

РОЛЬ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП В КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ I

Липаза I *Rhizopus oryzae* 1403 инактивировалась карбодиимидом (EDC) в присутствии нуклеофила – этилового эфира глицина. Кинетические исследования гидролиза триолеина и трибутирина показали, что V_{\max} мало отличались на обоих субстратах, а K_M на трибутирине увеличилось в 1,47, а на триолеине – в 1,18 раз. Это приводит к выводу, что карбоксильные группы отвечают за создание активной конформации фермента при связывании с субстратом.

Ключевые слова: липаза, *Rhizopus*, карбоксильные группы.

Липазы (КФ 3.1.1.3) катализируют гидролиз сложноэфирных связей в триацилглицеринах, а в микроводных условиях – реакции синтеза. Установлено, что большинство липолитических ферментов действуют как сериновые гидролазы с триадой Ser-Gis-Asp в активном центре [1–5]. Механизм гидролиза эфирной связи был в значительной степени выведен из структуры липазы *Rhizomucor miehei* и ее двух ковалентных комплексов с фосфорорганическими ингибиторами – диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом и *n*-гексил-этил-хлорофос-фонатом [6–8]. В настоящее время не вызывает сомнения, что нуклеофильная атака на карбонильный углерод эфирной связи осуществляется остатком серина, активизированным через сеть водородных связей гистидином и аспарагиновой кислотой. Имидазол гистидина действует как общий основной катализатор, чтобы удалить протон от гидроксильной группы серина. Важность карбоновой кислоты в каталитической триаде дебатировалась много лет. Изначально получила почти всеобщее признание гипотеза переноса заряда, согласно которой *e*-азот имидазола играет роль общего основания, чтобы облегчить атаку серина на субстрат, а роль Asp-CO₂⁻ состоит в удалении протона от *δ*-азота иона имидазола [9]. Впоследствии она была пересмотрена, так как с помощью метода ЯМР [10, 11], термодинамических расчетов [12, 13] и компьютерного моделирования [14] стало ясно, что полный перенос заряда неблагоприятен. Были сделаны предположения, что первичная роль карбоксильной группы – скорее в стабилизации требуемой конформации имидазола гистидина, а не общесосновного катализатора. Frey, Cleland & Kreevoy [15, 16] высказали гипотезу о формировании Asp-CO₂⁻ водо-

родной связи низкого барьера (low-barrier hydrogen bond – LBHB) с имидазолом гистидина в сериновых протеазах. Это основано на результатах протонного ЯМР для водорода амина каталитического гистидина. Они указывают, что он находится в очень устойчивом состоянии при наличии водородной связи и защищен от обмена с раствором. Однако каталитическая роль LBHB не является общепринятой. Так, Warshel & Parazyan [17] отклоняют роль LBHB в белках. Их вычисления с использованием эмпирической теории валентной связи показали, что переходные состояния, содержащие LBHB, менее устойчивы, чем ионная водородная связь Asp-His в растворе. Это показывает, что предстоит намного больше исследований LBHB.

В других работах Warshel et al. [18, 19] показали, что энергия реорганизации ориентирования полярных групп в активном центре фермента является небольшой относительно реакции в растворе, потому что диполи уже размещены надлежащим образом для взаимодействия с переходным состоянием. И они находят удовлетворительное объяснение эффективности сериновых эстераз в этой предорганизации.

Липолитический комплекс *Rhizopus oryzae* 1403 представляет большой практический интерес в области создания структурных триглицеридов с функциональными свойствами в связи с широкой субстратной и 1,3-позиционной специфичностью. При исследовании каталитических свойств одной изоформы липазы этого продуцента – Липазы I подтверждено наличие в ее активном центре гистидина и серина. Представляло интерес изучение значения карбоксильных групп в реакции гидролиза эфирной связи этим ферментом.

