



УДК 577.153.02:547.244'29

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ЛИПАЗЫ ИЗ *NIGELLA DAMASCENA* L. (ЧЕРНУШКА ДАМАССКАЯ)

Гмошинский И. В.

Институт питания Академии медицинских наук СССР, Москва

Ямольская Г. П.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Ротанова Т. В., Гинодман Л. М.

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

Борорганические кислоты общей формулы $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n=2-9$) и $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_m\text{B}(\text{OH})_2$ ($m=0, 2, 3, 4$) подавляют активность липазы из *Nigella damascena* L. в реакциях гидролиза трибутирина и *n*-нитрофенилацетата. Из анализа зависимости констант ингибирования от размера и структуры углеводородной цепи ингибитора следует, что сорбционный и каталитический участки активного центра этой липазы пространственно разделены. Сорбционный участок, по-видимому, имеет длину не менее семи метиленовых звеньев, и на всем его протяжении затруднено связывание фенольного остатка.

В 1973 г. из семян растения *Nigella damascena* L. (чернушка дамасская) был выделен препарат липолитического фермента [1]. Как и другие растительные липазы, фермент из чернушки дамасской сравнительно мало изучен, хотя он применяется в медицине для заместительной терапии при пониженной функции поджелудочной железы [2-4].

Известно, что наиболее исследованный липолитический фермент — панкреатическая липаза — относится к классу сериновых гидролаз [5-7]. Представлялось интересным применить к изучению новой липазы хорошо

разработанный для серин-гистидиновых ферментов метод обратимого бифункционального ингибирования борорганическими кислотами. Этот метод для ряда гидролитических ферментов позволил изучить топографию сорбционных участков и их расположение по отношению к каталитическим центрам [8-16]. В основе метода обратимого бифункционального ингибирования лежит анализ информации об устойчивости комплексов ферментов с борорганическими кислотами (рис. 1).

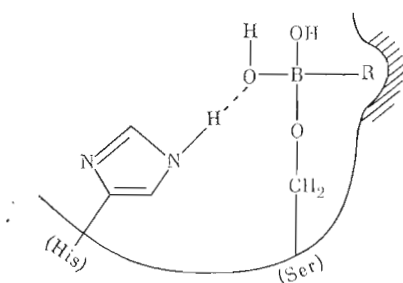


Рис. 1. Взаимодействие борорганической кислоты с активным центром сериновой гидролазы

специфического субстрата трибутирина. При этом был подтвержден гидрофобный характер связывания ингибитора ферментом и изучены детали структуры сорбционного участка. В настоящей работе ингибирование липазы из чернушки дамасской борорганическими кислотами исследовано как в гетерогенной (эмульсия трибутирина), так и в гомогенной системе (раствор *n*-нитрофенилацетата). Полученные данные позволяют сопоставить структуры активного центра липазы из чернушки дамасской и таких

хорошо изученных гидролитических ферментов, как α -химотрипсин и панкреатическая липаза.

В качестве ингибиторов мы использовали гомологический ряд алкилборных кислот, $\text{H}(\text{C}_n\text{H}_{2n})_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n=2-9$), и аралкилборные кислоты, $\text{C}_6\text{H}_5(\text{C}_m\text{H}_2)_m\text{B}(\text{OH})_2$ ($m=0, 2, 3, 4$). В работе применялся коммерческий препарат липазы из чернушки дамасской (далее называемой просто липазой), дополнительно очищенной по четырехстадийной методике, включающей делипидизацию белкового порошка органическими растворителями, гель-фильтрацию на сефадексе G-200 и ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе.

1. Взаимодействие липазы с борорганическими кислотами

а) Ингибирование липазы алкилборными кислотами в гомогенной среде.

Определение скоростей реакции при различных концентрациях субстрата (1,8–9,0 мМ) с последующей линеаризацией полученных результатов в координатах Лайнуивера — Берка показало, что уравнение Михаэлиса — Ментен применимо к гидролизу *n*-нитрофенилацетата липазой. Содержащийся по условиям эксперимента в реакционной смеси этанол (13,3%) оказался ингибитором смешанного типа с $[I]_{50} \approx 10$ М. K_m для *n*-нитрофенилацетата в указанных условиях составила 4,9 мМ.

