

УДК 576.343:546.26.001.57

## АНАЛИЗ ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ УГЛЕРОДА В РЕАКЦИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАРБОКСИЛИРОВАНИЯ РИБУЛОЗОДИФОСФАТА

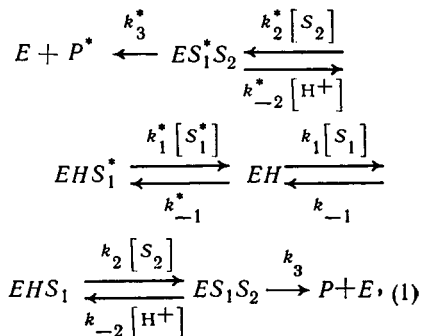
А. А. ИВЛЕВ, Д. А. КНЯЗЕВ

(Кафедра неорганической и аналитической химии)

Углерод биомассы многих растений обогащен изотопом  $^{12}\text{C}$  в значительно большей степени, чем углекислота, ассимилируемая из среды [16, 17]. Это обогащение связывают с фракционированием изотопов углерода в реакции ферментативного карбоксилирования рибулозодифосфата (РиДФ), которая ответственна за фиксацию  $\text{CO}_2$  в ходе фотосинтеза [7, 13]. Анализ изотопных эффектов данной реакции является инструментом исследования механизма фотосинтеза и необходим для оценки границ интервала изменчивости изотопного состава углерода растений.

В настоящей работе путем сопоставления теоретически возможных изотопных эффектов реакции ферментативного карбоксилирования РиДФ и результатов их измерений в опытах *in vitro* сделана попытка объяснить природу значительного обогащения фиксируемого углерода  $\text{CO}_2$  легким изотопом и определить границы интервала изменчивости изотопных эффектов в этой реакции.

Для описания изотопного эффекта при ферментативном карбоксилировании РиДФ рассмотрим формализованную кинетическую схему реакции [15] с участием изотопных форм  $\text{CO}_2$ :



где  $[\text{S}_1]$  и  $[\text{S}_2]$  — концентрация соответственно  $\text{CO}_2$  и РиДФ;  $EH$  и  $E$  — протонированная и депротонированная формы фер-

мента;  $P$  — продукт реакции 2-карбокси-3-кетопентит. Звездочкой обозначена изотопнотяжелая форма  $\text{CO}_2$ , образующихся промежуточных соединений и продукта.

На 1-й стадии, помеченной индексами 1 и  $-1$ , происходит комплексобразование  $\text{CO}_2$  с катионом металла-кофактора на одном из активных центров фермента РиДФ-карбоксилазы, на 2-й, помеченной индексами 2 и  $-2$ , — взаимодействие координированной молекулы  $\text{CO}_2$  с ферментсвязанной молекулой РиДФ, на 3-й — высвобождение продукта.

Поскольку в реакции участвует смесь изотопных молекул (а не чистые изотопные формы), кинетические уравнения рассматривались с учетом конкуренции изотопных молекул за активные центры фермента.

Для записи эффективного коэффициента разделения изотопов, определяемого как отношение эффективных констант скоростей реакций изотопных форм

$$\alpha_e = \frac{k_e}{k_e^*},$$

воспользуемся теорией графов [6]. Тогда для реакции, представленной кинетической схемой (1), легко получить следующее выражение для эффективного коэффициента разделения:

$$\alpha_e = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_1^* k_2^* k_3^*} \times \frac{k_2^* [S_2] k_3^* + k_{-2}^* [H^+] k_{-1}^*}{k_2 [S_2] k_3 + k_{-2} [H^+] k_{-1}}. \quad (2)$$

Так как анализ выражения (2) в общем виде из-за отсутствия полного набора данных о константах скоростей невозможен, теоретически определим изотопные эффекты в предельных частных случаях и по степени соответствия эксперимента и теории попытаемся выяснить влияние на изотопный эффект лимитирующих скорость стадий.

