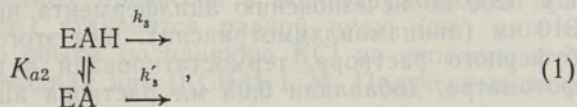


М. ПАБЕРИТ, А. ААВИКСААР

КИНЕТИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ДВУХ ФОРМ ФЕРМЕНТА В ДЕАЦИЛИРОВАНИИ *n*-N,N,N-ТРИМЕТИЛАММОНИЙ- ЦИННАМОИЛХИМОТРИПСИНА

(Представил Э. Липпмаа)

При исследовании влияния солей на деацилирование циннамоилхимо-трипсина было найдено, что депротонизация некоторой ранее не отмеченной группы фермента с $pK_{a2} \sim 12$ существенно повышает чувствительность константы скорости реакции к влиянию неорганических солей [1]. Полученные данные при $pH > 10$ описывались кинетической схемой



в которой k_3 , k'_3 и K_{a2} рассматривались как функции от молярной концентрации соли c :

$$\lg k_3 = \lg k_3^0 + \Delta\chi_{k_3} c + \Delta B_{k_3} c^2, \quad (2)$$

$$\lg k'_3 = \lg k_3^0 + \Delta\chi_{k'_3} c + \Delta B_{k'_3} c^2, \quad (3)$$

$$pK_{a2} = pK_{a2}^0 + \Delta\chi_{pK_{a2}} c, \quad (4)$$

где коэффициенты $\Delta\chi$ и ΔB обозначают разности в характеристиках высаливания исходного и активированного состояний реакции — уравнения (2) и (3) или депротонизованной и протонизованной форм — уравнение (4). Повышение чувствительности скорости деацилирования к влиянию солей было вызвано увеличением $\Delta\chi$ и уменьшением ΔB при переходе ацилфермента из ЕАН в ЕА.

Чтобы выяснить, какую роль в этих изменениях играет молекула фермента и что зависит от ацильного лиганда, требуются данные по меньшей мере для двух разных ацилферментов. В настоящей работе для получения таких сравнительных данных исследовалось влияние КСI на деацилирование *n*-N,N,N-триметиламмоний-циннамоилхимо-трипсина (ТМАЦ-ХТ) в зависимости от pH.

Экспериментальная часть

В работе использовали α -химо-трипсин фирмы «Reanal». Йодид паранитрофенилового эфира *n*-N,N,N-триметиламмоний-*транс*-коричной кислоты был получен по описанной методике [2]; т. пл. 180—190°C (разл.), лит. $\sim 190^\circ$ (разл.) [2]. HCl, KCl и KH_2PO_4 марки о. ч., $NaHCO_3$ — х. ч. Индол марки ч, был перекристаллизован из *n*-гептана [3]. Растворы для

кинетических измерений готовились из навески соли и растворов буферных компонентов [4] или концентрированного раствора КОН о. ч. (при высоких значениях рН) в бидистиллированной воде. При каждом значении рН готовили 6 буферных растворов с разными концентрациями КСl, промежуточные концентрации соли (при рН 9,1) получали смешиванием растворов. рН растворов доводили до нужного значения добавлением концентрированных растворов КОН или НСl. рН проверяли также после проведения опытов. Запасной раствор индола был приготовлен в буферном растворе.

В работе использовали рН-метр фирмы «Radiometer» (Дания) с каломельным и стеклянным электродами К 4040 и G 2040 С соответственно. В показания рН-метра при высоких концентрациях КСl вводили поправку по номограмме, приложенной фирмой.

Раствор α -химотрипсина (150 мг/мл) готовили в 1 мМ НСl и центрифугировали через несколько дней (8000 об/мин, 30 мин) для удаления нерастворившихся примесей. Для получения ацилфермента к 1 мл ферментного раствора добавляли 20 мг субстрата и перемешивали смесь при 20° 12 ч в темноте (чтобы избежать перехода субстрата и ацилфермента в *цис*-форму). Нерастворившуюся часть субстрата отделяли центрифугированием (8000 об/мин, 30 мин), раствор ацилфермента пропускали через колонку (25×1 см) с сефадексом G-25, элюируя 0,1 мМ раствором НСl.

