [4]). В этом случае выражение для максимальной скорости процесса лизиса можно записать в виде

$$V' = k_2 n [Q] / m. \quad (7)$$

Как видно из выражения (6), распад клеток в данном случае характеризуется первым порядком относительно весовой концентрации бактериальной суспензии $[Q]$.

Наконец, анализируя случай для сравнимых начальных концентраций фермента и субстрата, $[E]_0 \approx n [C]$, можно записывать выражение, в неявном виде определяющее скорость ферментативного процесса (см. [4]):

$$\frac{1}{1 + \sigma} = \frac{[E]_0}{\sigma n [C]} - \frac{K_s}{n [C]}, \quad (8)$$

где

$$\sigma = \frac{1}{V/v - 1} \quad (9)$$

и

$$V = k_2 n [C]. \quad (10)$$

Используя выражения (1), (7) и (10), можно показать, что величина V/v , характеризующая отношение максимальной и текущей скоростей гидролиза реакционноспособных химических связей субстрата, равна отношению соответствующих скоростей лизиса V'/v' , получаемых из кинетического эксперимента. Следовательно, выражение (9) можно записать в виде

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

Заменяя в выражении (8) частичную концентрацию $[C]$ через весовую по формуле $[C] = [Q]/q$, найдем

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

Можно также показать, что аналогично максимальной скорости ферментативной реакции (см. [4]) максимальная скорость процесса лизиса, определяемая выражением (7), может быть найдена с помощью уравнения

$$\frac{v_2' - v_1'}{V'} = 1 - \frac{q}{m} k_2 [E]_0 \left(\frac{2}{v_2'} - \frac{1}{v_1'} \right) \quad (13)$$

(v_1' и v_2' — начальные скорости лизиса при весовых концентрациях бактериальных клеток $[Q]$ и $2 [Q]$ соответственно) как отрезок, отсекаемый на оси ординат прямой в координатах $\{(v_2' - v_1'); [E]_0 (2/v_2' - 1/v_1')\}$.

Таким образом, рассчитывая значения σ из начальных скоростей лизиса v' с помощью выражения (11) при фиксированной весовой концентрации суспензии клеток $[Q]$ и переменных концентрациях фермента $[E]_0$ и откладывая полученные значения согласно уравнению (12) в координатах $(1/v_1 + \sigma, [E]_0/\sigma)$, из пересечения с осью абсцисс можно найти значение константы диссоциации комплекса фермента с нерастворимым субстратом K_s . Тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс будет равен $1/[S]_0$ или обратно пропорционален молярной концентрации химических связей, способных к расщеплению ферментом в процессе лизиса. Из этой величины, равной $q/n [Q]$ (см. уравнение (12)), можно рассчитать отношение n/q , или число реакционноспособных связей, приходящихся на единицу веса бактериальных клеток. Наконец, зная вес одной клетки q и размеры ее поверхности, можно рассчитать число реакционноспособных связей, приходящихся на одну клетку, и их поверхностную концентрацию.

В отличие от K_s величину k_2 ферментативной реакции нельзя определить непосредственно из изучения кинетики распада клеток, но с помощью уравнения (5) и (13) может быть рассчитана пропорциональная ей величина qk_2/m .

Таким образом, изучение кинетики ферментативного лизиса бактериальных клеток может дать ценную информацию как о свойствах активного центра фермента, так и о структуре нерастворимого субстрата.

б) Концентрация реакционноспособных связей на поверхности субстрата велика. В том случае, когда поверхность, приходящаяся на одну реакционноспособную связь, существенно меньше поверхности, занимаемой одной молекулой фермента при высоких степенях заполнения, причиной кинетического насыщения ферментативной реакции (и достижения максимальной скорости реакции) может служить достижение высокой степени заполнения поверхности субстрата адсорбированным ферментом. Хорошо известно, что лизоцим способен образовывать прочные адсорбционные комплексы с нерастворимыми субстратами типа хитина и бактериальных клеточных стенок [5—8]. Решающее значение адсорбции фермента для расщепления нерастворимого субстрата подчеркивалось в ряде работ [9—14]. Изучение адсорбции ферментов из раствора на поверхность твердой фазы показало, что в зависимости от характера поверхности и условий эксперимента адсорбция может быть как обратимой, так и необратимой [15], а изотермы адсорбции могут иметь как простую форму типа изотерм Лэнгмюра [10, 12, 16] или Фрейндлиха [9, 11], так и более сложную форму S-образного типа [15], свидетельствующую о наличии сильного межбелкового взаимодействия в адсорбционном слое. Скорость достижения адсорбционного равновесия также может существенно колебаться — от нескольких десятков секунд [12] до нескольких часов [15, 16].