Методы исследования

В работе использовали изофермент липазы *Rhizopus oryzae* 1403, полученный фракционированием ацетоносажденного препарата с помощью гель-фильтрации на G-150 и последующей хроматографией на ДЕАЕ-52. Гомогенность фермента подтверждена повторной гель-фильтрацией и электрофорезом. Продуцент получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов; оливковое масло – Aceites Borges Pont (Испания); 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимидгидрохлорид (EDC) и этиловый эфир глицина – Sigma Chemical Co (США); другие реагенты отечественного производства марки х.ч.

Гидролитическую активность липазы определяли модифицированным методом Yamada и Machida [20]. Субстрат – оливковое масло. За единицу активности липазы принимали такое количество фермента, которое освобождает 1 ммоль жирной кислоты за 1 мин.

Для модификации фермент в количестве 10 мМ растворяли в 50 мМ растворе этилового эфира глицина. Значения рН устанавливали буферными растворами по Макилвэйну. Затем добавляли EDC в количестве 50 мМ. Через определенные промежутки времени отбирали аликваты реакционной смеси, разбавляли их 5-кратным количеством 1 М ацетата натрия и определяли остаточную активность и скорость гидролиза.

Модифицированный фермент осаждали 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Все примеси были удалены 5-кратным промыванием 5%-ным раствором ТХУ и абсолютным этанолом. Осадки высушивались в вакууме и подвергались аминокислотному анализу на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-339Т МИКРОТЕХНА (Чехия).

Для определения кинетических характеристик гидролиза регистрировали накопление свободных жирных кислот (СЖК) методом рН-стабирирования [21]; в качестве субстрата использован трибутирин. Начальную скорость рассчитывали по тангенсу угла наклона кинетических кривых [22]. Исследования проводились в диапазоне концентраций фермента от 10 до 150 мкг/см³, дающем прямолинейную зависимость от значений начальных скоростей.

Результаты и их обсуждение

Для исследования роли карбоксильных групп в действии Липазы I был использован

метод Hoare & Koshland, который предполагает реагирование белка с карбодиимидом, происходящее при конденсации с нуклеофилом [23].

В качестве ингибитора был взят EDC, а нуклеофила – этиловый эфир глицина. Установлено, что уменьшение скорости гидролиза трибутирина сильно зависело от концентрации водородных ионов. Соответствующие преобразования позволили определить рК группы (рис. 1), участвующей в катализе – 5,0, что согласуется со значением, полученным из зависимости (v, pH) – 5,3.

Известно, что карбодиимиды способны реагировать с другими аминокислотными остатками. Аминогруппу лизина можно исключить из-за ее высокого рК, который будет препятствовать реакции в условиях данного эксперимента. С тирозином и гистидином карбодиимиды образуют устойчивые к кислотному гидролизу соединения. Но аминокислотный анализ модифицированного фермента показал, что количество этих остатков не изменяется (табл. 1).

Если карбодиимиды реагируют с серином, как в случае с химотрипсином, то активность полностью восстанавливается гидроксиламинном. Добавление к инактивированной Липазе I NH₂OH не дало такого эффекта (рис. 2). Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что за инактивацию Липазы I EDC отвечают именно карбоксильные группы. Однако карбодиимиды могут вызывать образование внутримолекулярных связей, что также вызывает потерю активности ферментов. По этому вопросу в литературе имеются противоречивые сведения.

Так, модификация кутиназы EDC не зависела от присутствия нуклеофила [24]. Панкреатическая липаза человека, напротив, не ингибировалась без сложного эфира. Но при этом повреждалась структура фермента, так как скорость денатурации в 8 М мочеvine после модификации возрастала в 14 раз.

Таблица 1. Количество остатков гистидина, тирозина и цистеина в Липазе I при модификации EDC (рН 5,0)

Потеря активности, %	His	Tyr	Cys
0	2,11	3,38	1,13
51,2	2,03	3,41	1,11
74,1	1,97	3,35	1,10
91,6	2,10	3,37	1,09

Кроме того, активный центр титровался диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом, не экранировался субстратом, в связи с чем было поставлено под сомнение участие карбоксильной группы в системе с переносом заряда [23]. Проведенные нами исследования показали, что инактивации Липазы I без нуклеофила не наблюдалось, а предварительная инкубация с субстратом в значительной степени снижала ингибирование (рис. 3).