Рассмотрим вначале случай, когда скорость всей реакции контролируется 3-й стадией, а на первых двух устанавливается равновесие, т. е.  $k_{-2} \gg k_3$ , а  $k_{-1} \gg k_2$ , тогда выражение (2) примет вид

$$\alpha_e = \frac{K_I}{K_I^*} \cdot \frac{K_{II}}{K_{II}^*} \cdot \frac{k_3}{k_3^*}, \quad (3)$$

$$\text{где } K_I = \frac{k_1}{k_{-1}}, \quad K_I^* = \frac{k_1^*}{k_{-1}^*},$$

$$K_{II} = \frac{k_2}{k_{-2}}, \quad K_{II}^* = \frac{k_2^*}{k_{-2}^*}$$

— константы равновесия 1-й и 2-й стадий для изотопных форм с  $^{12}\text{C}$  и  $^{13}\text{C}$ .

Равновесие каждой из двух первых стадий одновременно означает равновесие между исходными субстратами на 1-й стадии и продуктами на 2-й, которое охарактеризуем константой  $K_{I-II} = K_I \cdot K_{II}$  для одной изотопной формы и  $K_{I-II}^* = K_I^* \cdot K_{II}^*$  для другой.

Поскольку

$$\frac{K_{I-II}}{K_{I-II}^*} = \frac{1}{\alpha_{\text{муз}, 1-II}}, \quad \text{а } \frac{k_3}{k_3^*} = \alpha_{\text{куз}, III},$$

выражение (3) можно записать

$$\alpha_e = \frac{\alpha_{\text{куз}, III}}{\alpha_{\text{муз}, 1-II}}. \quad (4)$$

Таким образом, в разбираемом случае эффективный коэффициент разделения изотопов по фиксируемому углеродному анализу атома  $\text{CO}_2$  равен отношению кинетического коэффициента разделения на необратимой стадии высвобождения продукта (2-карбокси-3-кетопентита) из продукт-ферментного комплекса к термодинамическому коэффициенту разделения в реакции изотопного обмена между  $\text{CO}_2$  и карбоксильной группой продукт-ферментного комплекса, протекающей на первых двух стадиях.

Для численной оценки  $\alpha_e$  определим вначале термодинамический изотопный эффект, который, как известно [4], можно представить в виде отношения  $\beta$ -факторов обменивающихся молекул

$$\alpha_{\text{муз}, 1-II} = \frac{\beta_{E\sim\text{RCOOH}}}{\beta_{\text{CO}_2}}, \quad (5)$$

где  $\beta_{E\sim\text{RCOOH}}$  —  $\beta$ -фактор карбоксильного атома в продукт-ферментном комплексе, а  $\beta_{\text{CO}_2}$  —  $\beta$ -фактор углекислоты.

$\beta$ -факторы, являющиеся приведенными отношениями сумм по состояниям молекул, характеризуют способность атомов накапливать тяжелый изотоп и рассчитываются через колебательные частоты молекул согласно

$$\beta = \prod_i^{3N-G} \left[ \frac{v_i^*}{v_i} \cdot \frac{\text{Sh} \left( \frac{hcv_i}{2kT} \right)}{\text{Sh} \left( \frac{hcv_i^*}{2kT} \right)} \right], \quad (6)$$

где  $v_i$  и  $v_i^*$  — изотопные колебательные частоты молекулы;  $h$  — постоянная Планка;  $c$  — скорость света;  $k$  — постоянная Больцмана;  $T$  — абсолютная температура;  $N$  — число атомов в молекуле или посредством аппроксимаций выражения [6].

