

## Кинетические свойства каталазы *Penicillium vitale*. Каталазная реакция фермента

Л. В. Гудкова, Н. В. Латышко, О. А. Гудкова

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины  
Ул. Леонтовича, 9, Киев, 01030, Украина

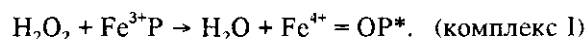
*Исследована кинетика быстрой фазы каталазной реакции каталазы *P. vitale* методом «остановленной струи». Определены предстационарные кинетические константы скорости образования ферментно-субстратного комплекса, его самопроизвольной диссоциации и диссоциации с образованием продукта, составляющие соответственно  $0,614 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ;  $1,78 \text{ c}^{-1}$  и  $1,85 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  при температуре 25 °C.*

**Введение.** Фермент каталаза ( $\text{H}_2\text{O}_2$ : $\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) играет ключевую роль в защите клетки от перекиси водорода, катализируя расщепление перекиси в каталазной либо пероксидазной реакции. При этом молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$ , реагируя с нативным ферментом, образует спектрофотометрически детектируемое промежуточное соединение комплекс I (CI).

Предыдущие работы, посвященные изучению кинетических свойств каталазы *P. vitale* (CPV) методом стационарной кинетики [1, 2], оставили много нерешенных вопросов в понимании механизма действия фермента.

В представленном сообщении продолжено исследование фермента методом быстрой кинетики, который дает возможность регистрировать реакцию в момент смешивания фермента и субстрата и, таким образом, позволяет следить за образованием короткоживущих промежуточных комплексов, формирующихся в ходе реакции. Регистрирование быстрых кинетических процессов основано на уменьшении поглощения в области полосы Soret при образовании CI [3]. Это соединение является общим промежуточным соединением в биологическом действии как каталаз, так и других содержащих гем ферментов [3—6, 8]. Поскольку биологические функции гемопротейдов различны, возникло предположение о том, что они могут быть связаны с отличием в электронной структуре первичного комплекса. В настоящее время единого

мнения по этому поводу не существует. Исследуя этот вопрос, ученые пришли к противоположным выводам [3, 4, 6]. При этом разными авторами различными спектроскопическими методами показано, что при образовании CI перекись водорода забирает два электрона у фермента, образуя  $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$  оксоферри центр и порфириновый радикал (P\*) [3, 7]:



Ключевая характеристика оптического спектра CI — снижение интенсивности полосы Soret — является, главным образом, следствием  $\pi$ - $\pi^*$ -переходов порфирина, а также переноса заряда (с Fe на порфирин и обратно, и с лиганда на порфирин). На основании этого длину волны 404 нм — полосу Soret — мы использовали для кинетических исследований.

**Материалы и методы.** В настоящей работе использовали гомогенные препараты каталазы *P. vitale* (RZ 403/280-1,015) с удельной активностью 20000 Ед/мг. Оптическую плотность ферментных растворов измеряли на спектрофотометре Beckman DU-8B («Beckman», США) и концентрацию каталазы рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{280} = 2,98 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [1]. Растворы перекиси водорода необходимой концентрации готовили из пергидроля фирмы «Reanal», (Венгрия), ч. д. а., непосредственно перед опытом, устанавливая их концентрацию йодометрическим

титрованием, а также используя  $\varepsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [9]. Стандартным для всех измерений являлся 0,05 М К-На-фосфатный буфер, pH 7,5. Спектры нативной каталазы ( $7,42 \cdot 10^{-7}$  М) и фермента в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1,68 \cdot 10^{-4}$  и  $1,68 \cdot 10^{-2}$  М), трет-бутилперекиси ( $10^{-4}$  М) и феррицианида калия  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  ( $3,19 \cdot 10^{-2}$  М) регистрировали на спектрофотометре фирмы «Hitachi» 150-20 (Япония) при длинах волн 200—750 нм и скорости сканирования 800 нм/мин (приведены конечные концентрации реагентов).