В двойных обратных координатах был определен тип ингибирования борной и алкилборными кислотами. С соединениями, содержащими от трех до девяти метиленовых звеньев, тип ингибирования оказался конкурентным. Борная и этилборная кислоты оказались неконкурентными ингибиторами.

Константу конкурентного ингибирования определяли двумя методами: как котангенс угла наклона прямой в координатах $K_m^*/K_m - [I]$ (где K_m^* — кажущаяся константа Михаэлиса при концентрации ингибитора $[I]$) или из уравнения

$$K_1 = \frac{K_m}{K_m + [S]_0} \cdot [I]_{50}, \quad (1)$$

где $[S]_0$ — начальная концентрация субстрата. Величина $[I]_{50}$ в свою очередь определялась из графика в координатах $v_0/v_1 - [I]$, где v_0 и v_1 — скорости реакции в отсутствие и в присутствии ингибитора.

Для вычисления константы неконкурентного ингибирования борной и этилборной кислотами использовали уравнение

$$K_1 = \frac{[I]}{k_{\text{кат}}^*/k_{\text{кат}} - 1}, \quad (2)$$

где $k_{\text{кат}}^*$ и $k_{\text{кат}}$ — кажущиеся каталитические константы в присутствии и в отсутствие ингибитора — определяли из соответствующих графиков в координатах Лайнуивера — Берка. В ряде случаев константы ингибирования липазы борорганическими кислотами были определены также по методу Диксона [17]. Полученные значения констант ингибирования липазы алкилборными кислотами приведены в табл. 1.

б) Ингибирование липазы алкилборными кислотами в гетерогенной среде. Условия приготовления эмульсий трибутирина были строго стандартными, поэтому полная поверхность эмульсии субстрата была пропорциональна его объемной концентрации. Поскольку тип ингибирования фермента алкилборными кислотами ($n=4-9$) оказался чисто конкурентным, константы ингибирования липолиза трибутирина определяли с помощью уравнения (1). Константы ингибирования для H_2O_3 и низших алкилборных кислот ($n < 4$) определить не удалось вследствие большой буферной емкости их растворов, затруднявшей определение скорости реакции принятым нами методом. Константы ингибирования липазы в гетерогенной среде борной и алкилборными кислотами представлены в табл. 1.

Эффективность ингибирования липазы из чернушки дамасской борной и алкилборными кислотами
Приведена K_1 , мМ

Ингибитор	Субстрат		Ингибитор	Субстрат	
	<i>n</i> -нитрофенилацетат *	трибутирин **		<i>n</i> -нитрофенилацетат *	трибутирин **
H_3BO_3	110	—	$H(CH_2)_6B(OH)_2$	1,5	0,37
$H(CH_2)_2B(OH)_2$	78	—	$H(CH_2)_7B(OH)_2$	0,30	0,071
$H(CH_2)_3B(OH)_2$	46	—	$H(CH_2)_8B(OH)_2$	0,13	0,032
$H(CH_2)_4B(OH)_2$	20	8,2	$H(CH_2)_9B(OH)_2$	0,042	0,022
$H(CH_2)_5B(OH)_2$	5,0	2,2			

* 37° С, 0,05 М трис-НСl-буфер, рН 7,5.

** 20° С, 0,1 М NaCl, рН 8,0

Таблица 2

Эффективность ингибирования липазы из чернушки дамасской фенилалкилборными кислотами
Приведена K_1 , мМ

Ингибитор	Субстрат		Ингибитор	Субстрат	
	<i>n</i> -нитрофенилацетат *	трибутирин **		<i>n</i> -нитрофенилацетат *	трибутирин **
$C_6H_5B(OH)_2$	3,4	1,2	$C_6H_5(CH_2)_3B(OH)_2$	1,7	0,28
$C_6H_5(CH_2)_2B(OH)_2$	5,0	0,71	$C_6H_5(CH_2)_4B(OH)_2$	0,92	0,17

* 37° С, 0,05 М трис-НСl-буфер, рН 7,5.

** 20° С, 0,1 М NaCl, рН 8,0.

в) Ингибирование активности липазы аралкилборными кислотами.

