



УДК 577.155.3.02

ИНАКТИВАЦИЯ РАСТВОРИМОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ ИЗ *E. COLI* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФЕНИЛМЕТИЛСУЛЬФОНИЛФТОРИДА: КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ТИТРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ*Швабас В.-Ю. К., Марголин А. Л., Шерстюк С. Ф.,
Клесов А. А., Березин Н. В.**Московский государственный университет им.
М. В. Ломоносова*

Инактивация пенициллинамидазы под действием фенилметилсульфонилфторида характеризуется первым порядком по концентрации ингибитора и происходит после образования нековалентного фермент-ингибиторного комплекса ($K_i = 5,9 \cdot 10^{-8}$ М) с константой скорости «внутримолекулярной» инактивации $0,06 \text{ с}^{-1}$. 6-Аминопенициллановая кислота практически полностью реактивирует фермент. Эти данные свидетельствуют о том, что реакция квазисубстрата фенилметилсульфонилфторида с пенициллинамидазой протекает по трехстадийной схеме с образованием промежуточного соединения. Используя фенилметилсульфонилфторид, определили абсолютную концентрацию активных центров растворимой и иммобилизованной пенициллинамидазы. Показано, что иммобилизованная в полиакриламидном геле и растворимая пенициллинамидаза характеризуются близкими значениями $k_{\text{кат}}$ (53 ± 5 и $48 \pm 3 \text{ с}^{-1}$ соответственно).

Пенициллинамидаза (пенициллинамидогидролаза, КФ 3.5.1.11) катализирует гидролиз пенициллинов с образованием 6-аминопенициллановой и соответствующей карбоновой кислоты. В настоящее время этот фермент привлекает внимание исследователей в связи с возможным применением иммобилизованной пенициллинамидазы для получения 6-аминопенициллановой кислоты, а также «полусинтетических» пенициллинов и цефалоспоринов в промышленных масштабах [1—5].

Очевидно, что для целенаправленного поиска оптимальных методов иммобилизации биокатализаторов необходимо решить проблему определения концентрации активных центров растворимых и иммобилизованных ферментов. Потеря каталитической активности, которая часто наблюдается при иммобилизации ферментов, может быть в принципе вызвана как изменением каталитических свойств фермента при иммобилизации, так и тривиальной инактивацией (уменьшением концентрации активных центров фермента). Определение концентрации активных центров и расчет истинной каталитической активности фермента может решить эту проблему. Обзор методов титрования активных центров ферментов проведен в работе [6]. Следует, однако, отметить, что универсальных методов определения концентрации активных центров практически не существует и в каждом конкретном случае эта проблема должна решаться на основании совокупности данных о специфичности и механизме действия фермента.

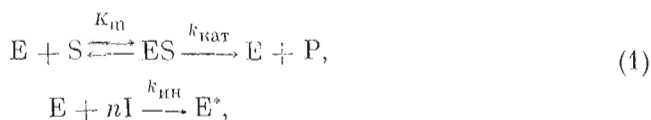
В результате настоящего исследования впервые разработан метод определения абсолютной концентрации активных центров как растворимой,

так и иммобилизованной пенициллинамидазы из *E. coli*, а также детально изучена кинетика инактивации фермента под действием квазиобратимого ингибитора — фенолметилсульфонилфторида, использованного в качестве «титранта» активных центров фермента, и реактивация полученной сульфонилпенициллинамидазы в присутствии дополнительного нуклеофильного агента — 6-аминопенициллановой кислоты.

При выборе «титранта» руководствовались тем, что структура наиболее эффективных необратимых ингибиторов должна определяться специфичностью фермента. Анализ структуры субстратов пенициллинамидазы показывает, что субстратная специфичность данного фермента практически полностью определяется строением ацильной части субстратов [2, 7, 8]. Так как пенициллинамидаза из *E. coli* наиболее специфична к производным фенилуксусной кислоты, можно полагать, что углеводородная часть наиболее эффективных ингибиторов фермента должна содержать бензильный радикал. С другой стороны, известно [5], что пенициллинамидаза инактивируется под действием специфических реагентов на аминокислотный остаток серина в активном центре фермента. В таком случае именно фенолметилсульфонилфторид может быть наиболее подходящим из реагентов этого класса для инактивации пенициллинамидаз.