Кинетические эксперименты проводили при условиях псевдопервого порядка ( $[\text{S}] > [\text{CVP}]$ ) на установке «остановленной струи» Union Giken RA-401 (Япония), соединенной с микрокомпьютером: мертвое время прибора ~3 мс, время смешивания реагентов — 10—15 мс. Для отсеечения этого начального промежутка времени устанавливали задержку на период 13—18 мс. Резервуары для реагентов, миксер и измерительную ячейку термостатировали при температуре 25 °С. Ферментные препараты готовили в виде растворов с концентрацией 0,4—0,6 мкМ в буфере при указанном pH. Субстрат ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) готовили в виде исходных растворов с концентрацией 0,178 или 1,78 мМ в том же буфере. Оба раствора инъецировали одновременно и формирование комплекса регистрировали по изменению оптического поглощения при 404 нм. Длина оптического пути в измерительной ячейке составляла 10 мм.

Анализ полученных кинетических данных осуществляли с помощью компьютерной программы установки. Константы скорости псевдопервого порядка ( $k_{\text{obs}}$ ), представляющие собой средние значения из 7—13 инъекций, использовали в дальнейшем для вычисления истинных констант элементарных стадий ферментативной реакции. При расчете применяли метод линейного регрессионного анализа.

**Результаты и обсуждение.** При разных условиях реакции каталаза формирует три основных перекисных соединения. Установлено, что одно из них, СI, является высокоактивным реакционным соединением, образующимся на первом этапе как каталазной, так и пероксидазной реакции фермента. Было показано, что при образовании первичного комплекса имеет место перенос атома кислорода от гидроперекиси путем гетеролитического расщепления O—O связи (уравнение 1). Гомолитический разрыв O—O связи приводит к формированию Комплекса II — СII ( $\text{Por Fe(IV) = O}$ ) (уравнение 2).

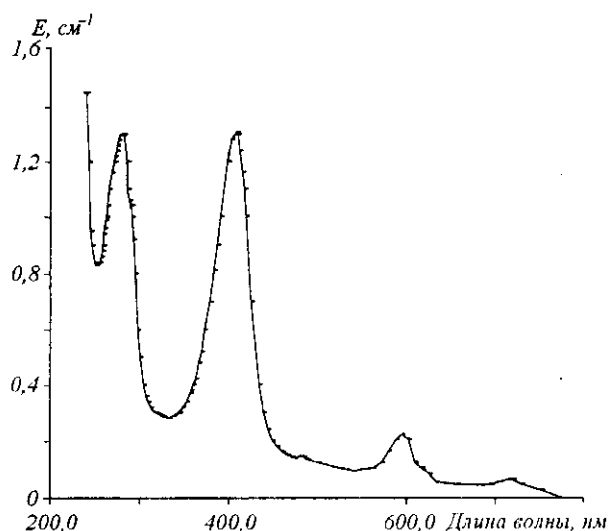
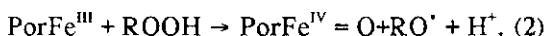
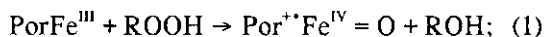


Рис. 1. Спектр абсорбции каталазы *P. vitale*

Образование СII является обязательным условием протекания пероксидазной реакции фермента. В отношении образования и активности вторичного комплекса в каталазной реакции существуют различные мнения. Его образование наблюдается либо в комплексных системах, включающих аутоокисление, либо в присутствии алкилперекисей [10, 11]. Кроме того, формирование СII в случае добавления раствора перекиси наблюдалось при очень кислых условиях или в присутствии феррицианида К [12]. Образование СII сопровождается изменением оптической плотности при 565 нм.

СII реагирует со следующей молекулой перекиси водорода, образуя неактивный СIII, характеризующийся полосами абсорбции при 584 и 545 нм. Установлено, что фактор времени так же, как и концентрация перекиси водорода, при возникновении СII и неактивного СIII играют решающую роль. Использование быстрых кинетических методов (например, метода «остановленной струи») и концентраций перекиси водорода, не превышающих определенного уровня, позволяет регистрировать первичный комплекс до возникновения неактивных ассоциатов.