$\beta$ -фактор  $\text{CO}_2$ , определенный ранее [2] с высокой надежностью, равен 1,189.  $\beta$ -фактор карбоксильного атома продукт-ферментного комплекса из-за отсутствия спектральной информации можно оценить лишь приблизительно, исходя из того, что интервал изменчивости  $\beta$ -факторов карбоксильных атомов органических молекул довольно узок — от 1,195 до 1,205 [2, 9, 14] и искомого значение должно быть в этом интервале. Отсюда  $\alpha_{\text{муз}, 1-II}$  с учетом разброса значений  $\beta_{E\sim\text{RCOOH}}$  окажется лежащим в пределах 1,005—1,014.

Карбоксильный углеродный атом ферментсвязанного продукта непосредственно с ферментом не связан и в высвобождении продукта из комплекса не участвует [15]. Его изотопный состав поэтому не изменяется, и можно принять, что  $\alpha_{\text{куз}, III} \approx 1$ .

Таким образом, эффективный коэффициент разделения  $\alpha_e$  в случае, когда лимити-

рующей стадией является высвобождение продукта из продукт-ферментного комплекса, равен обратной величине термодинамического коэффициента разделения, характеризующего изотопный обмен по присоединяемому атому  $\text{CO}_2$  на двух первых стадиях. Следовательно, в этом случае ферментативное карбоксилирование РИДФ должно сопровождаться незначительным обогащением фиксируемого углерода тяжелым изотопом — на 5—14 ‰.

Рассмотрим 2-й случай, когда скорость реакции контролируется взаимодействием ферментсвязанных РИДФ и  $\text{CO}_2$  на 2-й стадии, а на предшествующей стадии образования комплекса  $\text{CO}_2$  с металлом-кофактором достигается равновесие, т. е.  $k_{-1} \gg k_2 [S_2]$ . Тогда эффективный коэффициент разделения можно записать

$$\alpha_e = \frac{K_I}{K_I^*} \cdot \frac{k_2}{k_2^*} \quad (7)$$

или через соответствующие коэффициенты разделения изотопов на элементарных стадиях

$$\alpha = \frac{\alpha_{\text{киз}}, II}{\alpha_{\text{тиз}}, I}, \quad (8)$$

где  $\alpha_{\text{тиз}}, I$  — термодинамический коэффициент разделения на стадии комплексообразования  $\text{CO}_2$  с металлом-кофактором, а  $\alpha_{\text{киз}}, II$  — кинетический коэффициент разделения на неравновесной стадии взаимодействия ферментсвязанных РИДФ и  $\text{CO}_2$ .

Как и ранее,  $\alpha_{\text{тиз}}, I$  можно представить как отношение  $\beta$ -факторов

$$\alpha_{\text{тиз}}, I = \frac{\beta_{E \sim Me \cdot CO_2}}{\beta_{CO_2}}, \quad (9)$$

где  $\beta_{E \sim Me \cdot CO_2}$  —  $\beta$ -фактор координированной в ферментном комплексе молекулы  $\text{CO}_2$ ;  $\beta_{CO_2}$  —  $\beta$ -фактор координированной молекулы  $\text{CO}_2$  из-за отсутствия спектральных данных можно оценить лишь приближенно, используя метод сравнительного расчета и свойство аддитивности  $\beta$ -факторов в рядах подобных молекул. Будем аппроксимировать комплекс  $\text{CO}_2$  с ферментом гипотетическим соединением  $\text{C} + {}^{2\delta}\text{O}_2^{-\delta}$ , обладающим нелинейной структурой, а следовательно, отрицательным зарядом кислородных атомов и положительным зарядом углеродного атома. При этом двойные связи углерода с кислородом заменены на одинарные, что соответствует связи молекулы  $\text{CO}_2$  с металлом-кофактором через атомы кислорода

[11]. Очевидно, что  $\beta$ -фактор такого соединения должен лучше соответствовать  $\beta$ -фактору аппроксимируемого комплекса, чем  $\beta$ -фактор использовавшегося ранее в качестве аналога радикала  $\text{CF}_2$  [8].