Кинетику деацилирования измеряли на спектрофотометре Векман UV 5260 по исчезновению ацилфермента при 299 нм (ТМАЦ-ХТ) или 310 нм (циннамоилхимотрипсин). Для этого в кювету вносили 2,70 мл буферного раствора, термостатировали в кюветной камере спектрофотометра, добавляли 0,05 мл раствора ацилфермента, перемешивали и регистрировали уменьшение оптической плотности во времени. Концентрация фермента в опытах была около 10^{-5} М.

Полученные кривые псевдомонмолекулярной реакции обрабатывали методом нелинейной регрессии с итерированием [5]. Исходное значение для k_1 было найдено методом Рудакова в координатах $\ln \phi$ от τ [6]. Первый порядок реакции соблюдался до степеней гидролиза 90% и более.

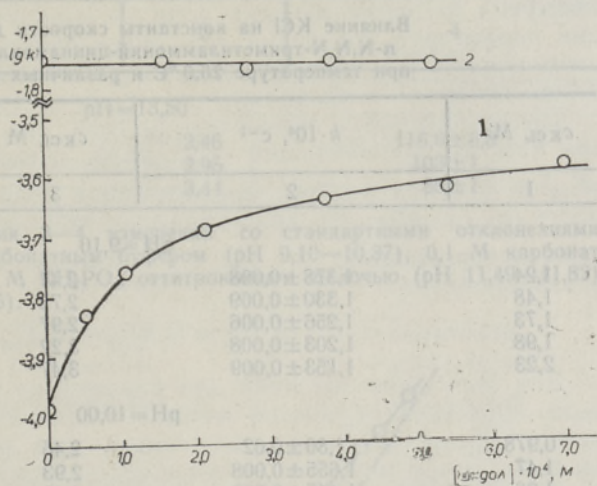
При высоких значениях рН после окончания деацилирования наблюдалось медленное линейное увеличение оптической плотности, вызванное денатурацией фермента [7]. Кинетические константы из таких кривых рассчитывали тем же методом нелинейной регрессии [5], приближая итерированием соответствующую рассчитанную кривую (экспоненциальное уменьшение плюс линейное увеличение оптической плотности) к измеренной. Исходные значения для параметров кривой были найдены из линеаризации соответствующего уравнения, используя подход Рудакова [6].

Результаты экспериментов и их обсуждение

ТМАЦ-ХТ был выбран для исследования, исходя из предположения, что, в отличие от циннамоилхимотрипсина, у которого ароматическое ядро расположено в гидрофобной полости химотрипсина (для сходного индолилакрилоилхимотрипсина это показано методом рентгеноструктурного анализа [8]), объемистая заряженная *n*-N,N,N-триметиламмоний-циннамоильная группа оставляет эту полость свободной. Для проверки этого предположения было изучено влияние индола на деацилирование обоих ацилферментов. Результаты приведены на рис. 1.

Из рисунка видно, что добавление индола повышает скорость деацилирования ТМАЦ-ХТ, не влияя на деацилирование циннамоил-

Рис. 1. Влияние индола на скорость деацилирования ТМАЦ-ХТ (1) и циннамоилхимотрипсина (2). рН=9,20; 2,99 М КСl; концентрация ацилфермента $1 \cdot 10^{-5}$ М.



фермента. Наличие эффекта прототирования деацилирования ТМАЦ-ХТ индолом показывает, что гидрофобная полость в активном центре ТМАЦ-ХТ действительно свободна (аргументацию в пользу такой интерпретации эффекта прототирования см., например, в [9, 10]).

Введение заряда в ацильный остаток лиганда может вызвать электростатические возмущения значений pK_a ионогенных групп фермента [11, 12]. Известно, однако, что электростатическая составляющая в свободной энергии межмолекулярных процессов в водных растворах при значениях ионной силы $\mu \geq 1$ становится равной нулю (см., например, [12-14]). С учетом этого опыта по влиянию КСl на скорость деацилирования ТМАЦ-ХТ проводили при $[КСl] \geq 1$ М. Полученные данные приведены в табл. 1.