**Спектральные свойства.** CPV в нативном состоянии характеризуется типичным высокоспиновым ферригемовым спектром с сильной полосой Соре при 404—405 нм и серией полос меньшей интенсивности при 480, 590 и 710 нм (рис. 1). В связи с тем, что формирование всех каталазно-перекисных комплексов сопровождается заметным изменением спектра абсорбции в видимой области,

Таблица 1

Влияние состава реакционной среды на спектральные свойства каталазы *P. vitale* (CPV)

Реакционная среда	Абсорбция, см <sup>-1</sup>			
	λ <sub>max</sub> , нм			
	404	480	586	710
CPV [7,42 · 10 <sup>-7</sup> М]	0,187	0,001	0,019	—
CPV [7,42 · 10 <sup>-7</sup> М] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [10 <sup>-4</sup> М]	0,142	0,001	0,010	—
CPV [7,42 · 10 <sup>-7</sup> М] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [10 <sup>-2</sup> М]	0,107	0,001	0,003	—
CPV [7,42 · 10 <sup>-7</sup> М] + третбутилперекись [10 <sup>-4</sup> М]	0,172	0,011	0,025	0,0075
CPV [7,42 · 10 <sup>-7</sup> М] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [10 <sup>-2</sup> М] + K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> [10 <sup>-2</sup> М]	0,118	0,001	0,011	—

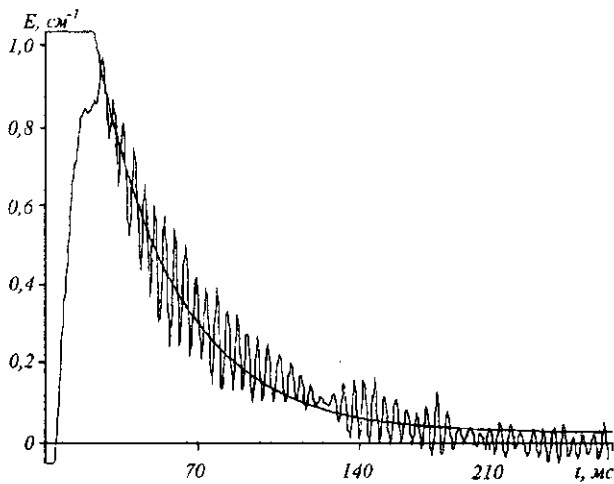


Рис. 2. Типичная кинетическая кривая снижения абсорбции при 404 нм во время формирования комплекса I (CI)

предварительно изучали спектр абсорбции CPV при реакции фермента с перекисью водорода методом сканирующей спектроскопии. Установлено, что прибавление к раствору каталазы ( $7,42 \cdot 10^{-7}$  М) значительного избытка перекиси ( $1,68 \cdot 10^{-4}$  и  $1,68 \cdot 10^{-2}$  М) вызывало быстрое снижение интенсивности полосы Sore и небольшой ее сдвиг в коротковолновую область, что свидетельствовало об образовании CI (снижалась также интенсивность пика при 587 нм) (табл. 1).

Образования CII и CIII в реакции CPV с перекисью водорода и с третбутилперекисью нами не зарегистрировано (в последнем случае возрастала интенсивность светопоглощения при тех же длинах волн, что и у нативного фермента, но появления новых максимумов не наблюдалось). Поскольку на образование CII оказывает значи-

тельное влияние присутствие в среде различных донаторов водорода, мы регистрировали спектр фермента в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> после добавления феррицианида калия, который, как известно, способствует восстановлению CI в CII и стабилизирует образованный комплекс. Однако прибавление феррицианида K в концентрации 10<sup>-2</sup> М к каталазно-перекисной системе (концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10<sup>-2</sup> М) вызывало лишь незначительное возрастание абсорбции при 404 нм по сравнению с величиной светопоглощения при реакции фермента с перекисью водорода такой же концентрации. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при изученных концентрационных соотношениях реагентов образуется CI и не происходит формирования неактивных ассоциатов. Проанализировав полученные спектральные характеристики реакции CPV, мы избрали длину волны 404 нм для изучения предстационарной кинетики фермента в условиях протекания каталазной реакции (использовали только один субстрат — перекись водорода).