Чтобы оценить  $\beta$ -фактор  $\text{C} + {}^{2\delta}\text{O}_2^{-\delta}$ , рассмотрим ряды подобных молекул с определенными значениями  $\beta$ -факторов [2] (схема).

Заметим, что атомами-партнерами углерода в 1-м ряду, помимо кислорода, являются элементы 2-го периода. Определив из сопоставления рядов инкремент, приходящийся на связь  $\text{C}=\text{O}$ , который находится в пределах 0,073—0,116, найдем, что искомое значение  $\beta$ -фактора  $\text{C} + {}^{2\delta}\text{O}_2^{-\delta}$  равно  $1,123 \pm 0,020$ .

Используя полученное значение, нетрудно определить, что равновесный изотопный эффект на 1-й стадии

$$\alpha_{\text{тиз}}, I = \frac{\beta_{E \sim Me^{+2} \cdot CO_2}}{\beta_{CO_2}}$$

находится в пределах 0,927—0,961. Это значит, что обогащение координированной молекулы  $\text{CO}_2$  легким изотопом составляет 42—79 ‰.

Кинетический изотопный эффект  $\alpha_{\text{киз}}, II$  в рамках теории абсолютных скоростей реакции [5] рассчитывается аналогично термодинамическому в предположении равновесия между исходными субстратами и переходным комплексом.

Тогда  $\alpha_{\text{киз}}, II$  можно записать

$$\alpha_{\text{киз}}, II = \frac{\beta_{E \sim Me^{+2} \cdot CO_2}}{\beta^*}, \quad (10)$$

где  $\beta_{E \sim Me^{+2} \cdot CO_2}$  —  $\beta$ -фактор координированной молекулы  $\text{CO}_2$ , определенный выше;  $\beta^*$  —  $\beta$ -фактор переходного комплекса, который можно представить в виде произведения двух сомножителей

$$\beta^* = \beta_L^* \cdot \beta_{-L}^* \quad (11)$$

Один из сомножителей  $\beta_L^*$  учитывает отношение сумм по состояниям, соответствующее аperiодическому колебанию вдоль координаты реакции, и определяется согласно [10] как

$$\beta_L^* = \frac{v_L^{**}}{v_L^*} = \sqrt{\frac{\frac{1}{M_1^*} + \frac{1}{M_2}}{\frac{1}{M_1} + \frac{1}{M_2}}}, \quad (12)$$

где  $M_1$  и  $M_2$  — массы фрагментов переход-

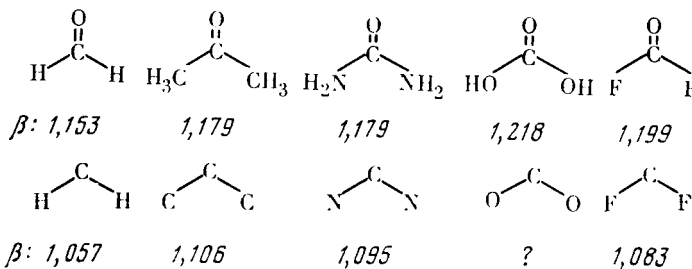


Схема.

ного комплекса на концах образуемой (или разрываемой) связи. Звездочкой помечена масса фрагмента, в котором находится изотопный атом. Второй сомножитель  $\beta_{-L}^*$  является  $\beta$ -фактором переходного комплекса с исключенным отношением сумм, соответствующим координате реакции.  $\beta_{-L}^*$  рассчитывается как  $\beta$ -фактор обычной молекулы с использованием выражения (6), но из произведения исключается сомножитель, отвечающий частоте аperiодического колебания  $\nu_L^*$ .

Перепишем соотношение (10).

$$\alpha_{киз, II} = \frac{\beta_{E \sim Me^{+2} \cdot CO_2}}{\beta_L^* \cdot \beta_{-L}^*} \quad (13)$$

$\beta_L^*$  легко определить в соответствии с (12), учитывая, что  $M_1 \ll M_2$  (где  $M_1$  — масса присоединяемой карбоксильной группы;  $M_2$  — масса ферментсвязанного РидФ). Величина  $\beta_L^*$  оказывается равной 0,989.