Данные изменения активности Липазы I и количества модифицированных карбоксильных групп, полученного по включению глицина, показаны на рис. 4. При практически полной потере активности в данном ферменте модифицировалось 11 карбоксильных групп.

При условии псевдопервого порядка реакции получаем, что для проявления активности необходимо не менее трех групп (рис. 5). По всей вероятности, карбоксильные группы необходимы для поддержания активной структуры. К настоящему времени с помощью моделирования молекулярной динамики кутиназы показано, что

водородная связь между Asp и His активного центра необходима для ее каталитического действия [26]. По данным, полученным в последние годы для липаз семейства *Rhizomucor miehei*, электростатические взаимодействия не только вблизи активного центра, но и удаленные от него значительно влияют на активность [27].

Для выяснения механизма действия EDC на липазу были определены кинетические параметры гидролиза трибутирина и триолеина (табл. 2).

У модифицированного фермента изменились оба параметра. При этом изменение значений V_{max} мало отличались на обоих субстратах, что свидетельствует об участии одного и того же активного центра в катализе. K_M на трибутирине увеличилось в 1,47, а на триолеине – в 1,18 раз. Соответственно в большей степени на трибутирине уменьшилась каталитическая эффективность – в 2,8 раз против 2,15 на триолеине. Это приводит к выводу, что карбоксильные группы отвечают за создание активной конформации фермента при связывании с определенным