В табл. 2 приведены данные об ингибировании липазы фенилалкилборными кислотами. Как в гомогенной, так и в гетерогенной среде аралкилборные кислоты ингибируют липазу по конкурентному типу. Константы ингибирования рассчитаны по формуле (1).

Как видно из табл. 1 и 2, ингибирование липазы борорганическими кислотами одинаковым образом зависит от величины и структуры углеводородного радикала в молекуле ингибитора в опытах как со специфическим (трибутирин), так и с неспецифическим (*n*-нитрофенилацетат) субстратами. Определенные различия наблюдаются только при ингибировании высшими гомологами ($C_8 - C_9$) борорганических кислот, что хорошо видно при сравнении кривых 1 и 2 на рис. 2. Эти различия связаны, по-видимому, с распределением высших алкилборных кислот между водной и органической фазами. Учитывая, что в выражение (1) для константы ингибирования входит концентрация ингибитора $[I]_{50}$ во всей системе в целом, и принимая, что активной по отношению к ферменту формой ингибитора является его водный раствор, можно показать (см. Приложение), что «истинная» константа ингибирования K_i' , выражаемая через концентрацию ингибитора в водной фазе, связана с константой K_1 , определяемой уравнением (1), следующим соотношением:

$$K_i' = K_1 (\alpha Q + 1)^{-1}. \quad (3)$$

Здесь α — коэффициент распределения ингибитора, близкий к $10^{\pi-1}$ (π — коэффициент гидрофобности [18]); Q — отношение объемов двух фаз, составляющее $\sim 10^{-3}$. Очевидно, что только начиная с октилборной кислоты ($\pi=4$) величина $(\alpha Q + 1)^{-1}$ заметно отличается от единицы и значение K_i' становится существенно меньшим K_1 . Величина соответствующей по-

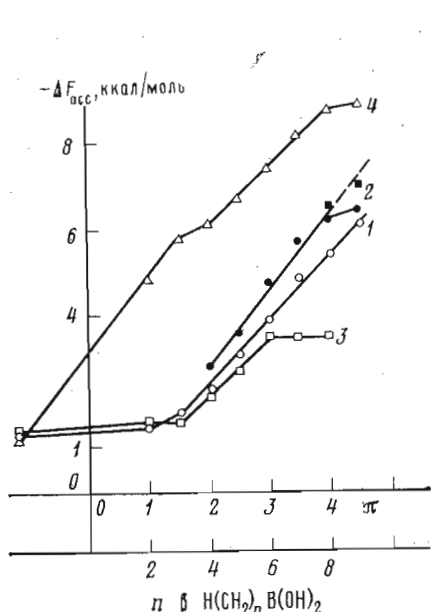


Рис. 2

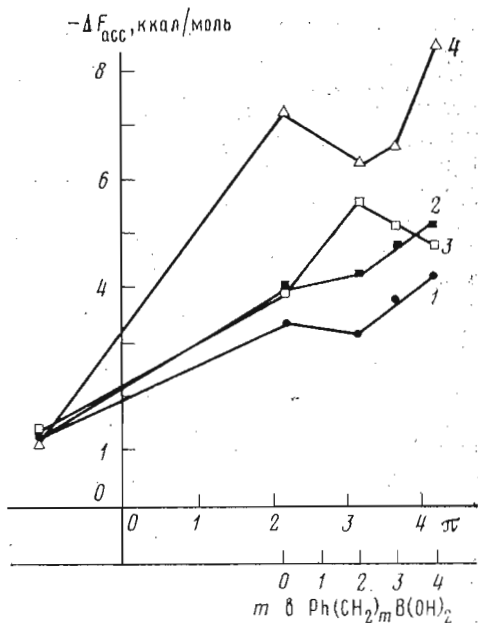


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость свободной энергии связывания алкилборных кислот от гидрофобности (π) углеводородного радикала: 1 — липаза из чернушки дамасской (*n*-нитрофенилацетат), 2 — липаза из чернушки дамасской (трибутирин), 3 — α -химотрипсин (*n*-нитрофенилтриметилацетат) [10], 4 — панкреатическая липаза (трибутирин) [14]

Рис. 3. Зависимость свободной энергии ассоциации аралкилборных кислот от гидрофобности углеводородного радикала (обозначения см. в подписи к рис. 2)

правки $\Delta\Delta F_{асс} = \Delta F'_{асс} - \Delta F_{асс}$ (где $\Delta F_{асс} = -RT \ln K_1$), вычисленная с учетом уравнения (3) для октилборной кислоты, составляет -300 кал/моль и для нонилборной кислоты -650 кал/моль. Исправленные точки обозначены зачерненными квадратами на графике зависимости $\Delta F_{асс} - \pi$ в гетерогенной системе (рис. 2, 2).