Поскольку в  $\beta_{E \sim Me^{+2} \cdot CO_2}$  и  $\beta_{-L}^*$ , определяемых согласно (6), входит много одинаковых сомножителей, относящихся к неизменяемым частям переходного комплекса и исходного субстрата, удобно оценивать их не в отдельности, а в виде отношения  $\frac{\beta_{E \sim Me^{+2} \cdot CO_2}}{\beta_{-L}^*}$ . Тогда для реаген-

топодобного переходного комплекса это отношение будет стремиться к 1, а  $\alpha_{киз, II}$  будет определяться обратной величиной  $\beta_L^*$ , т. е. стремиться к значению 1,011.

Для продуктоподобного переходного комплекса величину можно аппроксимировать  $\beta$ -фактором карбоксильной группы, уменьшенным на множитель, отвечающий частоте колебания связи C—C (вместо него в выражение  $\alpha_{киз, II}$  входит  $\beta_L^*$ ).

Этот множитель, оцененный на основании анализа спектра уксусной кислоты [6], оказался равным 1,009. Тогда в пределах точности оценки  $\beta$ -фактора карбоксильной группы, приведенной выше,  $\beta_{-L}^*$  окажется в интервале 1,184—1,194, а отношение

$\frac{\beta_{E \sim Me^{+2} \cdot CO_2}}{\beta_{-L}^*}$  с учетом погрешности опреде-

ления  $\beta_{E \sim Me^{+2} \cdot CO_2}$  — в интервале 0,924—0,965. Разделив это отношение на  $\beta_L^*$ , получим, что для продуктоподобного переходного комплекса  $\alpha_{киз, II}$  находится в пределах 0,934—0,975.

Используя данную выше оценку термодинамического изотопного эффекта на 1-й стадии, легко найти, что нижний предел изменения эффективного коэффициента разделения, соответствующий продуктоподобному переходному комплексу, колеблется от 0,972 до 1,014, а верхний предел, соответствующий реагентоподобному переходному комплексу, — от 1,052 до 1,091. В последнем случае основной вклад вносит термодинамический изотопный эффект на предшествующей стадии комплексообразования  $CO_2$  с металлом-кофактором.

Таким образом, в случае, когда скорость ферментативного карбоксилирования РидФ

лимитируется взаимодействием ферментсвязанных РидФ и  $CO_2$ , а переходный комплекс возникает на начальном этапе движения реагирующей системы вдоль координаты реакции (реагентоподобен), имеет место значительное обогащение фиксируемого углерода легким изотопом — от 52 до 91%. Когда переходный комплекс возникает на завершающем этапе реакции (продуктоподобен), обогащение  $^{12}C$  значительно меньше, а возможно, имеет обратный знак ( $\delta^{13}C$  от —14 до 28%).

Рассмотрим 3-й случай, когда скорость реакции контролируется образованием комплекса  $CO_2$  с металлом-кофактором на 1-й стадии ферментативной реакции, т. е.  $k_{-1} \ll k_2 [S_2]$ . Тогда значение  $\alpha_e$  равно кинетическому изотопному эффекту, сопровождающему координацию  $CO_2$  металлом-кофактором:

$$\alpha_e = \frac{k_1}{k_1^*} = \alpha_{киз, I} \quad (14)$$

В соответствии с выражением (9) и (10)  $\alpha_{киз, I}$  можно записать

$$\alpha_{киз, I} = \frac{\beta_{CO_2}}{\beta_L^* \cdot \beta_{-L}^*} \quad (15)$$

Поскольку связывание  $CO_2$  в комплекс осуществляется через кислородные атомы, можно полагать, что аperiодическое колебание вдоль координаты реакции будет практически независимым от изотопного замещения по углеродному атому, а величину  $\beta_L^*$  можно принять равной 1.