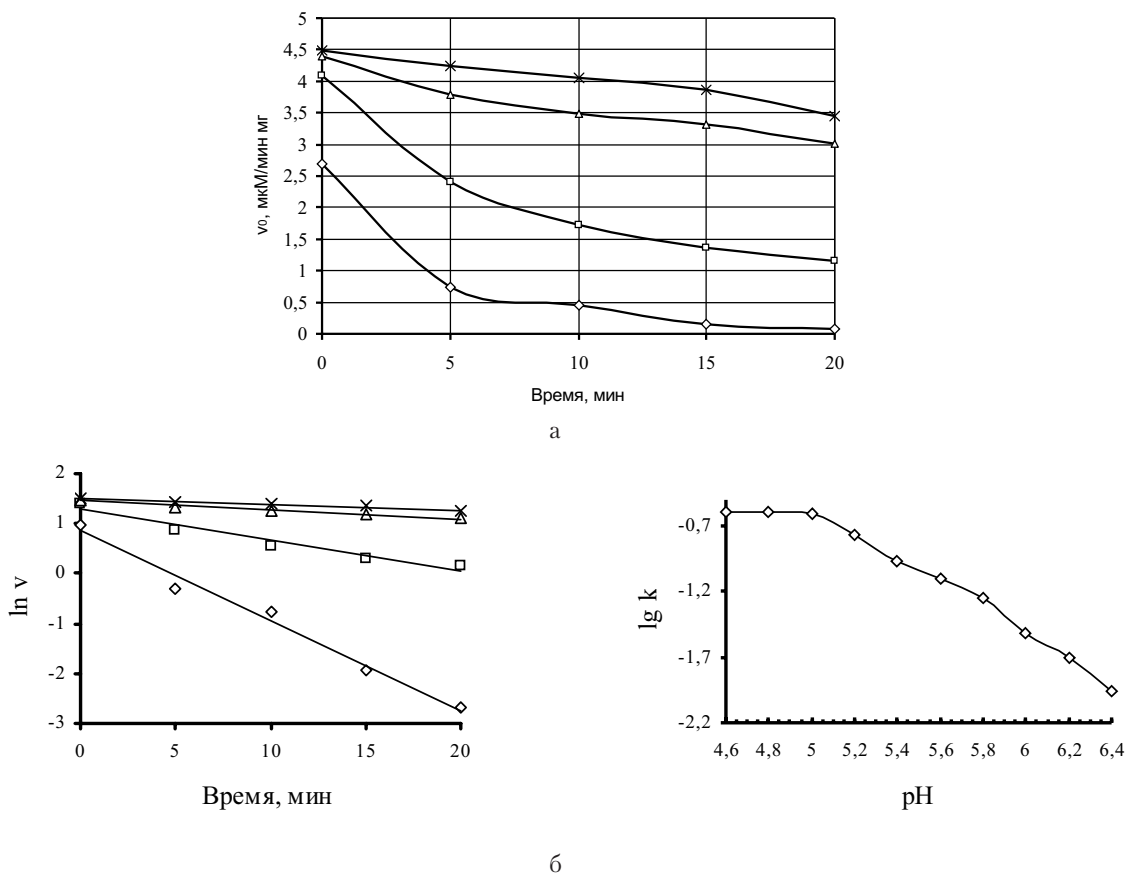


Рисунок 1. (а) Зависимость скорости гидролиза трибутирина Липазой I, модифицированной EDC при различных значениях pH: (x) 6,4; (Δ) 6,0; (□) 5,4; (◇) 4,6; (б) определение pK модифицированной группы

Таблица 2. Кинетические параметры гидролиза некоторых субстратов нативной и модифицированной Липазой I (pH 5,2)

Фермент	V_{max} , μ моль $мин^{-1}$ $мг^{-1}$	K_M , μ моль	(V_{max} / K_M) , $мин^{-1}$ $мг^{-1}$
Трибутирин			
Нативный	35,6	786	$45,3 \cdot 10^{-3}$
Модифицированный	18,6	1154	$16,1 \cdot 10^{-3}$
Триолеин			
Нативный	167,3	352	0,475
Модифицированный	92,9	417	0,223

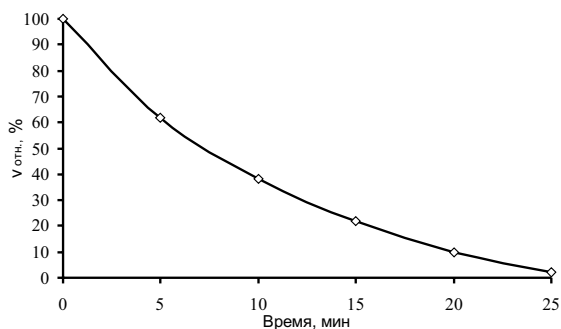


Рисунок 2. Влияние гидроксилamina на ход инактивации Липазы I EDC (pH 5,4)

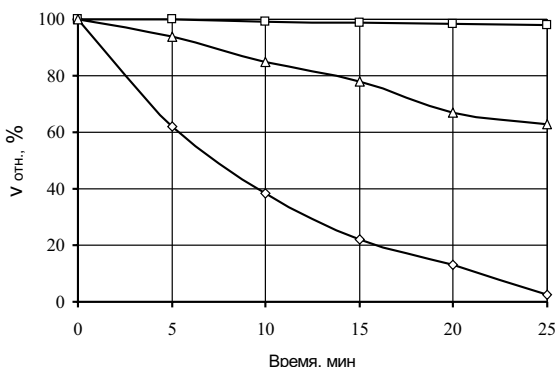


Рисунок 3. Ингибирование Липазы I EDC: (□) без эфира глицина; (Δ) с пред-инкубацией с субстратом; (◇) с эфиром глицина (pH 5,4)