На рис. 2 приведены зависимости логарифма константы скорости деацилирования ТМАЦ-ХТ от концентрации КСl при различных значениях рН. Из рисунка видно, что повышение рН от 9 до 13,5 вызывает увеличение скорости деацилирования на два порядка и при всех значениях рН рост концентрации КСl замедляет деацилирование ТМАЦ-ХТ. В случае циннамоилхимотрипсина присутствие соли повышало скорость деацилирования, но в целом увеличение константы скорости в промежутке рН от 9 до 13,4 оставалось в пределах 5 раз [1]. Следовательно, замена ацильного остатка в ацилхимотрипсине приводит к существенным изменениям влияния рН и солей на скорость его деацилирования.

На рис. 3 в качестве типичной приведена кривая зависимости $lg k$ от рН в 3,4 М растворе КСl. В интервале рН от 9 до 12 форма кривой близка к сигмоиде, а при дальнейшем увеличении рН наблюдается приближение к прямой с единичным наклоном. Учитывающая такую зависимость $lg k$ от рН схема

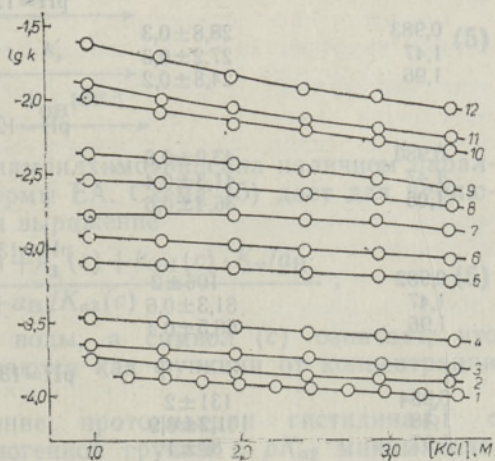


Рис. 2. Зависимость логарифма константы скорости деацилирования ТМАЦ-ХТ от концентрации КСl при 25,0 °С и рН 9,10 (1); 10,00 (2); 10,37 (3); 10,84 (4); 11,49 (5); 11,82 (6); 12,16 (7); 12,49 (8); 12,78 (9); 13,09 (10); 13,25 (11) и 13,50 (12).

Влияние KCl на константы скорости деацилирования
n-N,N,N-триметиламмоний-циннамоилхитотрипсина
 при температуре 25,0 °C и различных значениях pH *