Отношение  $\beta_{CO_2}/\beta_{-L}^*$  в случае, когда переходный комплекс реагентоподобен, стремится к 1. Когда переходный комплекс продуктоподобен, то пределом, к которому стремится  $\beta_{-L}^*$  является  $\beta$ -фактор координированной молекулы  $CO_2$ , оцененный выше и лежащий в пределах 1,103—1,143. Соответственно отношение  $\beta_{CO_2}/\beta_{-L}^*$  окажется в пределах 0,927—0,961.

Таким образом, когда образование комплекса  $E \sim Me^{+2} \cdot CO_2$  контролирует скорость карбоксилирования РидФ, а переходный комплекс реагентоподобен, эффекты близки к 0 ( $\alpha \approx 1$ ). Когда переходный комплекс продуктоподобен, возможно обогащение фиксируемого углерода легким изотопом — на 41—79%.

Сопоставим границы изменчивости теоретических изотопных эффектов с имеющимися экспериментальными значениями изотопных эффектов, полученными в опытах *in vitro*. Установлено [12, 18, 19], что карбоксилирование РидФ на карбоксилазах, выделенных из различных растений и фотосинтезирующих микроорганизмов, сопровождается значительными изотопными эффектами, приводящими к обогащению фиксируемого углерода легким изотопом — на 25—90%. Причем большинство эффектов попадает в интервал от 40 до 60%. Из трех рассмотренных механизмов протекания реакции наблюдаемому диапазону изотопных эффектов в пределах точности полученных теоретических оценок соответствуют изотопные эффекты в двух последних, когда: 1) скорость ферментативной реакции у карбоксилирования РидФ конт-

ролируется стадией взаимодействия ферментсвязанных  $\text{CO}_2$  и РИДФ, а переходный комплекс реагентоподобен: 2) скорость реакции контролируется координацией  $\text{CO}_2$  металлом-кофактором, а переходный комплекс продуктоподобен. Это означает, что в обоих случаях изотопные эффекты определяются в основном фракционированием изотопов при комплексообразовании  $\text{CO}_2$  с металлом-кофактором, причем величины эффектов близки равновесным изотопным эффектам в этом процессе.

Становится объяснимой зависимость изотопного эффекта от природы металла-кофактора и четвертичной структуры белка, определяющих структуру комплекса  $E \sim \text{Me}^{+2} \cdot \text{CO}_2$  и прочность координационной связи [3]. Поскольку структурные особенности ферментов у разных организмов разные, понятна и связь величины изотопного эффекта с типом организма, из которого выделен фермент.

Неоднозначность влияния на изотопный эффект таких нехарактеристических факторов, как pH и температура, к тому же проявляющихся в узком интервале [12, 18, 19], по-видимому, объясняется их действием на конформацию активного центра фермента [3]. Ферменты активны лишь в нативной форме, которая стабильна в узком

интервале изменения параметров. При выходе за пределы этого интервала изменяется конфигурация центра, а следовательно, и комплекса  $E \sim \text{Me}^{+2} \cdot \text{CO}_2$ , что вызывает резкие скачки изотопных эффектов. Поскольку интервалы стабильности нативной формы фермента у организмов различны, одни и те же изменения значений pH и температуры в одних случаях имеют значение, в других — нет.

Итак, изучение изотопных эффектов углерода в реакции ферментативного карбоксилирования РИДФ показывает их связь с механизмом ее протекания.