Предварительные исследования взаимодействия пенициллинамидазы с фенолметилсульфонилфторидом показали, что процесс инактивации протекает очень быстро и даже при низких концентрациях реагентов (1—10 мкМ) заканчивается уже через 5—10 мин.

Определение порядка реакции инактивации пенициллинамидазы фенолметилсульфонилфторидом. Для выяснения механизма инактивации пенициллинамидазы в первую очередь необходимо выяснить стехиометрию реакции, т. е. определить порядок реакции инактивации по ингибитору. Для этого был разработан кинетический метод исследования инактивации фермента в присутствии субстрата. Схему двух параллельно протекающих реакций, одна из которых является каталитической, а вторая относится к инактивации фермента под действием добавленного эффектора (в данном случае фенолметилсульфонилфторида), можно записать в простейшем виде следующим образом:



где S — субстрат (в данном случае *n*-карбокси-*m*-нитроанилид фенилуксусной кислоты), K_m и $k_{\text{кат}}$ — константа Михаэлиса и каталитическая константа ферментативной реакции, $k_{\text{ин}}$ — константа скорости инактивации фермента (*n*-го порядка по ингибитору), E^* — инактивированный фермент.

В условиях эксперимента ($[S]_0 \gg K_m$) зависимость концентрации продукта реакции *n*-карбокси-*m*-нитроанилина от времени была линейной в отсутствие ингибитора (рис. 1). При добавлении ингибитора в систему скорость ферментативного гидролиза прогрессивно уменьшается во времени (рис. 1, 2—4), что обусловлено параллельно протекающей инактивацией фермента.

Как следует из схемы 1, скорость инактивации фермента равна

$$\frac{d[E^*]}{dt} = k_{\text{ин}} [I]^n [E], \quad (2)$$

или, учитывая уравнение материального баланса по ферменту и выражение для константы Михаэлиса реакции (в квазиравновесном режиме протекания реакции),

$$\frac{d[E^*]}{dt} = k_{\text{ин}} [I]^n \frac{[E]_0 - [E^*]}{1 + [S]/K_m}. \quad (3)$$

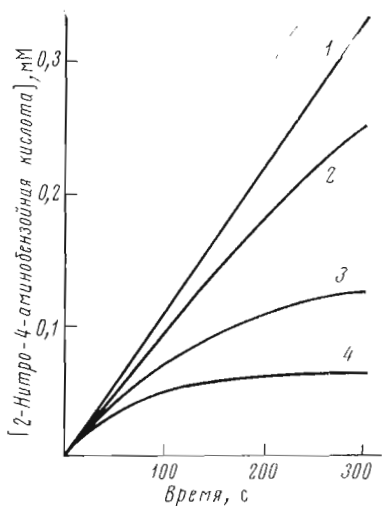


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика гидролиза *n*-карбокси-*m*-нитроанилида фенолуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой в отсутствие (1) и в присутствии фенолметилсульфонилфторида при его концентрации (мкМ): 2 — 0,1; 3 — 0,4; 4 — 0,8

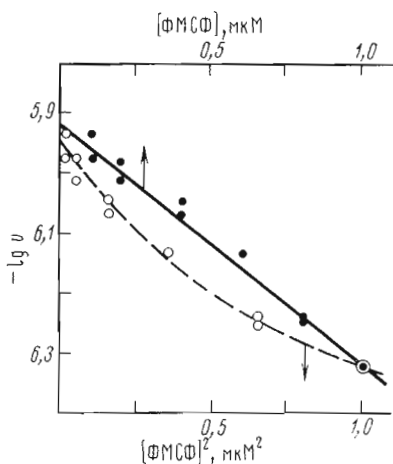


Рис. 2

Рис. 2. Определение порядка реакции инактивации пенициллинамидазы по концентрации фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ) в рамках уравнения 6