c_{KCl} , M	$k \cdot 10^4$, c ⁻¹	c_{KCl} , M	$k \cdot 10^4$, c ⁻¹
1	2	3	4
pH=9,10			
1,24	1,378 ± 0,008	2,47	1,118 ± 0,009
1,48	1,330 ± 0,009	2,72	1,095 ± 0,008
1,73	1,256 ± 0,006	2,97	1,056 ± 0,007
1,98	1,203 ± 0,008	3,22	1,009 ± 0,007
2,23	1,153 ± 0,009	3,47	1,005 ± 0,006
pH=10,00			
0,978	1,80 ± 0,02	2,45	1,347 ± 0,007
1,47	1,655 ± 0,008	2,93	1,283 ± 0,006
1,96	1,445 ± 0,009	3,42	1,235 ± 0,005
pH=10,37			
0,981	2,253 ± 0,006	2,45	1,807 ± 0,008
1,47	2,071 ± 0,008	2,95	1,616 ± 0,008
1,97	1,927 ± 0,008	3,44	1,479 ± 0,008
pH=10,84			
0,984	3,42 ± 0,02	2,46	2,64 ± 0,02
1,48	3,20 ± 0,02	2,95	2,52 ± 0,02
1,97	2,92 ± 0,02	3,44	2,30 ± 0,02
pH=11,49			
0,978	7,96 ± 0,04	2,45	6,73 ± 0,04
1,47	7,79 ± 0,04	2,94	6,29 ± 0,06
1,96	7,26 ± 0,04	3,42	5,87 ± 0,04
pH=11,82			
0,978	12,06 ± 0,08	2,45	9,93 ± 0,04
1,47	11,26 ± 0,09	2,94	9,03 ± 0,05
1,96	10,49 ± 0,06	3,43	8,25 ± 0,04
pH=12,16			
0,978	16,8 ± 0,1	2,45	15,5 ± 0,1
1,47	17,6 ± 0,1	2,93	15,17 ± 0,07
1,96	16,53 ± 0,08	3,42	12,76 ± 0,08
pH=12,49			
0,983	28,8 ± 0,3	2,46	22,8 ± 0,2
1,47	27,2 ± 0,3	2,95	21,1 ± 0,2
1,96	24,8 ± 0,2	3,44	18,8 ± 0,2
pH=12,78			
0,980	43,9 ± 0,6	2,45	32,9 ± 0,3
1,47	41,3 ± 0,4	2,93	28,9 ± 0,4
1,06	36,4 ± 0,6	3,42	24,7 ± 0,4
pH=13,09			
0,982	106 ± 2	2,46	61,3 ± 0,3
1,47	81,3 ± 0,6	2,95	52,0 ± 0,5
1,96	68,5 ± 0,4	3,44	44,1 ± 0,3
pH=13,25			
0,984	131 ± 2	2,46	72,8 ± 0,4
1,48	101,2 ± 0,9	2,95	62,7 ± 0,4
1,97	87 ± 1	3,44	54,1 ± 0,5

1	2	3	4
---	---	---	---

pH = 13,50

0,982	240 ± 3	2,46	116,6 ± 0,8
1,47	195 ± 2	2,95	103 ± 1
1,96	143 ± 1	3,44	85 ± 1

* Приведены средние значения 3—4 измерений со стандартными отклонениями; pH поддерживали 0,05 М карбонатным буфером (pH 9,10—10,37), 0,1 М карбонатным буфером (pH 10,84), 0,05 М KH_2PO_4 , оттитрованным щелочью (pH 11,49—11,82), и избытком щелочи (pH ≥ 12,16).

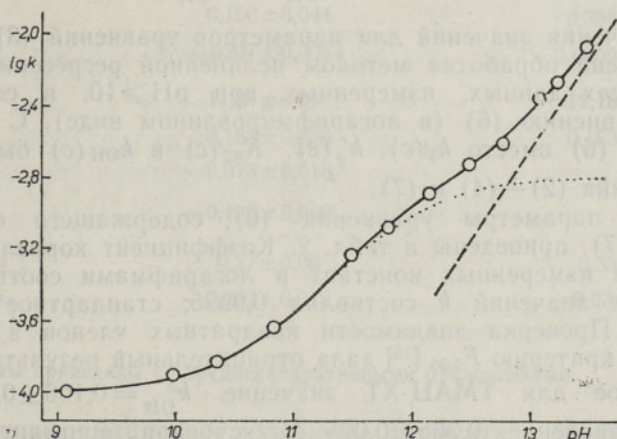
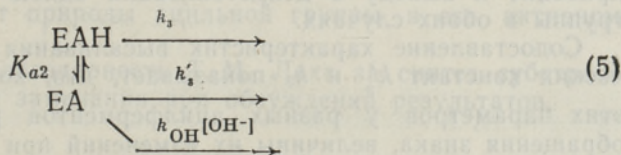


Рис. 3. Зависимость константы деацилирования ТМАЦ-ХТ от pH при концентрации KCl 3,4 М (см. табл. 1). При pH 9,10 использовано значение, интерполированное по уравнению (2). Через точки проведена теоретическая кривая в соответствии со схемой (5) при использовании значений k_3 , k'_3 , pK_{a2} и k_{OH} , рассчитанных по уравнениям (2)—(4), (7) и параметрам табл. 2. Пунктиром и прерывистой линией показаны составляющие проведенной кривой: сигмоида (если принять $k_{\text{OH}}=0$) и прямая, соответствующая значению k_{OH} , рассчитанному по уравнению (7) и параметрам табл. 2.



