

Enzymes

Third Edition

Malcolm Dixon Sc. D., F. R. S.

Emeritus Professor of Enzyme Biochemistry,
University of Cambridge

Honorary Fellow of King's College,
Cambridge

and

Edwin C. Webb M. A., Ph. D.,

Hon. D. Sc., F.R.A.C.I.

Vice-Chancellor, Macquarie University

Emeritus Professor of Biochemistry

University of Queensland

assisted by

C. J. R. Thorne M. A., Ph. D.

Lecturer in Biochemistry,

University of Cambridge

Fellow of St Catharine's College,

Cambridge

and

K. F. Tipton M. A., Ph. D.

Professor of Biochemistry,

Trinity College, Dublin

Longman

485952

**М. Диксон
Э. Уэбб**

Ферменты 1

В трех томах

**Перевод с английского
доктора хим. наук Л. М. Гиномана
и
канд. биол. наук М. И. Левянт
под редакцией
доктора хим. наук В. К. Антонова
и
акад. А. Е. Браунштейна**



Москва «Мир» 1982

Диксон М., Уэбб Э.

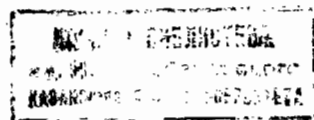
Д45 Ферменты: Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — Т. 1 — 392 с., ил.

Фундаментальная работа по биологии и химии ферментов, написанная двумя крупными английскими биохимиками, отчасти уже известная советскому читателю по переводам двух предыдущих изданий (М.: ИЛ, 1961 и М.: Мир, 1966). Перевод третьего английского издания выходит в трех томах.

Первый том содержит главы по методам выделения ферментов, кинетике их действия, классификации и специфичности ферментов.

Для энзимологов, биохимиков, химиков, студентов, аспирантов и преподавателей биологических и химических факультетов.

Редакция литературы по биологии



2007020000—015
Д 041(01)—82 ———— подп. изд-е, 82, ч. 1

© Longman Group Ltd. 1979. This edition of ENZYMES by M. Dixon and E. C. Webb is published by arrangement with Longman Group Limited

© Перевод на русский язык, «Мир», 1982

Предисловие редакторов перевода

Третье издание известной монографии М. Диксона и Э. Уэбба «Ферменты» появилось на английском языке в 1979 г., спустя семнадцать лет после выхода в свет второго издания. Эти семнадцать лет были насыщены выдающимися событиями в биохимии и в науке о ферментах — энзимологии. Достаточно сказать, что за эти годы были получены сведения о первичной и пространственной структуре большого числа ферментов. Это вывело исследования ферментов на совершенно новый уровень, когда фермент уже перестал рассматриваться как «черный ящик», а стал объектом подлинно химического изучения.

Гигантски развился методический арсенал исследований. Появились тончайшие методы разделения белков, очень чувствительные способы тестирования их активности, возникли совершенно новые кинетические приемы исследования, включая методы кинетики быстропротекающих реакций и т. п.

Все это, естественно, потребовало коренной переработки монографии о ферментах, что и было сделано авторами с привлечением К. Торна и К. Тилтона.

Авторы практически полностью сохранили структуру книги — исключена лишь глава о ферментных системах, однако каждый раздел переработан весьма существенно. Если во втором издании библиография насчитывала около 3000 ссылок, то в последнем число их возросло до 5300. Весьма сильно расширены такие главы, как кинетика действия ферментов, ингибиторы ферментов, строение ферментов. Глава, посвященная биосинтезу ферментов, подверглась полной переработке в свете современных данных о механизме биосинтеза белков.

Авторы привели номенклатуру ферментов в соответствии с последними рекомендациями Комиссии по биохимической номенклатуре. В настоящем издании русского перевода книги решено опустить приводимый авторами Список ферментов, поскольку в 1979 г. в русском переводе вышел отдельным изданием том Рекомендаций МБС (1972) по номенклатуре и классификации ферментов (с дополнениями по 1975 г.).

Книга М. Диксона и Э. Узбба сочетает в себе черты фундаментального курса энзимологии и монографического издания, насыщенного конкретным фактическим материалом. По многим разделам науки о ферментах книга может служить ценным справочным пособием.

Мы уверены, что перевод нового издания этой капитальной монографии будет с интересом принят советскими биохимиками, биологами, химиками, студентами и аспирантами, всеми соприкасающимися с этой интересной областью науки о живом.

*А. Е. Браунштейн
В. К. Антонов*

Предисловие

С 1962 г., когда вышло второе издание этой книги, энзимология прошла путь стремительного развития. За это время произошел не только обычный процесс накопления информации (о чем свидетельствует, например, увеличение числа известных ферментов до двух с лишним тысяч), но благодаря успехам молекулярной биологии были получены качественно новые данные о химическом и физическом строении ферментов, механизмах их действия и функционировании в живых клетках. Если еще несколько лет назад для суждения, например, о строении ферментов приходилось основываться на косвенных данных, то в настоящее время установлено полное химическое строение (последовательность аминокислот) многих ферментов, и на этом основании могут быть сделаны определенные заключения об их эволюции. Более того, благодаря развитию методов рентгеноструктурного анализа построены трехмерные модели полной структуры молекул ряда ферментов, при этом в некоторых случаях установлено расположение молекул субстрата, взаимодействующих с активным центром, и обнаружены конформационные изменения, происходящие при этом взаимодействии.