Таким образом, наблюдающееся как для липазы из чернушки дамасской, так и для панкреатической липазы (см. кривые 2 и 4 на рис. 2; ср. [14]) отклонение от линейности в области высших алкилборных кислот обусловлено, по-видимому, неспецифическим влиянием гетерогенности систем.

Некоторое различие инкрементов свободной энергии связывания (в расчете на одну CH_2 -группу) алкилборных кислот в активном центре липазы для гомогенной и гетерогенной систем (-700 и -900 кал/моль соответственно) находится в обычных пределах колебаний инкремента гидрофобного взаимодействия.

2. Топография активного центра липазы

Анализ зависимости ингибирующего действия алкилборных кислот от величины углеводородного радикала (рис. 2, 1) позволяет сделать ряд заключений о топографии активного центра рассматриваемого фермента. Для сравнения на рис. 2 приведены соответствующие зависимости для α -химотрипсина (кривая 3) [10] и панкреатической липазы (кривая 4) [14].

С увеличением длины цепи от трех до девяти метиленовых звеньев свободная энергия связывания линейно возрастает с инкрементом $\Delta\Delta F_{асс} = -700$ кал/моль. Следовательно, в активный центр липазы входит гидрофобный участок длиной не менее семи метиленовых звеньев. Точки, отвечающие константам неконкурентного ингибирования борной и этилборной кислотой, не попадают на этот линейный участок. Сравнивая кривые 1 и

3, можно отметить не только сходство, но и определенные различия в структуре активных центров липазы и α -химотрипсина. Оба фермента в равной мере ингибируются борной и этилборной кислотами. Это свидетельствует о том, что их гидрофобные связывающие участки удалены от каталитического центра на расстояние около двух метиленовых звеньев. В ряду алкилборных кислот, содержащих от трех до шести метиленовых групп, с обоими ферментами наблюдается такое увеличение ΔF_{acc} (инкремент около -700 кал/моль), какое характерно для чисто гидрофобного взаимодействия. Однако при цепи, включающей свыше шести углеродных атомов, в связывании ингибиторов липазой и α -химотрипсином наблюдаются резкие различия. Это естественно объяснить тем, что гидрофобный сорбционный участок в молекуле α -химотрипсина по длине не превышает три метиленовых звена, в то время как у липазы он характеризуется гораздо большей протяженностью. При сравнении липазы из чернушки дамасской и панкреатической липазы (рис. 2, 1, 4) можно отметить следующее: 1) при переходе от борной к этилборной кислоте свободная энергия ассоциации изменяется почти на 4 ккал/моль в случае панкреатической липазы, тогда как с липазой из чернушки дамасской она практически не меняется; 2) для гомологов $C_4 - C_8$ кривые идут почти параллельно с постоянным инкрементом около -700 кал/моль на одну CH_2 -группу. Таким образом, активные центры этих липаз значительно различаются в области, прилегающей к каталитическому участку: если у панкреатической липазы гидрофобный сорбционный участок непосредственно примыкает к каталитическому, то в липазе из чернушки дамасской эти участки пространственно разделены. Общими для данных липаз являются значительная протяженность и непрерывность гидрофобного участка связывания.

Приведенные результаты показывают, что фермент из чернушки дамасской по строению своего активного центра занимает промежуточное положение между «типичной» протеиназой (α -химотрипсином) и «типичной» липазой (панкреатической).