**Скорость образования CI.** Предстационарные кинетические измерения осуществляли, регистрируя скорость образования CI при реакции CPV с перекисью водорода при 404 нм методом «остановленной струи». Перекись водорода добавляли в избытке ( $[S](20-200) \cdot [CPV]$ ), что обеспечивало псевдопервый порядок реакции. Типичная запись кинетической кривой снижения абсорбции при 404 нм с соответствующей ей экспонентой показаны на рис. 2. На рис. 3, а, представлена кривая зависимости наблюдаемой скорости псевдопервого порядка от концентрации субстрата. В широком диапазоне использованных в эксперименте концентраций перекиси водорода 2,5—75 мкМ (20—250-кратного ее избытка) скорость ассоциации CPV с субстратом возрастала пропорционально увеличению концентрации перекиси. В указанном диапазо-

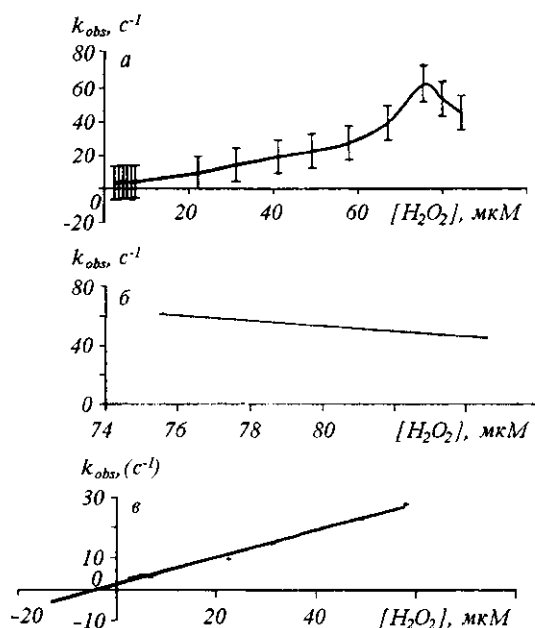


Рис. 3. Зависимость константы псевдопервого порядка скорости формирования комплекса I на ферментативных стадиях каталазной реакции каталазы *P. vitale* (CPV) от концентрации  $H_2O_2$ : а —  $[H_2O_2] = (2,5-85) \cdot 10^{-6}$  М; б —  $[H_2O_2] = (75-85) \cdot 10^{-6}$  М; в —  $[H_2O_2] = (2,5-75) \cdot 10^{-6}$  М ( $k_{obs} = 0,4213 [H_2O_2] + 1,642$ )

Таблица 2  
Сравнение каталитических свойств каталаз из разных источников

Константа скорости	Источник каталазы	Литература
$k_1 = 4,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Эритроциты	[14]
$k_2 = 6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ( $k_2/k_1 = 1,33$ )	лошади	
$k_1 = 0,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Эритроциты	[10]
	лошади	
$k_1 = 5,9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	<i>Rhodopseudomonas</i>	[15]
$k_2 = 1,9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ( $k_2/k_1 = 1,32$ )	<i>spheroides</i>	
$k_1 = 1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Печень крыс	[16]
$k_2 = 2,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ( $k_2/k_1 = 1,5$ )		
$k_1 = 3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Печень лошади	[17]
$k_{-1} = 2 \cdot 10^{-2} \text{ c}^{-1}$		
$k_1 = 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Печень быка	[18]
$k_2 = 5,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ( $k_2/k_1 = 1,87$ )		
$k_1 = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	<i>Phanerochaete</i>	[19]
	<i>chryso sporium</i>	
$k_1 = 0,614 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	<i>Penicillium</i>	Наши
$k_2 = 1,85 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ( $k_2/k_1 = 3,01$ )	<i>vitale</i>	дан-
$k_{-1} = 1,78 \cdot 10^{-2} \text{ c}^{-1}$		ные