Мы будем анализировать наиболее простой случай (аналогичный описанному в работе [12]), когда в растворе, содержащем лизоцим, в присутствии суспензии бактериальных клеток быстро устанавливается адсорбционное равновесие согласно изотерме Лэнгмюра. Скорость ферментативной реакции на поверхности клеток будем считать пропорциональной объемной концентрации адсорбированного фермента ($[E_a]$), как это предполагалось в ряде работ [9, 10, 12]:

$$v = k [E_a], \quad (14)$$

где k — константа, зависящая от кинетических параметров ферментативной реакции.

В принципе увеличение степени заполнения поверхности субстрата адсорбированным ферментом может приводить к изменению каталитической активности фермента в адсорбированном состоянии и тем самым к отклонению от соотношения (14) вследствие образования белковых ассоциатов, имеющих иные каталитические свойства, чем отдельные молекулы фермента [17, 18]. Однако для ряда ферментов допустимо использование соотно-

шения (14) при любых степенях заполнения поверхности адсорбента [12, 17, 18], что, по-видимому, объясняется незначительным влиянием ассоциации в поверхностном слое на их каталитические свойства.

Введем следующие обозначения: Θ — степень заполнения поверхности клеток адсорбированным ферментом; a — площадь поверхности бактериальной клетки; b — площадь, занимаемая на поверхности клетки одной молекулой фермента; $K_{\text{адс}}$ — константа адсорбционного равновесия; $[E]$ — равновесная концентрация фермента в растворе.

Уравнение изотермы адсорбции Лэнгмюра запишется в виде

$$\Theta = \frac{K_{\text{адс}} [E]}{1 + K_{\text{адс}} [E]}, \quad (15)$$

где, согласно определению, $\Theta = b [E_a]/a [C]$ и

$$[E_a] = \frac{a}{b} [C] \Theta.$$

Из выражения (14) следует, что общая скорость ферментативной реакции, выраженная через Θ , равна

$$v = k \frac{a}{b} [C] \Theta. \quad (16)$$

Наконец, из уравнения (1) следует, что скорость лизиса в этом случае определяется выражением

$$v' = \frac{k}{m} \cdot \frac{a}{b} \Theta [Q]. \quad (17)$$

При малых степенях заполнения поверхности субстрата ферментом ($\Theta = K_{\text{адс}} [E] \ll 1$), учитывая материальный баланс по ферменту, выражение (17) можно преобразовать к виду

$$v' = \frac{q \frac{k}{m} [E]_0 [Q]}{q \frac{a}{K_{\text{адс}}} + [Q]}, \quad (18)$$

сходному с выражением (3). В области высоких концентраций фермента, при которых выполняется соотношение $K_{\text{адс}} [E] \gg 1$, степень заполнения поверхности субстрата ферментом, согласно уравнению (15), приближается к единице (практически вся поверхность клеток занята адсорбированным ферментом). Скорость лизиса достигает при этом своего максимального для данной концентрации клеток значения}

$$V' = \frac{k}{m} \cdot \frac{a}{b} [Q] \quad (19)$$

и перестает зависеть от величины начальной концентрации фермента. Из выражений (16) и (19), в частности, следует, что при постоянной весовой концентрации суспензии $[Q]$ для любых степеней заполнения поверхности субстрата ферментом соблюдается соотношение

$$\frac{V'}{v'} = \frac{1}{\Theta}. \quad (20)$$

Рассмотрим теперь наиболее общий случай, когда площадь заполненной ферментом поверхности клеток и площадь свободной поверхности соизмеримы и степень заполнения поверхности описывается уравнением (15).

Из этого уравнения следует, что

$$[E] = \frac{\Theta}{(1 - \Theta) K_{\text{адс}}}.$$

Выражая далее в уравнении материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + [E_a]$$

$[E]$ и $[E_a]$ через степень заполнения (см. выше), получим

$$[E]_0 = \frac{\Theta}{(1 - \Theta) K_{\text{адс}}} + \frac{a}{b} \Theta [C]. \quad (21)$$

Введя обозначение

$$\sigma = \frac{\Theta}{1 - \Theta},$$

характеризующее отношение площади занятой ферментом поверхности к площади свободной, получим

$$\Theta = \frac{\sigma}{1 + \sigma}. \quad (22)$$

Подставляя выражение (22) в уравнение (21), найдем

$$[E]_0 = \frac{\sigma}{K_{\text{адс}}} + \frac{a}{b} \frac{\sigma}{1 + \sigma} [C].$$