3. Выявление особенностей гидрофобного связывающего участка липазы из чернушки дамасской

Более подробную информацию о структуре гидрофобного связывающего участка белка можно получить, изучая взаимодействие с ним объемистого ароматического остатка. При ингибировании липазы аралкилборными кислотами зависимость ΔF_{acc} от n нелинейна как в гомогенной, так и в гетерогенной системе (рис. 3, 1, 2). Это можно объяснить тем, что в гидрофобной полости белка имеются стерические препятствия для связывания аралкильного радикала. При переходе от фенильного к фенилэтильному остатку эффективность связывания его липазой в гомогенной системе несколько снижается (инкремент $\Delta F_{acc} = 110$ кал/моль). Дальнейшее увеличение длины цепи приводит к некоторому улучшению связывания. Сходная зависимость была получена ранее для панкреатической липазы (рис. 3, 4) [14]. Из сопоставления кривых 1 и 4 следует, что стерические препятствия в сорбционном участке липазы из чернушки дамасской менее резко выражены, но более протяженны, чем у панкреатической липазы [14]. Это положение можно иллюстрировать, сравнивая энергию связывания фенильных остатков различных аралкилборных кислот. Вклады фенильных групп в связывание были рассчитаны по данным табл. 1 и 2 и работ [11] и [14], исходя из предположения об аддитивности энергий связывания фенильной группы и остальной части молекулы ингибитора. Таким образом, приведенные в табл. 3 значения энергий взаимодействия фенильного радикала с ферментом представляют собой разность энергий связывания соответствующих аралкилборных и алкилборных кислот.

Из этих данных следует, что для α -химотрипсина энергия связывания фенильного остатка максимальна у фенилэтилборной кислоты, аналога специфического субстрата этого фермента (рис. 3, 3). В опытах с панкреатической липазой наилучшее связывание фенильного радикала наблюдается у фенилборной кислоты. У ее гомологов фенильный остаток попадает

Энергия связывания аракилборных кислот в активном центре липазы из чернушки дамасской, α -химотрипсина [11] и панкреатической липазы [14]

Ингибитор или его фрагменты	— $\Delta F_{асс}$, ккал/моль		
	Липаза из чернушки дамасской	α -Химотрипсин	Панкреатическая липаза
$C_6H_5V(OH)_2$	3,50	3,93	7,14
$V(OH)_2$	1,36	1,36	1,36
C_6H_5	2,14	2,57	5,78
$C_6H_5(CH_2)_2V(OH)_2$	3,25	5,51	6,24
$(CH_2)_2V(OH)_2$	1,55	1,57	4,88
C_6H_5	1,70	3,94	1,36
$C_6H_5(CH_2)_3V(OH)_2$	3,92	5,06	6,54
$(CH_2)_3V(OH)_2$	1,89	1,63	5,76
C_6H_5	2,03	3,43	0,78
$C_6H_5(CH_2)_4V(OH)_2$	4,30	4,80	8,30
$(CH_2)_4V(OH)_2$	2,40	2,18	6,05
C_6H_5	1,90	2,62	2,25

в область стерических препятствий, которые проявляются особенно сильно при связывании фенилпропилборной кислоты, а с фенилбутилборной кислотой несколько ослабевают, хотя и не устраняются полностью. Для липазы из чернушки дамасской влияние стерических препятствий примерно одинаково на всем протяжении связывающего участка. Можно представить поэтому, что в активном центре этого фермента сорбционный и каталитический участки пространственно разделены и на всем протяжении сорбционного участка существуют некоторые стерические препятствия для связывания фенильного остатка. Эти препятствия можно представить, например, в виде плавного изгиба гидрофобной щели в молекуле фермента.

Экспериментальная часть

В работе использован коммерческий лиофилизированный препарат липазы, выделенный из растительного сырья по методике Рудюк и Корчагиной [1—3]. Методом ТСХ на пластинках Silufol (ЧССР) [19] показано наличие в препарате трех типов липидов, общее содержание которых равно 39%. Для освобождения препарата от липидов его обрабатывали системой органических растворителей по методике, разработанной ранее для панкреатической липазы [20]. Делипидизированный порошок не содержал, по спектрофотометрическим данным [21], связанных с белком липидов, которые мешают кинетическим исследованиям. Балластные белки отделены последующей четырехстадийной очисткой (табл. 4). Очищенный препарат, пригодный для физико-химических исследований, был охарактеризован как белок с молекулярной массой $7 \cdot 10^4$, гомогенный по данным гель-фильтрации, по разделяемый изофокусированием в амфолинах на две ферментативно-активные фракции, являющиеся, по-видимому, изоферментами липазы. В ходе выделения фермента его активность определялась в трибутириновых единицах (ТБЕ) с использованием методики, описанной в работе [22]. Активность липазы максимальна при $pH \approx 8,5$ (по трибутирину).