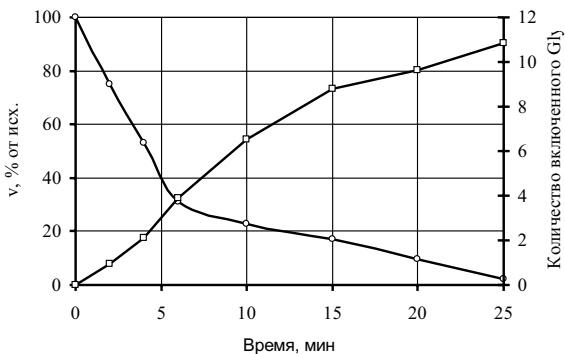


Рисунок 4. Определение количества модифицированных карбоксильных групп при инактивации Липазы I карбодимидом (pH 5,0)

субстратом. Это согласуется с данными мутагенеза липазы *Staphilococcus hyicus* и липазы/ацил-трансферазы *Aeromonas hydrophila*, в которых замена активного Asp на Glu приводила к различной потере активности в зависимости от природы субстрата [28, 29]. Исследование инактивации панкреатической липазы карбодимидом привело к предположению, что карбоксильные группы выполняют структурную роль – при адсорбции на гидрофобной поверхности разделяются стабилизируются активная конформация фермента [23]. Существует и противоположное сообщение о том, что Asp не участвует в средстве липазы с субстратом [30].

Таким образом, проведенный комплекс исследований показал, что, несомненно, EDC в присутствии сложного эфира модифицирует карбоксильные группы в Липазе I и не вызывает образования внутримолекулярных связей. Судя по кинетическим параметрам, карбоксильные группы отвечают как за формирование фермент-субстратного комплекса, так и за его

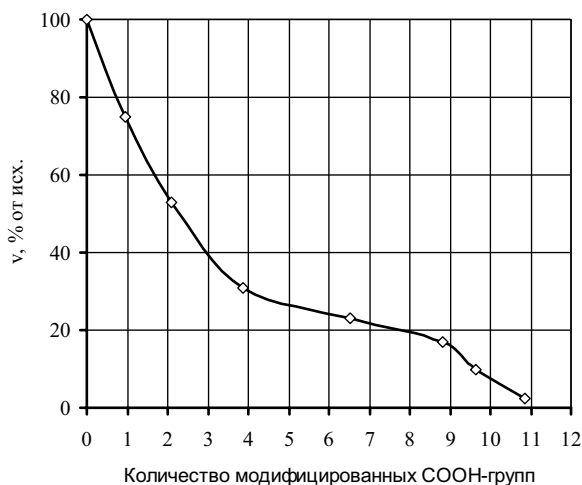


Рисунок 5. Стехиометрия ингибирования Липазы I карбодимидом (pH 5,0)

распад. На разных субстратах значения V_{\max} изменились в одинаковой степени, что свиде-

тельствует об участии одного и того же активного центра в катализе.

15.09.2011

Список литературы:

1. Benjamin S., Pandey A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation // Braz. Arch. Biol. a Technol. – 2001. – V. 44, №2. – P. 213–221.
2. Brumlik M. J., Buckley J. T. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila* // J. Bacteriology. – 1996. – V. 178, №7. – P. 2060–2064.
3. Van Pouderooyen G., Eggert T., Jaeger K-E., Dijkstra B. W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal 6/в-hydrolase fold enzyme // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 309, №1. – P. 215–226.
4. Yadav R. P., Rajendra K. S., Gupta R., Davidson W. S. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus* // Biotechnol. Appl. Biochem. – 1998. – V. 28, №3. – P. 243–249.
5. Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z. S., Dodson E. J., Dodson G. G., Tolley S., Turkenburg J. P., Christiansen L., Huges-Jensen B., Norskov L., Thim L., Menge U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase // Nature. – 1990. – V. 343. – P. 767–770.
6. Derewenda U., Swenson L., Green R., Wei Y., Yamaguchi S., Joerger R., Haas M. J., Derewenda Z. S. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi // Protein Engineering. – 1994. – V. 7, №4. – P. 551–557.
7. Boel E., Huges-Jensen B., Christiansen M., Thim L., Fil N. P. *Rhizomucor miehei* trigly-ceride lipase is synthesized as a precursor // Lipids. – 1988. – V. 23. – P. 701–706.
8. Derewenda Z. S., Derewenda U., Dodson G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1,9-Å resolution // J. Mol. Biol. – 1992. – V. 227. – P. 818–839.
9. Blow D. M., Birktoft, J. J., Hartlet B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin // Nature. – 1969. – V. 221. – P. 337–340.
10. Bachovchin W. W., Roberts J. D. Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. The state of histidine in the catalytic triad of 6-lytic protease. Implications for the charge-relay mechanism of peptide-bond cleavage by serine proteases // J. Am. Chem. Soc. – 1978. – V. 100. – P. 8041–8047.
11. Bachovchin W. W., Kaiser R., Richards J. H., Roberts J. D. Catalytic mechanism of serine protease: reexamination of the pH dependence of the histidyl $^1J^{13}_{\text{C-H}}$ coupling constant in the catalytic triad of 6-lytic protease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – V. 78. – P. 7323–7326.
12. Warshel A., Naray-Szabo G., Sussman F., Hwang J.-K. How do serine proteases really work? // Biochemistry. – 1989. – V. 28. – P. 3629–3637.
13. Warshel A. Computer modeling of chemical reactions in enzymes and solution. – New York: John Wiley and Sons, 1991.
14. Lightstone F. C., Zheng Y.-L., Bruice T. C. Molecular dynamics simulations of ground and transition states for the S_N2 displacement of C1^- from 1,2-dichloroethane at the active site of *Xanthobacter autoioiphicus* haloalkane dehalogenase // J. Am. Chem. Soc. – 1998. – V. 120. – P. 5611–5621.
15. Frey P. A. A., Whitt S. A., Tobin J. B. Low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases // Science. – 1994. – V. 264. – P. 1927–1930.
16. Cleland W. W., Kreevoy M. M. Low-barrier hydrogen bonds and enzymatic catalysis // Science. – 1994. – V. 264. – P. 1887–1890.
17. Warshel A., Papazyan A. Energy considerations show that low-barrier hydrogen bonds do not offer a catalytic advantage over ordinary hydrogen bonds // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – V. 93. – P. 13665–13670.
18. Warshel A., Florian J. Computer simulations of enzyme catalysis: finding out what has been optimized by nature // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – V. 95. – P. 5950–5955.
19. Warshel A. Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 27035–27038.
20. Yamada K., Machida H. // Nippon Fugeikagaku Kaishi (in Japanese). – 1992. – V. 36. – P. 858–860.
21. Петрова Л. Л., Казанина Г. А., Селезнева А. А. Применение рН-статного метода для изучения ферментативного действия липазы *Penicillium sp.* // Прикл. биохим. и микроб. – 1977. – Т. 13, №5. – С. 758.
22. Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Биокинетика: Практический курс. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
22. Dufour C., Semeriva M., Desnuelle P. The role of carboxyl groups in the activity of pancreatic lipase // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – V. 327. – P. 101–113.
24. Kuller W., Kolattukudy P. E. Mechanism of action of cutinase: chemical modification of the catalytic triad characteristic for serine hydrolases // Biochemistry. – 1982. – V. 21. – P. 3083–3090.
25. Lombardo D. Catalytic properties of modified human pancreatic carboxylic-ester hydrolase // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – V. 700. P. 75–80.
26. Lau E. Y., Bruice T. C. Consequences of breaking the Asp-His hydrogen bond of the catalytic triad: effects on the structure and dynamics of the serine esterase cutinase // Biophysical Journal. – 1999. – V. 77. – P. 85–98.
27. Herrgard S., Gibas C. J., Subramaniam S. Role of an electrostatic network of residues in the enzymatic action of the *Rhizomucor miehei* lipase family // Biochemistry. – 2000. – V. 39, №11. – P. 2921–2930.
28. Chang R.-C., Chen J. C., Shaw J.-F. Studying the active site pocket of *Staphylococcus hyicus* lipase by site-directed mutagenesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – V. 229, №1. – P. 6–10.
29. Brumlik M. J., Buckley J. T. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyl-transferase from *Aeromonas hydrophila* // J. Bacteriology. – 1996. – V. 178, №7. – P. 2060–2064.
30. Jdger S., Demleither G., Gutz F. Lipase of *Staphylococcus hyicus*: analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – V. 100. – P. 249–254.