отличается от схемы (1) для циннамоилхимотрипсина наличием параллельного щелочного гидролиза формы ЕА. Схема (5) дает для наблюдаемой константы деацилирования выражение

$$k = \frac{k_3(c) \cdot a_{\text{H}^+} / K_{a2}(c) + k'_3(c) + k_{\text{OH}}(c) \cdot K_w / a_{\text{H}^+}}{1 + a_{\text{H}^+} / K_{a2}(c)}, \quad (6)$$

где K_w — ионное произведение воды, а символ (c) означает, что параметры схемы (5) рассматриваются как функции от концентрации соли.

При pH ~ 9, когда влияние протонизации гистидина-57 с $pK_a \approx 7$ [7] и депротонизации ионогенной группы с pK_{a2} минимально,

возможно изучение влияния соли на константу k_3 ТМАЦ-ХТ. Значения параметров уравнения (2), приведенные в табл. 2, были определены при рН 9,1. Коэффициент корреляции 0,9975, стандартное отклонение 0,0036.

Предварительная обработка данных по уравнению (6) отдельно при каждой концентрации КСl дала оценочные значения для k'_3 , pK_{a2} и k_{OH} при разных концентрациях соли. Оказалось, что зависимости k'_3 и pK_{a2} от концентрации КСl удовлетворительно описываются уравнениями (3) и (4), а влияние КСl на k_{OH} выражается уравнением

$$\lg k_{OH} = \lg k_{OH}^0 + \Delta\chi_{k_{OH}} c. \quad (7)$$

Для получения значений для параметров уравнений (3), (4) и (7) была проведена обработка методом нелинейной регрессии с итерированием [5] всех данных, измеренных при $pH \geq 10$, в совокупности, согласно уравнению (6) (в логарифмированном виде). С этой целью в уравнение (6) вместо $k_3(c)$, $k'_3(c)$, $K_{a2}(c)$ и $k_{OH}(c)$ были подставлены уравнения (2)—(4) и (7).

Искомые параметры уравнения (6), содержащего соотношения (2)—(4) и (7), приведены в табл. 2. Коэффициент корреляции между логарифмами измеренных констант и логарифмами соответствующих рассчитанных значений k составлял 0,9995, стандартное отклонение было 0,020. Проверка значимости квадратных членов в уравнениях (4) и (7) по критерию $F_{0,05}$ [15] дала отрицательный результат.

Полученное для ТМАЦ-ХТ значение $k_{OH}^0 = 0,106 \pm 0,005 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ниже, чем значение $0,365 \pm 0,005 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ для константы скорости щелочного гидролиза модельного соединения, сложного эфира коричной кислоты с N-ацетилсеринамидом [16], что указывает на определенные затруднения в щелочном гидролизе сложноэфирной связи в ацилферменте. В случае циннамоилхимотрипсина эти затруднения должны быть еще большими, так как щелочной гидролиз не был замечен до значения рН 13,4 [1]. Интересно отметить, что щелочной гидролиз N-ацетил-L-фенилаланилхимотрипсина с метилированным остатком гистидина-57 проходил в несколько раз быстрее, чем у модельных соединений [17].

В табл. 2 для сравнения включены данные о влиянии КСl на деацилирование циннамоилхимотрипсина [1]. Близость значений pK_{a2}^0 приводит к выводу о депротонизации одной и той же ионогенной группы в обоих случаях.