Полученное выражение нетрудно преобразовать к виду

$$\frac{1}{1 + \sigma} = \frac{[E]_0 b}{\sigma [C] a} - \frac{b}{K_{\text{адс}} [C] a}.$$

Заменяя в последнем выражении частичную концентрацию через весовую, согласно уравнению $[C] = [Q]/q$, получим окончательно

$$\frac{1}{1 + \sigma} = \frac{[E]_0 b q}{\sigma [Q] a} - \frac{b q}{K_{\text{адс}} [Q] a}. \quad (23)$$

С другой стороны, комбинируя выражения (20) и (22), найдем, что

$$\sigma = \frac{1}{V'/v' - 1}.$$

Выражение (23), определяющее функциональную связь между скоростью лизиса и начальной концентрацией фермента, идентично ранее выведенному выражению (12) и отличается от него только смыслом определяемых величин — эффективных параметров процесса лизиса $K_m(\text{как})$ и $k_{\text{кат}}$, а также начальной концентрации субстрата $[S]_0$. В данном случае в качестве кажущейся константы Михаэлиса выступает величина $1/K_{\text{адс}}$, соответствующая обратной константе адсорбции лизоцима на клеточной оболочке, а в качестве концентрации субстрата определяется концентрация фермента, способная разместиться на поверхности бактериальной суспензии данной весовой концентрации при степени заполнения, равной единице.

Таким образом, из проведенного выше теоретического рассмотрения следует, что наблюдаемые на опыте кинетические закономерности ферментативного лизиса бактериальных клеток (см. работу [1]) могут быть формально интерпретированы в рамках по меньшей мере двух подходов: а) принимая, что поверхностная концентрация реакционноспособных связей низка и является причиной кинетического насыщения при высоких концентрациях фермента; б) принимая, что поверхностная концентрация реакцион-

носпособных связей клеточной оболочки высока и кинетическое насыщение при увеличении концентрации фермента наступает вследствие заполнения поверхности субстрата адсорбированным ферментом. Основное различие этих подходов состоит в том, что если имеет место схема *a*, то обработка экспериментальных данных с помощью подходов, развитых в работе [1], позволяет определить константу взаимодействия лизоцима с участком поверхности субстрата, содержащим одну реакционноспособную связь (K_s), и число реакционноспособных связей на поверхности одной бактериальной клетки (n). В случае реализации схемы *b* подобным образом определяется величина $1/K_{\text{адс}}$, характеризующая средство лизоцима не к одной реакционноспособной связи, а к поверхности вообще, а также величина $\frac{a}{b}$, соответствующая числу молекул фермента, способных разместиться на поверхности одной бактериальной клетки при степени заполнения, равной единице.

В реакции лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*, катализируемой лизоцимом белка куриных яиц, были найдены следующие значения: $K_{\text{м(каж)}} = 4,2 \cdot 10^{-8}$ М и $k_{\text{кат}} = 9,5 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹ (рН 5,0; 25°, ионная сила 0,04) [1]. Выше отмечалось, что, согласно схеме *a*, величина $K_{\text{м(каж)}}$ соответствует K_s ферментативной реакции лизоцима с реакционноспособной химической связью клеточной оболочки. Нетрудно также показать, что найденное в работе [1] значение $k_{\text{кат}}$ связано с величиной k_2 ферментативной реакции выражением

$$k_{\text{кат}} = \frac{n}{m} k_2. \quad (24)$$

Сравнивая эти значения с величинами константы Михаэлиса и каталитической константы, найденными в работе [19] при изучении ферментативного гидролиза специфического низкомолекулярного субстрата лизоцима, N-гексаацетилхитогексаозы ($9 \cdot 10^{-6}$ М и $0,15$ с⁻¹ соответственно), можно видеть, что величина K_s для клеточной стенки более чем на два порядка, а k_2 не менее чем в 15 раз ниже, чем для N-гексаацетилхитогексаозы (так как отношение $\frac{n}{m} \geq 1$ и $k_{\text{кат}} \geq k_2$, см. выражение (24)). Однако если сравнить величину $k_2/K_s = 1,7 \cdot 10^4$ М⁻¹с⁻¹ для низкомолекулярного субстрата и $\frac{n}{m} \frac{k_2}{K_s} = 2,3 \cdot 10^5$ М⁻¹с⁻¹ для бактериальной клеточной стенки и предположить, что $\frac{n}{m} = 10-15$ (т. е. принять, что для разрушения клетки необходимо расщепить 6—10% всех доступных для фермента реакционноспособных связей оболочки), то можно получить близкие значения констант. Параллельное снижение K_s и k_2 для реакции гидролиза связи на поверхности бактериальной клетки по сравнению с низкомолекулярным субстратом можно объяснить высокой степенью непродуктивного связывания лизоцима с нерастворимым субстратом [20].