Решая дифференциальное уравнение 3 с учетом начальных условий (в начальный момент времени в системе присутствует только активная форма фермента в концентрации $[E]_0$) и заменяя концентрацию инактивированного фермента выражением 4 для концентрации свободной формы фермента

$$[E] = \frac{[E]_0 - [E^*]}{1 + [S]/K_m}, \quad (4)$$

получим

$$[E] = \frac{[E]_0 e^{-\frac{k_{ин} [I]^n}{1+[S]/K_m} \cdot t}}{1 + [S]/K_m}. \quad (5)$$

Таким образом, скорость наблюдаемой реакции ферментативного гидролиза в присутствии ингибитора будет равна

$$V = \frac{k_{кат} [E]_0 [S]}{K_m + [S]} \cdot e^{-\frac{k_{ин} [I]^n}{1+[S]/K_m} \cdot t}. \quad (6)$$

Видно, что для определения порядка реакции инактивации по ингибитору следует найти скорость реакции гидролиза при различных концентрациях фенолметилсульфонилфторида в один и тот же момент времени и проанализировать данные в полулогарифмических координатах $\ln V - [I]^n$. Представленные результаты (рис. 2) указывают на то, что инактивация пенициллинамидазы фенолметилсульфонилфторидом имеет первый порядок по ингибитору (прямая на рис. 2).

Определение стадийности реакции инактивации пенициллинамидазы фенолметилсульфонилфторидом. Инактивация пенициллинамидазы может протекать либо в одну стадию, когда фенолметилсульфонилфторид реагирует «из объема», без образования нековалентного комплекса с ферментом, либо с предварительным образованием комплекса с активным центром пенициллинамидазы. Если в первом случае должно наблюдаться линей-

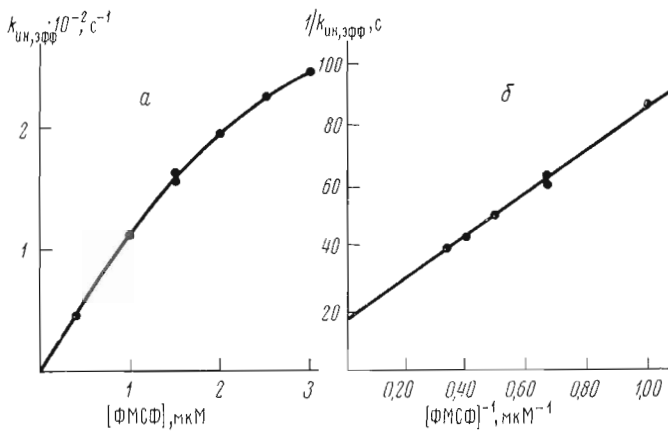
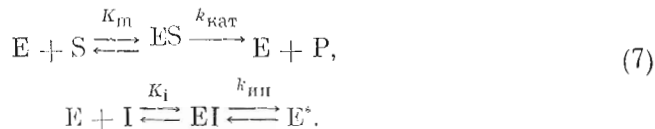


Рис. 3. Инактивация пенициллинамидазы под действием ФМСФ: *a* — зависимость эффективного значения константы скорости инактивации от концентрации ингибитора; *b* — определение константы связывания ФМСФ с пенициллинамидазой и константы скорости «внутримолекулярной» инактивации фермента в рамках схемы 7 и уравнения 8, концентрация субстрата (*n*-карбоксит-*m*-нитроанилида фенилуксусной кислоты) 9 мМ

ное увеличение скорости инактивации при повышении концентрации фенилметилсульфонилфторида, то в случае образования промежуточного фермент-ингибиторного комплекса зависимость скорости инактивации от концентрации ингибитора будет иметь вид кривой с насыщением. В выбранных нами условиях эксперимента (схема 1) это означало бы, что эффективное значение константы скорости инактивации не зависит линейно от концентрации ингибитора. Именно такой случай и наблюдается на опыте (рис. 3а). Отсюда можно заключить, что схема 1 является упрощенной и «минимальная» схема параллельных реакций ферментативного гидролиза и инактивации фенилметилсульфонилфторидом выглядит так:



Здесь K_i — константа диссоциации промежуточного комплекса фермент—ингибитор, $k_{ин}$ — константа скорости «внутримолекулярной» инактивации фермента.