Сопоставление характеристик высаливания $\Delta\chi$ и ΔB для кинетических констант k'_3 и k_3 показывает, что, хотя численные значения этих параметров у разных ацилферментов различаются вплоть до обращения знака, величины их изменений при переходе от ЕАН к ЕА одинаковы (табл. 2). Совпадение значений разностей $\Delta\chi_{k'_3} - \Delta\chi_{k_3}$ и $\Delta B_{k'_3} - \Delta B_{k_3}$ тем более примечательно, что исследованные ацилферменты принципиально отличаются друг от друга, так как в циннамоилхимотрипсине фенольная группа лиганда расположена в гидрофобной полости активного центра фермента, а в ТМАЦ-ХТ эта полость свободна. Величины $\Delta\chi_{pK_{a2}}$ для перехода от ЕАН к ЕА для этих ацилферментов также практически одинаковы. Таким образом, параметры, характеризующие изменение взаимодействия ацилфермента с окружающим раствором при депротонизации, не зависят от природы ацильного лиганда и, видимо, отражают изменения в белковой глобуле. Это позволяет предполагать, что вследствие депротонизации этой группы

Параметры уравнений (2)—(4) и (7) для ацил- α -химотрипсинов *

Параметр	Ацилфермент	
	<i>l</i> -N,N,N-триметиламмоний-циннамоилхимотрипсин	циннамоилхимотрипсин [1]
$\lg k_3^0$	$-3,733 \pm 0,015$	$-1,8608 \pm 0,0053$
$\Delta\chi_{h_3}$	$-0,116 \pm 0,013$	$0,0633 \pm 0,0090$
ΔB_{h_3}	$0,0112 \pm 0,0028$	$-0,0066 \pm 0,0028$
$\lg k_3^{0'}$	$-3,063 \pm 0,064$	$-2,054 \pm 0,015$
$\Delta\chi_{h_3}'$	$0,150 \pm 0,044$	$0,396 \pm 0,019$
$\Delta B_{h_3}'$	$-0,0207 \pm 0,0084$	$-0,0409 \pm 0,0049$
pK_{a2}^0	$11,31 \pm 0,09$	$12,18 \pm 0,12$
$\Delta\chi_{pK_{a2}}$	$0,168 \pm 0,034$	$0,153 \pm 0,042$
$\lg k_{OH}^0$	$-0,973 \pm 0,018$	—
$\Delta\chi_{k_{OH}}$	$-0,196 \pm 0,009$	—
$\Delta\chi_{h_3}' - \Delta\chi_{h_3}$	$0,27 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,03$
$\Delta B_{h_3}' - \Delta B_{h_3}$	$-0,032 \pm 0,012$	$-0,034 \pm 0,008$

* Коэффициенты приведены со среднеквадратичными отклонениями.

происходит конформационное изменение фермента и обозначения ЕАН и ЕА в схемах (1) и (5) соответствуют отдельным конформационным формам ацилхимотрипсина.

Выводы

ТМАЦ-ХТ находится в щелочном растворе в двух активных формах, на деацилирование которых присутствие КСI влияет по-разному: при деацилировании протонизованной формы наблюдается кинетический эффект всаливания, а депротонизованной формы — эффект высаливания. Это изменение кинетического эффекта высаливания (всаливания) связано с переходом фермента из одной конформационной формы в другую и не зависит от природы ацильной группы в его активном центре.

Авторы выражают благодарность Т.-М. Лахт за синтез субстрата и В. Тыгу за полезные замечания при обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Паберит М. Ю. Кинетическое проявление депротонизации ионогенной группы в щелочной области рН при деацилировании ацилхимотрипсинов. — 5-я респ. конф. молодых ученых-химиков. Тез. докл. Таллин, 1983, 23.
2. Knowles, J. R., Preston, J. M. A convenient titrant for α -chymotrypsin and trypsin. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 151, N 1, 290—292.
3. Collin, G. Indol. — In: *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, B. 13. 4. Aufl. Weinheim, New York, 1977, 207.
4. *Biochemists' Handbook*. London, 1961, 22—42.
5. Wilkinson, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. — *Biochem. J.*, 1961, 80, N 2, 324—332.
6. Рудаков Е. С. Дифференциальные методы расчета констант скоростей неосложненных химических реакций. — *Кинетика и катализ*, 1960, 1, № 2, 177—187.