n-Нитрофенлацетат («Семарол», ЧССР) использовали без дополнительной очистки; трибутирин марки ч. очищали перегонкой в вакууме (т. кип. $190^\circ C/15$ мм рт. ст.). Алкилборные кислоты $H(CH_2)_nV(OH)_2$, аракилборные кислоты $C_6H_5(CH_2)_mV(OH)_2$ ($n=2-9$; $m=2-4$) синтезировали по методикам, приведенным в работе [10]. Борную и фенилборную кислоты марки х. ч. использовали без дополнительной очистки. Триоксиметиленамипометан дважды перекристаллизовали из 70% этанола. Остальные реактивы использовали без дополнительной очистки.

Кинетические измерения в гомогенной системе проводили, как указано в работе [14], при $37^\circ C$. В стеклянной кювете смешивали 0,6 мл 0,1 М

Очистка липазы из чернушки дамасской

Стадия	Удельная активность, ТБЕ/мг	Выход, %	Кратность очистки
Экстракция делипидизованного порошка 0,1 М боратым буфером (рН 9)	6,3	100	1
Гель-фильтрация на сефадексе G-200 (1,7×48 см, рН 9)	13,7	86	2,2
Двукратный диализ против 400 мл 5 мМ трис-НСl-буфера (рН 8)	13,7	86	2,2
Хроматография на DEAE-целлюлозе при 0→1 М-градиенте концентрации NaCl (1,5×15 см, рН 8)	32,3	34	5,1

трис-НСl-буфера (рН 7,5), 0,6 мл воды, 0,1 мл раствора липазы (13 ТБЕ/мл), 0,1 мл раствора ингибитора в этаноле и 0,1 мл раствора *n*-нитрофенилацетата в этаноле. Скорость реакции определяли по возрастанию поглощения при 400 нм при измерении против раствора, содержащего все компоненты, кроме липазы. Борную и этилборную кислоты вносили в виде водного раствора.

Ферментативный гидролиз в гетерогенной системе. 50 мкл трибутирина эмульгировали в 25 мл 0,2 М NaCl в течение 1 мин с помощью ультразвукового генератора УЗДН-1 У 4,2 (44 кГц). Полученную эмульсию быстро разбавляли 0,2 М NaCl до пужной концентрации. К 1 мл эмульсии субстрата в 0,2 М NaCl добавляли 0,79 мл воды, 0,2 мл раствора ингибитора в этаноле, подщелачивали до рН 8,0 и титровали выделяющуюся масляную кислоту 5 мМ NaOH в режиме рН-статирования с помощью автотитратора «Radiometer ТТТ60с/АВU-1» (Дания). После определения скорости спонтанного гидролиза добавляли 10 мкл раствора фермента (22 ТБЕ/мл). За скорость липолиза принимали разность скоростей после и до прибавления фермента.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Вычисление константы ингибирования в двухфазной системе

Если равновесие связывания ингибитора определяется его концентрацией в водной фазе, истинная константа ингибирования описывается уравнением

$$K_i' = \frac{K_m}{K_m + [S]_0} \cdot [I]_{50} \quad (I)$$

Распределение ингибитора между водной и органической фазами описывается уравнением

$$[I]_{50} = [I]_{50}(1 + \alpha Q), \quad (II)$$

где α — коэффициент распределения, Q — отношение объемов органической и водной фаз ($Q \ll 1$).