В опытах *in vitro* скорость реакции контролируется либо стадией комплексобразования  $\text{CO}_2$  с металлом-кофактором, либо стадией взаимодействия ферментсвязанных РИДФ и  $\text{CO}_2$ . Во втором случае, как и в первом, изотопный эффект связан с координацией  $\text{CO}_2$  и по величине близок к равновесному. Этот результат позволяет объяснить зависимость изотопных эффектов от структурных особенностей фермента, природы металла-кофактора, pH и температуры. Вывод относится и к изотопным эффектам *in vivo*. Меньшие величины изотопных эффектов, наблюдаемые в клетке, объясняются условиями протекания реакции [8].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс ферментативной кинетики. — М.: МГУ, 1976. — 2. Бланк Т. Л. Исследование изотопных эффектов биогенных элементов. — Автореф. канд. дис. М.: ТСХА, 1978. — 3. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1977. 4. Варшавский Я. М., Вайсберг С. Э. Термодинамические и кинетические особенности реакций изотопного обмена. — Успехи химии, 1957, т. 26, с. 1434—1457. — 5. Глесстон С., Лейдлер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М.: ИЛ, 1948. — 6. Ивлев А. А. Вопросы теории фракционирования изотопов углерода в фотосинтезирующих организмах. — Успехи совр. биологии, 1976, т. 81, с. 84—105. — 7. Ивлев А. А. О механизме и условиях появления изотопных эффектов углерода при фотосинтетической ассимиляции  $\text{CO}_2$ . — Физиология растений, 1984, т. 31, с. 765—775. — 8. Ивлев А. А., Князев Д. А. О возможных механизмах фракционирования изотопов углерода при фотосинтетической ассимиляции  $\text{CO}_2$ . — Изв. ТСХА, 1983, вып. 4, с. 105—114. — 9. Ивлев А. А., Королева М. Я., Галимов Э. М. Термодинамические изотопные эффекты органических соединений. VI. Уксусная кислота, ацетальдегид, метиламин, метиловый

- спирт. — Журн. физ. химии, 1974, т. 48, с. 225—228. — 10. Меландер Л., Сондерс У. Скорости реакций изотопных молекул. М.: Мир, 1983. — 11. Станкевич И. В., Лысяк Т. В., Александров Г. Г., Каломников И. С. Основные физические свойства и структура двуокиси углерода и его производных. — Журн. структ. химии, 1978, т. 19, с. 903—933. — 12. Deleens E., Lerman J. C., Natto A., Moyses A. — Proc. 3-rd Int. Congr. on Photosynthesis. Amsterdam: ELSV., 1974, p. 1267—1276. — 13. Ester M. F., Tabita F. R., Parker P. L., Bealen Ch. V. — Plant Physiol., 1978, vol. 61, p. 680—687. — 14. Johanson H. Z. Phys. — Chemie, 1964, Bd. 227, S. 306—315. — 15. O'Leary M. H. — Phytochemistry, 1981, vol. 20, p. 553—567. — 16. Park R., Epstein S. Geochim et Cosm. Acta, 1960, vol. 21, p. 110—119. — 17. Troughton J. H. — In: Encyclopedia of plant physiology. Heilderberg: Springer — Verlag, 1980, vol. 6, p. 140—149. — 18. Whelan T., Sackelt W. M., Benedict C. R. — Plant Physiol., 1973 vol. 51, p. 1051—1054. — 19. Wong W. W., Benedict C. R., Kohel R. J. — Plant. Physiol., 1979, vol. 63, p. 852—856.

Статья поступила 11 июня 1985 г.

## SUMMARY

Equation for determining effective coefficient of isotope separation in the reaction of ribulosodiphosphate fermentative carboxylizing has been obtained on the basis of analysing the kinetic scheme of this reaction. Numeric evaluation of the coefficient is provided for particular cases, corresponding to various mechanism of the reaction. On the basis of comparing theoretical and experimental coefficients obtained *in vitro* it has been concluded that considerable saturation of  $\text{CO}_2$  fixed under carboxylizing of ribulosodiphosphate with light isotope is primarily due to fractioning of isotopes in the process of  $\text{CO}_2$  coordination with co-factor metal in one of the active centers of the ferment. The effect is close to equilibrium in the process in question.