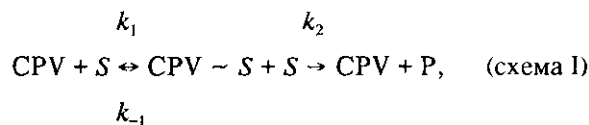
не концентраций субстрата кривая проходит близко к нулю, показывая, что образование CI было практически необратимо. Константа скорости второго порядка, найденная из наклона этого участка кривой, составляет  $0,614 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . При более высоких концентрациях субстрата (250-кратного избытка  $H_2O_2$ ) скорость распада комплекса с образованием свободного фермента и продукта преобладает над скоростью его ассоциации. Линейная зависимость позволила определить из наклона данного (75—85 мкМ  $H_2O_2$ ) участка кривой  $k_2$  бимолекулярную константу скорости диссоциации комплекса, составляющую  $1,85 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Величина данной константы и соотношение  $k_2/k_1 = 3,01$  не искажают общей картины и близки к реальности (рис. 3, б). Однако, если вернуться к первому из указанных отрезков кривой (2,5—75 мкМ), можно выделить два линейных участка, характеризующихся разной скоростью — при концентрациях  $H_2O_2$  2,5—50 и 50—75 мкМ. Расчет методом линейного регрессионного анализа тангенсов углов наклона данных линейных участков кривой давал константы скорости  $0,41 \cdot 10^6$  и  $1,45 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  соответственно, что практически отвечает величине константы, найденной при анализе всего указанного отрезка. Помимо этого, для отрезка кривой 2,5—50 мкМ  $H_2O_2$  при экстраполяции  $k_{obs}$  к нулевой концентрации субстрата было найдено значение константы скорости самопроизвольной диссоциации комплекса, равное  $1,78 \text{ c}^{-1}$ . Константы скорости  $k_1$  и  $k_{-1}$ , рассчитанные для этого участка (рис. 3, в), соответствуют уравнению [13]:

$$k_{obs} = k_1 [S] + k_{-1},$$

где  $k_1$  и  $k_{-1}$  являются соответственно константами скорости связывания фермента с субстратом и самопроизвольной диссоциации ферментно-субстратного комплекса.

Полученные константы близки по величине соответствующим константам, полученным некоторыми другими авторами для каталаз из разных источников (табл. 2).

Для анализа полученных результатов мы использовали модель механизма, основанную на следующей реакционной схеме:



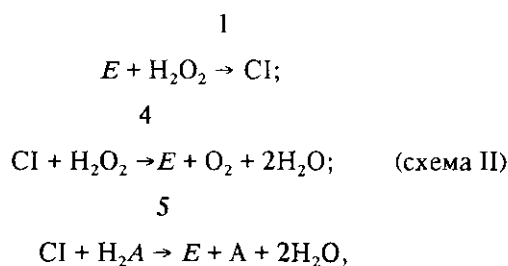
в которой CPV представляет каталазу *P. vitale*; S —  $H_2O_2$ ; CPV~S — CI.

При взаимодействии CPV и  $H_2O_2$  быстро обра-

зуется CI в практически необратимой реакции, после чего следует необратимое расщепление  $H_2O_2$  с образованием воды и кислорода. Эту основную схему использовали ранее авторы [14] и позже — в работе [18] при анализе данных предстационарной кинетики образования каталазных комплексов. Она получила название «пероксидазного» механизма каталазной реакции.

«Пероксидазный» механизм каталазной реакции предполагает образование из всех известных ферментно-субстратных комплексов только CI, а также идентичность протекания второго этапа реакции как по каталазному, так и пероксидазному типам действия фермента. Только в случае каталазного типа реакции на втором этапе донатором водорода служит вторая молекула  $H_2O_2$ , а в случае пероксидазного — любой другой донатор водорода, только не  $H_2O_2$ .

«Пероксидазный» механизм действия каталазы [10]:



где  $E$  — каталаза;  $H_2A$  — донатор водорода; 1, 4, 5 — соответствующие константы скорости.

Единого универсального механизма, описывающего действие каталаз, не существует. К настоящему времени предложено несколько механизмов каталитического действия фермента [20]. Все они, за исключением «пероксидазного» механизма, предполагают участие в реакциях помимо CI нескольких ферментно-субстратных комплексов. Результаты наших исследований, свидетельствующие об образовании в ходе каталазной реакции CPV только первичного комплекса, а также тот факт, что полученные нами константы скорости согласуются по величине с константами, полученными авторами [18] для каталазы печени быка (BLC)  $k_1 = (3,0 \pm 0,2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ;  $k_2 = (5,6 \pm 0,3) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , позволяют нам предположить пероксидазный механизм реакции для CPV.

Таким образом, в результате изучения спектральных свойств и предстационарной кинетики каталазной реакции CPV показано, что фермент, как и в случае других гемопротеидов, реагирует с перекисью водорода, образуя CI.