Кинетический анализ схемы 7 приводит к следующему выражению для эффективной (наблюдаемой на опыте и зависящей от концентрации ингибитора) константы скорости реакции псевдопервого порядка;

$$k_{ин(эфф)} = k_{ин} \cdot \frac{[I]}{K_i \left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S]}{K_m} \right)}.
 \tag{8}$$

Анализируя зависимость эффективной константы скорости инактивации пенициллинамидазы от концентрации фенилметилсульфонилфторида в координатах $(1/k_{ин(эфф)}, 1/[I])$ согласно уравнению 8 и учитывая K_m , равное $1,3 \cdot 10^{-4}$ М, определенное из независимого эксперимента, нетрудно найти значение кинетических параметров реакции взаимодействия фермента и ингибитора. Установленные таким образом величины $k_{ин}$ и K_i равны $6,0 \cdot 10^{-2}$ с⁻¹ и $5,9 \cdot 10^{-8}$ М (рис. 3б). В случае инактивации фенилметилсульфонилфторидом другого фермента, α -химотрипсина [9], величина константы скорости «внутримолекулярной» инактивации практически совпадает ($5,2 \cdot 10^{-2}$ с⁻¹) с соответствующей константой скорости инактивации пенициллинамидазы, в то время как эффективность связывания ин-

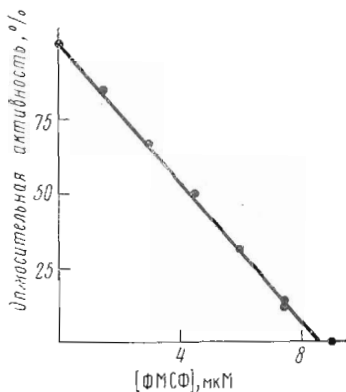


Рис. 4

Рис. 4. Определение абсолютной концентрации активных центров растворимой пенициллинамидазы с помощью необратимого ингибитора фенолметилсульфонилфторида

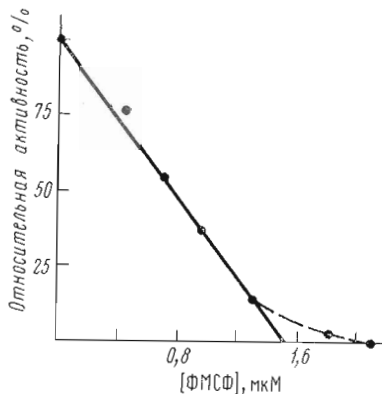


Рис. 5

Рис. 5. Титрование активных центров препарата пенициллинамидазы, иммобилизованной в полиакриламидном геле

гибитора с активным центром пенициллинамидазы на пять порядков лучше, чем в случае α -химотрипсина ($K_i = 5,6 \cdot 10^{-3}$ М).

Титрование активных центров пенициллинамидазы. Как было показано выше, фенолметилсульфонилфторид чрезвычайно эффективный необратимый ингибитор пенициллинамидазы и, следовательно, может быть использован в качестве титранта активных центров фермента. Единственным препятствием для использования фенолметилсульфонилфторида в качестве титранта является его лабильность при высоких значениях pH раствора. Так, при pH 8,0 время полупревращения в реакции щелочного гидролиза фенолметилсульфонилфторида составляет 4 мин, однако при pH 7,0 оно равно уже 40 мин, а при pH 6,0 скорость гидролиза фенолметилсульфонилфторида чрезвычайно мала. В то же время эффективность инактивации пенициллинамидазы под действием фенолметилсульфонилфторида в этих условиях очень высока; следовательно, в условиях эксперимента гидролизом ингибитора можно пренебречь. Линейная зависимость относительной активности пенициллинамидазы от концентрации добавленного фенолметилсульфонилфторида (рис. 4) позволяет определить концентрацию ингибитора, необходимую для полной инактивации фермента в растворе. Учитывая то, что взаимодействие пенициллинамидазы с фенолметилсульфонилфторидом происходит в стехиометрическом соотношении 1 : 1, найденная концентрация ингибитора (точка пересечения с осью абсцисс, рис. 4) равна начальной концентрации фермента в растворе. Аналогичным образом была определена и концентрация активных центров для препарата пенициллинамидазы, иммобилизованной в полиакриламидном геле (рис. 5). Зная концентрацию активных центров в нативном и иммобилизованном препаратах фермента, нетрудно установить и значение каталитических констант ферментативного гидролиза бензилпенициллина с использованием этих препаратов. Оказалось, что величины каталитических констант гидролиза бензилпенициллина, катализируемого растворимой ($k_{кат} = 48 \pm 3$ с⁻¹) и иммобилизованной ($k_{кат} = 53 \pm 5$ с⁻¹) пенициллинамидазой, практически одинаковы. Это указывает на то, что при использовании данного метода иммобилизации в полиакриламидном геле каталитические свойства фермента не изменяются, а наблюдаемая потеря каталитической активности (~ 50 %) обусловлена инактивацией фермента (потерей активных центров).