С другой стороны, полученная в работе [1] величина $K_{\text{м(каж)}}$ согласуется, по-видимому, с константами адсорбции белков на твердых поверхностях. Так, в работе [12] найдено, что адсорбция липазы на силиконизированном стекле характеризуется значением $1/K_{\text{адс}} = 0,9 \cdot 10^{-8}$ М.

В предыдущей работе нами было найдено, что 1 г клеточного вещества соответствует $1,6 \cdot 10^{-6}$ моль субстрата ферментативной реакции [1]. По данным Сэлтона [21], на полисахаридный скелет клеточной стенки приходится около 5% сухого веса бактериальной клетки. Принимая молекулярный вес фрагмента полисахарида N-ацетилмурамовая кислота-N-ацетилглюкозамин, содержащего одну реакционноспособную по отношению к лизоциму β-1,4-гликозидную связь, равным приблизительно 500, можно рассчитать, что 1 г клеточного вещества содержит около 10^{-4} моль β-1,4-гликозидных связей. Если найденное нами значение $1,6 \cdot 10^{-6}$ моль/г действи-

тельно представляет собой количество реакционноспособных по отношению к лизоциму связей в процессе лизиса, то такое расхождение свидетельствует о том, что в процессе лизиса лишь около 1,5% всех β -1,4-гликозидных связей могут в принципе расщепляться лизоцимом, либо вследствие своей доступности, либо из-за определенной избирательности действия лизоцима.

Развитые в настоящей работе представления позволяют вычислить из данных работы [1] число реакционноспособных связей, приходящихся на одну бактериальную клетку (согласно схеме *a*), или число молекул фермента, способных разместиться на поверхности клетки при степени заполнения, равной единице (схема *б*). Согласно данным [4], клетки *Micrococcus lysodeikticus* имеют сферическую форму. Наши измерения показали, что среднее значение радиуса данной клетки равно $0,8 \cdot 10^{-4}$ см (см. выше) и, следовательно, объем одной клетки равен $2,15 \cdot 10^{-12}$ см³. Так как средняя плотность вещества клеток бактерий составляет $1,1$ г/см³ [3], вес одной клетки *Micrococcus lysodeikticus* равен $2,4 \cdot 10^{-12}$ г. Если 1 г бактериальных клеток содержит $1,6 \cdot 10^{-6}$ моль, или $9,63 \cdot 10^{18}$ реакционноспособных связей, то на одну бактериальную клетку приходится $2,3 \cdot 10^6$ таких связей. В рамках схемы *б* эта величина соответствует числу молекул фермента, способных разместиться на поверхности одной клетки. С помощью этой величины можно рассчитать площадь участка, приходящегося на одну реакционноспособную связь, или на одну молекулу фермента в адсорбционном монослое, если известна общая площадь поверхности бактериальной клетки. В работе [22] было найдено, что для молекулы цитохрома *c*, имеющей близкие к лизоциму размеры глобулы, площадь в адсорбционном монослое составляет $1100-2100 \text{ \AA}^2$ (в зависимости от характера поверхности адсорбента). Поэтому в случае реализации схемы *б* определяемая нами площадь участка должна лежать в этих пределах. Напротив, согласно приведенным выше соображениям, площадь участка поверхности, приходящегося на одну реакционноспособную связь, определяемая в случае, если имеет место схема *a*, должна быть заметно больше. Однако эта площадь, найденная при условии, что общая площадь поверхности бактериальной клетки принимается равной поверхности сферы с радиусом $0,8 \cdot 10^{-4}$ см, составляет лишь 350 \AA^2 , что существенно меньше не только величины, согласующейся со схемой *a*, но и величины, приведенной в работе [22] для площади участка, занимаемого молекулой белка с близкими размерами глобулы в адсорбционном монослое. Вероятная причина этого состоит в том, что расчет площади поверхности клетки как сферы является слишком грубым приближением и не может учитывать поверхности пор и каналов в бактериальной оболочке, доступных для фермента.