7. *Bender, M. L., Schonbaum, G. R., Zerner, B.* The pH dependence of some α -chymotrypsin-catalyzed hydrolyses. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1962, **84**, N 13, 2562—2570.
8. *Henderson, R.* Structure of crystalline chymotrypsin IV. The structure of indoleacryloyl- α -chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. — *J. Mol. Biol.*, 1970, **54**, N 2, 341—354.
9. *Moore, L., Jersey, J. de.* α -Chymotrypsin: a study of the promotion of the deacylation reaction. — *Aust. J. Biol. Sci.*, 1970, **23**, N 3, 607—615.
10. *Мартинек К., Варфоломеев С. Д., Левашов А. В., Березин И. В.* Кинетическое проявление структуры активного центра α -химотрипсина при взаимодействии его с фрагментами специфических субстратов. — *Молекуляр. биология*, 1971, **5**, № 3, 351—360.
11. *Hofstee, B. H. J.* Effects of neutralization of amino groups on the kinetics of chymotrypsin. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, **41**, N 5, 1141—1147.
12. *Goldstein, L.* Microenvironmental effects on enzyme catalysis. A kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. — *Biochemistry*, 1972, **11**, N 22, 4072—4084.
13. *Ярв Я. Л., Кесватера Т. А., Аавиксаар А. А.* Высаливание в межонных реакциях. — *TRÜ Toim., vihik 384. Keemia-alased tööd*, 10,2: Keemiline analüüs. Tartu, 1976, 104—117.
14. *Фёршт Э.* Структура и механизм действия ферментов. М., 1980, 165—190.
15. *Худсон Д.* Статистика для физиков. М., 1970, 168.
16. *Bender, M. L., Schonbaum, G. R., Zerner, B.* Spectrophotometric investigations of the mechanism of α -chymotrypsin-catalyzed hydrolyses. Detection of the acyl-enzyme intermediate. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1962, **84**, N 13, 2540—2550.
17. *Fastrez, J., Houyet, N.* Mechanism of chymotrypsin: acid/base catalysis and transition-state solvation by the active site. — *Eur. J. Biochem.*, 1977, **81**, N 3, 515—522.

Институт химической и биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
3/VI 1983

M. PABERIT, A. AAVIKSAAR

FERMENDI KAHE VORMI KINEETILINE AVALDUMINE *p*-N,N,N-TRIMETÜÜLAMMOONIUM-TSINNAMOÜÜLKÜMOTRÜPSIINI HÜDROLÜÜSIL

Artiklis on käsitletud KCl mõju *p*-N,N,N-trimetüülammoonium-*trans*-tsinnamoüülkümotrüpsini (TMAT-KT) hüdrolüüsi kineetikale pH-vahemikus 9,1—13,5. TMAT-KT esineb leeliselises lahuses kahe aktiivse vormina, kusjuures KCl mõjutab nende hüdrolüüsi kineetikat erinevalt: protoniseeritud vormi puhul avaldub kineetiline sissesoolamine, deprotoniseeritud vormi puhul väljasoolamine. Kui võrrelda neid tulemusi andmetega soolade mõju kohta tsinnamoüülkümotrüpsini hüdrolüüsile, ilmneb, et muutuse soola toimes iseloomustavad fermendi üleminekut ühest vormist teise ega sõltu atsüülrühmast tema aktiivsentrts.

M. PABERIT, A. AAVIKSAAR

KINETIC MANIFESTATION OF TWO FORMS OF ENZYME IN THE DEACYLATION OF *p*-N,N,N-TRIMETHYLAMMONIUM CINNAOYLCHYMOTRYPSIN

The influence of KCl over the pH range from 9.1 to 13.5 on the deacylation kinetics of *p*-N,N,N-trimethylammonium *trans*-cinnamoyl-chymotrypsin (TMAC-CT) has been studied. It has been shown that TMAC-CT exists in alkaline solution in two active forms. The presence of KCl influences their deacylation kinetics differently: deacylation of the protonized form shows a kinetic salting-in effect, while a salting-out effect is observed in the deacylation of the deprotonized form. Comparison of the results with the data on the influence of salts on the deacylation of cinnamoylchymotrypsin shows that the changes established in the salting patterns characterize the transition of the enzyme from one form to another and do not depend on the nature of the acyl ligand in the active centre.