Реактивация фенолметилсульфонил-пенициллинамидазы с использованием дополнительного нуклеофильного агента — 6-аминопенициллановой кислоты. Одинаковые значения констант скоростей «внутримолекулярной» инактивации α -химотрипсина и пенициллинамидазы фенолметилсульфонилфторидом (см. выше) указывают на сходство механизмов реакций сульфонилования этих ферментов. Так как в случае α -химотрипсина достоверно показано, что сульфонилованию подвергается остаток серина-195 активного центра фермента [10], можно полагать, что в активном центре пенициллинамидазы также присутствует «активный» остаток серина. О том, что пенициллинамидаза является сериновым ферментом, говорит также инактивация этого фермента диизопропилфторфосфатом [5]. В таком случае неактивная форма фермента E^* (сульфонил-пенициллинамидаза) представляет собой аналог ацилфермента. До сих пор в литературе отсутствуют прямые доказательства трехстадийной схемы ферментативной реакции в случае пенициллинамидазы. Взаимодействие этого фермента с фенолметилсульфонилфторидом можно было бы рассматривать как реакцию фермента с субстратом, протекающую по трехстадийному механизму, если бы удалось показать наличие стадии деацилирования ацилфермента (сульфонил-пенициллинамидазы). Можно предположить, что десульфонилование инактивированного фермента под действием воды — настолько медленная стадия, что на практике не удается наблюдать реактивацию фермента. В таком случае следовало бы ожидать, что, если сульфонилованный фермент и образуется, его деацилирование возможно лишь при использовании более эффективных, чем вода, нуклеофильных агентов. Подобные ускорения медленного деацилирования хорошо изучены в катализе химотрипсином [11], ацетилхолинэстеразой [12], папаином [13], щелочной фосфатазой [14].

В случае пенициллинамидазы нами было показано, что 6-аминопенициллановая кислота выступает в качестве нуклеофильного агента, превышающего по своей силе нуклеофильную способность воды примерно в 10^4 раз. Поэтому можно ожидать, что 6-аминопенициллановая кислота будет приводить к реактивации пенициллинамидазы, потерявшей свою активность в результате взаимодействия с фенолметилсульфонилфторидом. Реактивацию инактивированного фермента под действием 6-аминопенициллановой кислоты проводили на препарате иммобилизованной пенициллинамидазы, что было намного удобнее по методическим соображениям (выше было показано, что каталитические свойства фермента при иммобилизации не изменяются). Экспериментальные данные представлены в таблице.

Следует подчеркнуть, что даже незначительной реактивации фермента под действием воды не удалось обнаружить за неделю и лишь использование более эффективного, чем вода, нуклеофильного агента (6-аминопенициллановой кислоты) позволило установить наличие промежуточного сульфонилованного соединения при взаимодействии пенициллинамидазы с фенолметилсульфонилфторидом. Безусловно, участие 6-аминопенициллановой кислоты в качестве дополнительного нуклеофильного агента в реакции десульфонилования фермента — пока гипотеза, так как фенолметилсульфонилпенициллин, который должен образовывать-

Реактивация пенициллинамидазы под действием 6-аминопенициллановой кислоты (10^{-2} M)

Активность исходного раствора фермента 100%, активность раствора фермента после инактивации 1,3%

Время реактивации, ч	6	16	21	30	39	46	64
Активность, %	29	58	64	75	86	89	97

ся в результате этой реакции, не был выделен из реакционной смеси из-за его крайне малой концентрации (если он вообще образуется). Тем не менее, даже если 6-аминопенициллановая кислота является просто промотором реакции десульфонилирования пенициллинамидазы, это не нарушает выводов настоящей работы. В заключение следует еще раз подчеркнуть, что полученные данные указывают на существование второго (кроме фермент-субстратного комплекса) промежуточного соединения в катализе пенициллинамидазой, в котором фермент и остаток субстрата (в данном случае квазисубстрата — фенолметилсульфонилфторида) находятся в стехиометрическом соотношении (1 : 1). Это соединение фактически является аналогом ацилфермента в катализе гидролазами.