Экспериментальная часть

Характеристики применяемых материалов и методы изучения кинетики лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима детально описаны в работе [1].

Эксперименты по изучению размера частиц суспензии бактериальных клеток в ходе лизиса проводились с помощью нефелометрического метода. Оптическую плотность суспензии клеток в буферном растворе определяли с помощью спектрофотометра SP-1800 в диапазоне длин волн $400-650$ нм. За время каждой регистрации спектра мутности в ходе ферментативного расщепления клеток оптическая плотность реакционной смеси уменьшалась не более чем на 5%. Во всех случаях величина оптической плотности системы не превышала 0,2. Величины светорассеяния исследуемой суспензией определялись с помощью соотношения

$$R_{\lambda} = 1 - 10^{-D_{\lambda}}$$

где R_λ — светорассеяние, D_λ — оптическая плотность системы при длине волны λ .

Лизис бактериальных клеток под действием лизоцима проводили в ацетатном буфере (рН 5,0) при 25°, ионной силе 0,04.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Клесов А. А., Рабинович М. Л. (1976) Биоорг. химия, 2, 680—688.
2. Heller W., Bhatnagar H. L., Nakagaki M. (1962) J. Chem. Phys., 36, 1163—1170.
3. Luria S. E. (1960) in The Bacteria. A treatise on structure and function (Gunsalus J. C., Stanier R. Y., eds.), vol. 1, pp. 8—10, Acad. Press, New York — London.
4. Sharon N. (1967) Scient. Amer. May, 92—98.
5. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1967) Молекулярн. биология, 1, 381—389.
6. Черкасов И. А., Кравченко Н. А., Каверзнева Е. Д. (1966) Докл. АН СССР, 170, 213—215.
7. Skujins J., Pukite A., McLaren A. D. (1973) Mol. and Cell. Biochem., 2, 221—228.
8. Черкасов И. А., Кравченко Н. А., Павловский П. Е., Брагина Л. П. (1975) Биоорг. химия, 1, 50—55.
9. McLaren A. D. (1963) Enzymologia, 26, 237—246.
10. McLaren A. D. (1962) Arch. Biochem. and Biophys., 97, 1—3.
11. Walker G. J., Hoppe P. M. (1963) Biochem. J., 86, 452—462.
12. Brockman H. L., Law J. H., Kezdy F. J. (1973) J. Biol. Chem., 248, 4965—4970.
13. Davies R. C., Neuberger A., Wilson B. M. (1969) Biochim. et biophys. acta. 178, 294—305.
14. Mandels M., Kostick J., Parizek R. (1971) J. Polym. Sci., 36, 445—459.
15. Чухрай Е. С., Полторак О. М. (1973) Вестн. Моск. ун-та, сер. «Химия», 14, 271—277.
16. Хорикова Е. С., Шериев А. В., Полторак О. М. (1969) Вестн. Моск. ун-та, сер. «Химия», 10, 12—15.
17. Полторак О. М. (1967) Ж. физ. химии, 41, 2544—2567.
18. Полторак О. М., Чухрай Е. С. (1970) Вестн. Моск. ун-та, сер. «Химия», 111, 133—146.
19. Banerjee S. K., Kregar I., Turk V., Rupley J. A. (1973) J. Biol. Chem., 248, 4786—4792.
20. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клесов А. А. (1974) Биохимия, 36, 227—235.
21. Salton M. R. J. (1964) in The Bacterial Cell Wall, pp. 246, 264, Elsevier, Amsterdam, London, New York.
22. Дуброва М. А., Камышвый А. Л., Чухрай Е. С., Полторак О. М. (1972) Вестн. Моск. ун-та, сер. «Химия», 13, 466—468.

Поступила в редакцию
5.IX.1975

KINETICS OF ENZYMATIC REACTIONS IN HETEROGENEOUS SYSTEMS. II. BACTERIOLYTIC ACTION OF LYSOZYME ON *MICROCOCCUS* *LYSODEIKTICUS* CELLS

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

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

The theoretical treatment of the kinetics of enzyme-catalyzed bacteriolysis is undertaken. The kinetic consequences of enzymatic lysis of bacterial cells are discussed for the cases of low and high concentrations of reactive sites on the surface of an insoluble substrate. Implication of the apparent kinetic parameters, k_{cat} and $K_m(app)$, for enzymatic bacteriolysis is considered for an example of *Micrococcus lysodeikticus* bacterial cells splitting by hen egg white lysozyme.