Представлены данные, отражающие чрезвы-

чайно высокую скорость образования данного комплекса ( $k_1 = 0,614 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) в практически необратимой реакции ( $k_{-1} = 1,78 \text{ c}^{-1}$ ), а также предложена модель, объясняющая механизм действия фермента.

При использовании метода «остановленной струи» исследована скорость образования CI при разных концентрациях субстрата ( $H_2O_2$ ). Анализ этих результатов позволил определить значение  $k_{\text{obs}}$  — константы скорости первого порядка для каждой изучаемой концентрации  $H_2O_2$  и рассчитать константы индивидуальных стадий реакции. Полученные экспериментальные данные позволили: 1) составить простейшую схему, описывающую катализ расщепления  $H_2O_2$  в каталазной реакции; 2) определить значения индивидуальных констант скорости образования ферментно-субстратного комплекса, его самопроизвольной диссоциации и диссоциации с образованием продукта, они составили  $0,614 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ;  $1,78 \text{ c}^{-1}$  и  $1,85 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  соответственно. Эти результаты согласуются со стационарными константами, полученными в аналогичных условиях ранее, и свидетельствуют в пользу «пероксидазной» модели действия фермента, предложенной в работе [18] для BLC.

Сравнение первичных последовательностей аминокислот каталаз разного происхождения указывает на эволюционную нестабильность первичной структуры фермента — степень гомологии каталаз колеблется в большом диапазоне 29—96 % [21]. Наибольшая «степень родства» каталазы CPV наблюдается с каталазами животных (BLC) (45—47 %), а в относительно консервативных участках полипептидной цепи, где расположены аминокислоты, входящие в состав активного центра каталазы, она достигает 80 %. Каталитически важными аминокислотными остатками у CPV являются His-64, Ser-103 и Asn-137, а у BLC — His-74, Ser-103 и Asn-137. Каталитический механизм включает связывание субстрата в гидрофобной полости. Ключевую роль в связывании перекиси водорода играет гистидин.

Таким образом, сходство активных центров двух каталаз как по структуре, так и по наличию каталитически значимых аминокислотных остатков, а также сходство значений параметров, описывающих предстационарную и стационарную кинетику каталазы из *P. vitale* и печени быка, свидетельствуют в пользу того, что оба фермента, несмотря на структурные отличия молекулы, функционально эквивалентны и, следовательно, являются эволюционно конвергентными. Можно также сделать вывод о том, что для реализации одной и той же функции достаточно 30 % структурной

ГОМОЛОГИИ МОЛЕКУЛЫ ФЕРМЕНТА, ВАЖНО ТОЛЬКО, ЧТОБЫ ЭТА ГОМОЛОГИЯ БЫЛА СОСРЕДОТОЧЕНА В ОБЛАСТИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА.

L. V. Gudkova, N. V. Latyshko, O. A. Gudkova

Kinetic properties of the *Penicillium vitale* catalase. Catalytic reaction of the enzyme

Summary

The fast kinetics of the *P. vitale* catalase (CPV) catalytic reaction was investigated by the stop-flow technique. The transient-state rate constants of the intermediate complex (Compound I) formation as well as the rate of spontaneous dissociation and dissociation resulting in the reaction product creation were found at 25 °C to be  $0.614 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1.78 \text{ s}^{-1}$  and  $1.85 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively.