Экспериментальная часть

Характеристики препарата пенициллинамидазы из *E. coli*, а также бензилпенициллина (калийная соль) приведены в работе [1]. *n*-Карбокси-*m*-нитроанилид фенолуксусной кислоты синтезирован по методике [5]. Фенолметилсульфоксифторид — препарат производства фирмы Sigma (США). Препараты пенициллинамидазы, иммобилизованной в полиакриламидном геле и обработанной глутаровым альдегидом, были получены во Всесоюзном научно-исследовательском институте антибиотиков.

Изучение кинетики инактивации пенициллинамидазы под действием фенолметилсульфонилфторида проводили, регистрируя потерю каталитической активности фермента в параллельно протекающей реакции ферментативного гидролиза *n*-карбокси-*m*-нитроанилида фенолуксусной кислоты. Принцип использованного методического подхода более подробно изложен в теоретической части работы. За кинетикой реакции ферментативного гидролиза *n*-карбокси-*m*-нитроанилида фенолуксусной кислоты следили при помощи автоматического анализатора-спектрофотометра GEMSAEC (Electro-Nucleonics, США). Типичный эксперимент проводили следующим образом: в камеру ротора В добавляли водные растворы пенициллинамидазы, в камеру С — растворы субстрата (0,1 М фосфатный буфер, рН 6,0) и фенолметилсульфонилфторида в изопропанол таким образом, чтобы содержание камер В (раствор фермента) и С (раствор субстрата и ингибитора) было разделено. После переноса заполненного ротора (в котором имеется 16 пар камер В и С) в измерительный блок, термостатирования в течение 5 мин и смешивания растворов в соответствующих ячейках начинали следить за кинетикой ферментативной реакции. Полученные кинетические кривые (кривизна которых в силу выбранных условий вызвана только инактивацией фермента под действием фенолметилсульфонилфторида) обрабатывали по методу Гугенгейма [15] и определяли эффективное значение константы скорости инактивации. Обработку экспериментальных данных проводили по методу наименьших квадратов на компьютере РДР 8/Е*.

Измерение активности пенициллинамидазы при определении концентрации активных центров проводили титриметрическим методом в термостатируемой ячейке объемом 50 мл, при $25 \pm 0,1^\circ$ в 0,1 М КСl, рН 7,5, концентрация бензилпенициллина 0,5 мМ. Типичный эксперимент при определении концентрации активных центров проводили следующим образом: в ячейку с исходным раствором пенициллинамидазы (объем 2 мл, концентрация 2900 ед/мл) вносили последовательно по 0,03 мл раствора фенолметилсульфонилфторида концентрации 0,1 мМ, фермент с ингибитором инкубировали в 0,01 М фосфатном буфере (рН 6,0) и через определенные промежутки времени (от 5 до 20 мин) отбирали пробы (от 0,03 до 0,5 мл) и измеряли остаточную каталитическую активность. Было найдено, что инактивирующее действие очередной порции добавленного фенолметилсульфонилфторида заканчивается быстрее, чем за 5 мин.

При определении концентрации активных центров иммобилизованной пенициллинамидазы готовили ряд навесок препарата (от 0,14 до 0,18 г). Каждый образец помещали в отдельный стаканчик объемом 5 мл, приливали 0,5 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 6,0) и от 0,03 до 0,15 мл 0,1 мМ раствора фенилметилсульфонилфторида. Раствор фенилметилсульфонилфторида (10 мМ) готовили сначала в изопропанолe и затем разбавляли до необходимой концентрации 0,1 М раствором КСl (рН 5,5).