Комбинируя уравнения (1), (I) и (II), получаем соотношение, связывающее кажущееся и истинное значение константы ингибирования:

$$K_i = K_i'(1 + \alpha Q)^{-1}. \quad (3)$$

При $Q = 10^{-3}$ (условия эксперимента) различия между K_i' и K_i становятся ощутимыми при $\alpha > 10^2$. Величина α описывается уравнением

$$\alpha = 10^\pi \quad [18], \quad (III)$$

где константа гидрофобности алкилборных кислот, π , определяется суммой вкладов отдельных фрагментов молекулы:

$$\pi = n \cdot \pi_{CH_2} + \pi_{B(OH)_2}. \quad (IV)$$

Для арилборных кислот $\pi_{B(OH)_2} = -0,55$. Так как замена арильного остатка на алкильный обычно приводит к уменьшению значения π на $\sim 0,5$ [23], принимаем для алкилборных кислот $\pi = -1,1$ и, поскольку $\pi_{CH_2} = 0,5$,

$$\pi = 0,5n - 1,1. \quad (V)$$

Из уравнений (III) и (V) следует, что в ряду алкилборных кислот коэффициент распределения α становится большим 10^2 при $n \geq 4$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корчагина Л. Н., Рудюк В. Ф., Чернобай В. Г. Растительн. ресурсы, 1973, т. 9, № 4, с. 577-581.
2. Рудюк В. Ф., Корчагина Л. Н. Прикладн. биохим. и микробиол., 1975, т. 11, № 3, с. 443-446.
3. Корчагина Л. Н., Рудюк В. Ф. Химия природн. соедин., 1975, т. 5, с. 645-648.
4. Любецкая Ж. А., Рудюк В. Ф., Миролубская С. В., Маслова Н. Ф. Хим.-фармацевт. ж., 1979, т. 13, № 9, с. 23-27.
5. Desnuelle P. In: Enzymes / Ed. Boyer P. D. New York - London: Acad. Press, 1972, v. 7, p. 545-616.
6. Брокерхофф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978, с. 61-66.
7. Антонов В. К., Гинопдман Л. М., Ротанова Т. В., Нуцубидзе Н. Н. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 276-277.
8. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. Докл. АН СССР, 1968, т. 183, № 6, с. 1435-1438.
9. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. FEBS Lett., 1970, v. 7, № 1, p. 23-25.
10. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 4, с. 558-569.
11. Antonov V. K., Ivanina T. V., Ivanova A. G., Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. FEBS Lett., 1972, v. 20, p. 37-40.
12. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjieva A., Blagov B. Int. J. Peptide Protein Res., 1976, v. 8, p. 225-231.
13. Шаядас В.-Ю. К., Класов А. А., Березин И. В., Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинопдман Л. М., Антонов В. К. Тез. III Всес. симпоз. «Структура и функции активных центров ферментов». М.: Наука, 1976, с. 25.
14. Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинопдман Л. М., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 837-845.
15. Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинопдман Л. М., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 694-698.
16. Яра Я. М., Спзэк М. А., Лангель Ю. А., Ротанова Т. В. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1364-1371.
17. Диксон М., Узбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1966, с. 289-293.
18. Leo A., Hansch C., Elkins D. Chem. Revs., 1971, v. 71, p. 525-616.
19. Кейрс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 156.
20. Verger R., de Haas G. H., Sarda L., Desnuelle P. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 188, p. 272-282.
21. Tsur R., Shapiro B. J. Lipid Res., 1964, v. 5, № 5, p. 542-547.
22. Ажаров В. Х., Нуцубидзе Н. Н., Ротанова Т. В. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 4, с. 600-613.
23. Hansch C., Leo A. J. In: Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. N. Y.: John Wiley & Sons Inc., 1979, p. 49.

Поступила в редакцию
16.XII.1981

STUDIES ON THE ACTIVE SITE TOPOGRAPHY OF LIPASE FROM *NIGELLA DAMASCENA* L.

GMOSHINSKY E. V., YAMPOLSKAYA G. P., ROTANOVA T. V.,
GINODMAN L. M.

*Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR:
M. V. Lomonosov State University, Moscow; M. M. Shemyakin Institute
of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Organoboronic acids of the general formula $H(CH_2)_nB(OH)_2$ ($n=2-9$) and $C_6H_5(CH_2)_mB(OH)_2$ ($m=0, 2, 3, 4$) were shown to inhibit the hydrolysis of tributyrin and *p*-nitrophenylacetate catalyzed by the lipase from *Nigella damascena* L. From the analysis of dependence of inhibitory constants on the size and structure of the inhibitor hydrocarbon chain, it was suggested that the sorption and catalytic subsites are separated in the enzyme active center; the sorption subsite appears to extend no less than 7 methylene units and at all its length binding of the phenyl residue is hindered.