Л. В. Гудкова, Н. В. Латышко, О. О. Гудкова

Кінетичні властивості каталази *Penicillium vitale*. Каталазна реакція ферменту

Резюме

Вивчено кінетику швидкої фази каталазної реакції каталази *P. vitale* методом «зупиненого струменя». Визначено представницькі кінетичні константи швидкості утворення ферментно-субстратного комплексу, його спонтанної дисоціації та дисоціації з утворенням продукту, які складають відповідно  $0,614 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ;  $1,78 \text{ c}^{-1}$  і  $1,85 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  за температури 25 °C.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Латышко Н. В., Гудкова Л. В. Кинетические и каталитические свойства каталазы *Penicillium vitale* // Укр. биохим. журн.—1996.—68, № 2.—С. 69—73.
2. Латышко Н. В., Гудкова Л. В., Гудкова О. О. Каталитичні властивості каталази *Penicillium vitale*. Пероксидазна реакція ферменту // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 6.—С. 505—509.
3. Du P., Loew G. H. Theoretical study of model compound I complexes of horseradish peroxidase and catalase // Biophys. J.—1995.—68, N 1.—P. 69—80.
4. Adachi Sh., Nagano Sh. Roles of proximal ligands in heme proteins: replacement of proximal histidine of human myoglobin with cysteine and tyrosine by site-directed mutagenesis as models for P-450, chloroperoxidase, and catalase // Biochemistry.—1993.—32, N 1.—P. 241—252.
5. Dounce A. L., Sichak S. P. Hematin iron valence in catalase and peroxidase compound I: relationship to free radical reaction mechanism // Free Radical Biol. Med.—1988.—5.—P. 89—93.
6. Rodriguez M. M. J., Mercier D., van Huystee R. B., Stillman M. J. Analysis of the optical absorption and magnetic-circular-dichroism spectra of peanut peroxidase: electronic structure of a peroxidase with biochemical properties similar to those of horseradish peroxidase // Biochem. J.—1994.—301, N 2.—P. 335—341.
7. Bursley E. H., Poulos T. L. Two substrate binding sites in ascorbate peroxidase: the role of arginine 172 // Biochemistry.—2000.—39, N 25.—P. 7374—7379.
8. Palcic M. M., Dunford H. B. The reaction of human erythrocyte catalase with hydroperoxides to form compound I // J. Biol. Chem.—1980.—255, N 13.—P. 6128—6132.
9. Noble R. W., Gibson Q. H. The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide // J. Biol. Chem.—1970.—245, N 9.—P. 2409—2413.
10. Keilin D., Nicholls P. Reaction of catalase with hydrogen peroxide and hydrogen donors // Biochim. et biophys. acta.—1958.—29, N 2.—P. 302—307.
11. Oshino N., Chance B., Sies H. The properties of the secondary catalase-peroxide complex (compound II) in the hemoglobin-free perfused rat liver // Arch. Biochem. and Biophys.—1973.—159, N 2.—P. 704—711.
12. Nicholls P. The formation and catalytic role of catalase peroxide compound II // Biochim. et biophys. acta.—1964.—81, N 3.—P. 479—495.
13. Strickland S., Palmer G., Massey V. Determination of dissociation constants and specific rate constants of enzyme-substrate (or protein-ligand) interactions from rapid reaction kinetic data // J. Biol. Chem.—1975.—250, N 11.—P. 4048—4052.
14. Chance B., Greenstein D. S., Higgins J., Yang C. C. The mechanism of catalase action. II. Electric analog computer studies // Arch. Biochem. and Biophys.—1952.—37, N 2.—P. 322—339.
15. Clayton R. K. Purified catalase from *Rhodospseudomonas spheroides* // Biochim. et biophys. acta.—1959.—36, N 1.—P. 40—47.
16. Chance B., Oshino N. Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction // Biochem. J.—1971.—122, N 2.—P. 225—233.
17. Deisseroth A., Dounce A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role // Physiol. Rev.—1970.—50, N 3.—P. 313—375.
18. Zidoni E., Kremer M. L. Kinetics and mechanism of catalase action. Formation of the Intermediate Complex // Arch. Biochem. and Biophys.—1974.—161, N 2.—P. 658—664.
19. Wariishi H., Dunford H. B., Mac Donald I. D., Gold M. H. Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism // J. Biol. Chem.—1989.—264, N 6.—P. 3335—3340.
20. Jones P., Suggett A. The catalase-hydrogen peroxide system. A theoretical appraisal of the mechanism of catalase action // Biochem. J.—1968.—110, N 2.—P. 621—629.
21. Kozlov E. A., Levitina T. L., Bobrovskaya M. T., Gudkova L. V., Latyshko N. V., Radomskii N. F. The complete amino acid sequence of the catalase from *Penicillium vitale* // Rus. J. Bioorg. Chem.—1988.—24, N 3.—P. 145—151.

УДК 577.152.111:577.322.54  
Надійшла до редакції 04.07.01