При изучении спонтанной (под действием воды) реактивации инактивированной под действием фенилметилсульфонилфторида пенициллинамидазы (25°, рН 6,5 или 9,0) в каждый стаканчик с навеской (0,5 г) иммобилизованного фермента добавляли сначала 1 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 6,0), затем 0,5 мл раствора фенилметилсульфонилфторида (концентрация 10 мМ) и выдерживали в течение 30 мин. Затем препарат промывали на фильтре и переносили в 0,01 М фосфатный (рН 6,5) или 0,1 М карбонатный (рН 9,0) буфер. Через определенные промежутки времени навеску отфильтровывали, промывали дистиллированной водой, переносили в реакционную ячейку и измеряли каталитическую активность.

Реактивацию инактивированной под действием фенилметилсульфонилфторида пенициллинамидазы в присутствии 6-аминопенициллановой кислоты в концентрации 10 мМ (рН 6,5; 25°) проводили по аналогичной методике.

Кроме того, при работе с иммобилизованными препаратами пенициллинамидазы во всех случаях проверяли возможное вымывание фермента, а также потери активности в процессе фильтрования.

Авторы благодарят проф. Е. М. Савицкую и сотрудника ВНИИА П. С. Ныс за любезное предоставление препаратов пенициллинамидазы, а также сотрудника кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ А. С. Белоусова за составление программ обработки экспериментальных данных по методу наименьших квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Клесов А. А., Швядас В. К., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1974) Антибиотики, 19, 880—887.
2. Швядас В.-Ю. К. (1976) Канд. дис. «Кинетика и механизм действия пенициллинамидазы», МГУ.
3. Vandamme E. J., Voets J. P. (1974) *Advances Appl. Microbiol.*, 17, 311—369.
4. Marconi W., Bartoli F., Cecere F., Galli G., Morisi F. (1975) *Agr. and Biol. Chem.*, 39, 277—279.
5. Kutzbach C., Rauenbusch H. (1974) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 354, 45—53.
6. Клесов А. А. (1975) Материалы Всесоюзного совещания «Кристаллические ферменты», с. 117—124, Вильнюс.
7. Cole M. (1969) *Biochem. J.*, 115, 741—745.
8. Cole M. (1969) *Biochem. J.*, 115, 747—756.
9. Gold A. M., Fahrney D. (1964) *Biochemistry*, 3, 783—791.
10. Weiner H., White W. N., Hoare D. G., Koshland D. E. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, 88, 3851—3859.
11. Beresin I. V., Kasanskaya N. F., Klyosov A. A. (1971) *FEBS Lett.*, 15, 121—125.
12. Яковлев В. А. (1965) Кинетика ферментативного катализа, М., «Наука».
13. Henry A. C., Kirsch J. F. (1967) *Biochemistry*, 6, 35—36.
14. Hinberg J., Laidler K. J. (1972) *Can. J. Biochem.*, 50, 1360.
15. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, с. 20, МГУ.

Поступила в редакцию
20.X.1976

INACTIVATION OF SOLUBLE AND IMMOBILIZED PENICILLIN
AMIDASE FROM *E. COLI* BY PHENYLMETHYLSULFONYL FLUORIDE:
THE KINETIC ANALYSIS AND TITRATION
OF THE ENZYME ACTIVE SITES

SHVYADAS V. K., MARGOLIN A. L., SHERSTYUK S. F.,
KLYOSOV A. A., BEREZIN I. V.

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

Penicillin amidase inactivation by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) is shown to be a first-order process and to take part after non-covalent complex formation between the enzyme and the inhibitor ($K_i = 5.9 \times 10^{-8}$ M). The intramolecular reaction rate constant is equal to 0.06 sec^{-1} . 6-Aminopenicillanic acid provides essentially complete reactivation of the enzyme. The reaction of quasisubstrate, phenylmethylsulfonyl fluoride, with penicillin amidase proceeds via three-stage mechanism, whereby an intermediate product is formed. Using PMSF the absolute concentration of the active sites was determined for soluble and immobilized penicillin amidase. Immobilized on polyacrylamide gel and soluble penicillin amidases were shown to have similar k_{cat} values, 53 ± 5 and $48 \pm 3 \text{ sec}^{-1}$, respectively.