Сведения об авторах:

Шеламова Светлана Алексеевна, доцент кафедры микробиологии и биохимии, факультет прикладной биотехнологии Воронежской государственной технологической академии, кандидат технических наук, доцент
394017, г. Воронеж, пр-т Революции, д. 19, тел. (473) 2555557, e-mail: shelam@mail.ru
Тырсин Юрий Александрович, заведующий кафедрой органической и пищевой химии Московского государственного университета пищевых производств (МГУПП), доктор технических наук, профессор

UDC 577.153.2

Shelamova S.A., Tyrsin Y.A.

Voronezh state technological academy; Moscow state university of food production, e-mail: shelam@mail.ru; tyrsin@mail.ru

THE ROLE OF CARBOXYL GROUPS IN THE ACTIVITY OF LIPASE I RHIZOPUS ORYZAE 1403

Participation of carboxyl groups in catalytic action Lipase I *Rhizopus oryzae* 1403 is proved inactivated carbodiimide (EDC) at presence nucleophile – glycine ethyl ester. The amino acid analysis modified enzyme has excluded an opportunity reacted with EDC tyrosine and histidine, and absence of restoration of activity hydroxylamine – with serine. At practically complete loss of activity enzyme was modified 11 carboxyl groups; under condition of the pseudo-first order of reaction hydrolysis – three. Research of kinetic hydrolysis triolein and tributirin have shown, that V_{max} differed on both a little substrates, and K_M on tributirin has increased in 1,47, and on triolein – in 1,18 times. It results in a conclusion, that of carboxyl group answer for creation active conformation enzyme at linkage with certain substrate.

Key words: lipase, *Rhizopus*, carboxyl group.

Bibliography:

1. Benjamin S., Pandey A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation // Braz. Arch. Biol. a Technol. – 2001. – V. 44, №2. – P. 213–221.
2. Brumlik M. J., Buckley J. T. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila* // J. Bacteriology. – 1996. – V. 178, №7. – P. 2060–2064.
3. Van Pouderooyen G., Eggert T., Jaeger K-E., Dijkstra B. W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal 6/ v-hydrolase fold enzyme // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 309, №1. – P. 215–226.
4. Yadav R. P., Rajendra K. S., Gupta R., Davidson W. S. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus* // Biotechnol. Appl. Biochem. – 1998. – V. 28, №3. – P. 243–249.
5. Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z. S., Dodson E. J., Dodson G. G., Tolley S., Turkenburg J. P., Christiansen L., Huges-Jensen B., Norskov L., Thim L., Menge U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase // Nature. – 1990. – V. 343. – P. 767–770.
6. Derewenda U., Swenson L., Green R., Wei Y., Yamaguchi S., Joerger R., Haas M. J., Derewenda Z. S. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi // Protein Engineering. – 1994. – V. 7, №4. – P. 551–557.
7. Boel E., Huges-Jensen B., Christiansen M., Thim L., Fil N. P. *Rhizomucor miehei* trigly-ceride lipase is synthesized as a precursor // Lipids. – 1988. – V. 23. – P. 701–706.
8. Derewenda Z. S., Derewenda U., Dodson G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1,9-Å resolution // J. Mol. Biol. – 1992. – V. 227. – P. 818–839.
9. Blow D. M., Birktoft, J. J., Hartlet B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin // Nature. – 1969. – V. 221. – P. 337–340.
10. Bachovchin W. W., Roberts J. D. Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. The state of histidine in the catalytic triad of 6-lytic protease. Implications for the charge-relay mechanism of peptide-bond cleavage by serine proteases // J. Am. Chem. Soc. – 1978. – V. 100. – P. 8041–8047.
11. Bachovchin W. W., Kaiser R., Richards J. H., Roberts J. D. Catalytic mechanism of serine protease: reexamination of the pH dependence of the histidyl $^{13}C_{\alpha}$ -H coupling constant in the catalytic triad of 6-lytic protease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – V. 78. – P. 7323–7326.
12. Warshel A., Naray-Szabo G., Sussman F., Hwang J.-K. How do serine proteases really work? // Biochemistry. – 1989. – V. 28. – P. 3629–3637.
13. Warshel A. Computer modeling of chemical reactions in enzymes and solution. – New York: John Wiley and Sons, 1991.
14. Lightstone F. C., Zheng Y.-L., Bruice T. C. Molecular dynamics simulations of ground and transition states for the S_N2 displacement of $C1^-$ from 1,2-dichloroethane at the active site of *Xanthobacter autoirophicus* haloalkane dehalogenase // J. Am. Chem. Soc. – 1998. – V. 120. – P. 5611–5621.
15. Frey P. A. A., Whitt S. A., Tobin J. B. Low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases // Science. – 1994. – V. 264. – P. 1927–1930.
16. Cleland W. W., Kreevoy M. M. Low-barrier hydrogen bonds and enzymatic catalysis // Science. – 1994. – V. 264. – P. 1887–1890.
17. Warshel A., Papazyan A. Energy considerations show that low-barrier hydrogen bonds do not offer a catalytic advantage over ordinary hydrogen bonds // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – V. 93. – P. 13665–13670.
18. Warshel A., Florian J. Computer simulations of enzyme catalysis: finding out what has been optimized by nature // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – V. 95. – P. 5950–5955.
19. Warshel A. Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 27035–27038.
20. Yamada K., Machida H. // Nippon Kagaku Kaishi (in Japanese). – 1992. – V. 36. – P. 858–860.
21. Petrova L. L., Kazanina G. A., Selezneva A. A. The use of pH-handsome method for the study of the enzymatic action of lipase *Penicillium sp.* // Applied biochemistry and microbiology. – 1977. – V. 13, №5. – P. 758.
22. Varfolomeev S. D., Gurevichs K. G. Biokinetic: a Practical course. – M.: FAIR-PRESS, 1999. – 720 p.
22. Dufour C., Semeriva M., Desnuelle P. The role of carboxyl groups in the activity of pancreatic lipase // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – V. 327. – P. 101–113.
24. Küller W., Kolattukudy P. E. Mechanism of action of cutinase: chemical modification of the catalytic triad characteristic for serine hydrolases // Biochemistry. – 1982. – V. 21. – P. 3083–3090.
25. Lombardo D. Catalytic properties of modified human pancreatic carboxylic-ester hydrolase // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – V. 700. P. 75–80.
26. Lau E. Y., Bruice T. C. Consequences of breaking the Asp-His hydrogen bond of the catalytic triad: effects on the structure and dynamics of the serine esterase cutinase // Biophysical Journal. – 1999. – V. 77. – P. 85–98.
27. Herrgard S., Gibas C. J., Subramaniam S. Role of an electrostatic network of residues in the enzymatic action of the *Rhizomucor miehei* lipase family // Biochemistry. – 2000. – V. 39, №11. – P. 2921–2930.
28. Chang R.-C., Chen J. C., Shaw J.-F. Studying the active site pocket of *Staphylococcus hyicus* lipase by site-directed mutagenesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – V. 229, №1. – P. 6–10.
29. Brumlik M. J., Buckley J. T. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyl-transferase from *Aeromonas hydrophila* // J. Bacteriology. – 1996. – V. 178, №7. – P. 2060–2064.
30. Jdger S., Demleither G., Gütz F. Lipase of *Staphylococcus hyicus*: analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – V. 100. – P. 249–254.