Крупным успехом было открытие способа кодирования структуры ферментов в нуклеиновых кислотах ядер клеток и замечательного механизма использования закодированной информации при синтезе молекул ферментов. Другим значительным достижением явилось установление важного значения изоферментов, а также субъединичного строения ферментов и связанных с ним аллостерических явлений; это оказалось возможным главным образом благодаря усовершенствованию методов разделения смесей макромолекул. Развитие в тот же период времени методов автоматической регистрации процесса протекания быстрых стадий ферментативных реакций привело к большим успехам в изучении кинетики действия ферментов.

Несмотря на желание включить в книгу весь этот новый материал, мы пытались выполнить задачу, стоявшую и в предыдущих изданиях, а именно изложить вопросы энзимологии в одной книге; этот подход получил ранее общее одобрение. Рас-

ширение некоторых разделов все же оказалось неизбежным. Большая часть материала написана заново, однако общая структура прежних изданий сохранена; опущена только глава «Ферментные системы», которая содержала в основном сведения о метаболизме, а не о самих ферментах. Список ферментов¹ насколько возможно отражает последние данные и включает все дополнения, подготовленные Комиссией по биохимической номенклатуре, а также существенную дополнительную информацию; были учтены все изменения номенклатуры ферментов.

Как и прежде мы благодарны всем, кто помог нам советами, особенно д-ру Р. Джексону (R. Jackson), который ознакомился с разделами, относящимися к биосинтезу ферментов, и сделал много ценных замечаний, и д-ру Г. Уоррену (G. Warren), который высказал ряд предложений, касающихся изложения материала в разделах по кинетике действия ферментов. Д-ру Х. Диксону (H. Dixon) мы благодарны за обсуждение разделов, посвященных влиянию pH. Мы признательны тем, кто прислал нам фотографии (многие из которых не были ранее опубликованы) для включения в Атлас кристаллических ферментов, а также авторам, редакторам и издателям за разрешение на воспроизведение рисунков.

Май 1978 г.

М. Диксон, Э. Уэбб, К. Торн, К. Типтон

¹ В переводе Список ферментов не приведен, поскольку недавно специальным изданием вышла Номенклатура ферментов: Пер. с англ./Под ред. акад. А. Е. Браунштейна. — М.: ВИНТИ, 1979. — *Прим. перев.*

Из предисловия ко второму изданию

За пять лет, прошедших после выхода в свет первого издания этой книги, в энзимологии произошло много нового. Было обнаружено более 170 новых ферментов, и в разработке ряда вопросов достигнуты значительные успехи. Главным событием за этот период явилось, очевидно, опубликование «Отчета Комиссии по ферментам Международного биохимического союза», ибо это дало возможность упорядочить номенклатуру ферментов. Во 2-м издании нашей книги мы неуклонно придерживались рекомендаций Комиссии, и уже одно это вынудило нас внести в нее значительные изменения.

Добавляя в это издание много нового материала, мы в то же время стремились сохранить неприкосновенным общий характер книги и избежать существенного увеличения ее объема. Книга подобного размера, рассматривающая общие принципы вопроса на исследовательском уровне, кажется нам по-прежнему необходимой. Мы признательны тем, кто рецензировал первое издание, за их критические замечания, а также за ряд ценных предложений, которые мы учли, насколько это было возможно, в новом издании. Интересно, что почти все рецензенты ставили нам в вину недостаточно полное изложение какого-нибудь раздела, и всякий раз это был именно тот раздел, в котором данный рецензент является специалистом. Это позволяет надеяться, что в общем нам удалось соблюсти необходимое равновесие между различными областями энзимологии. Для достаточно полного рассмотрения всех разделов потребовалось бы много-много издание.

16 августа 1962 г.

М. Диксон
Э. Уэбб

Из предисловия к первому изданию

Книги о ферментах бывают обычно или очень маленькими, или очень большими. Эта область знания расширилась в настоящее время до такой степени, что стало физически невозможно изложить в небольшой книге материал, необходимый для студента, серьезно изучающего предмет, и тем более для научного работника. В то же время многотомные издания, представляющие собой сборники статей многих авторов, призваны служить скорее справочниками, нежели пособиями для систематического изучения предмета. Большинство энзимологов ощущают острую потребность в книге «средних размеров», трактующей общие проблемы энзимологии на уровне требований исследовательской работы. Настоящая книга по нашему замыслу рассчитана на удовлетворение именно этой потребности.

Достаточно беглого взгляда на оглавление, чтобы убедиться в том, что эта книга отнюдь не представляет собой простого каталога ферментов — в ней речь идет именно об общих принципах предмета. Тем не менее мы включили в нее полный перечень всех известных в настоящее время ферментов. Этот перечень — насколько нам известно, наиболее полный из всех имеющихся в энзимологической литературе — включает свыше 650 различных ферментов; и, хотя мы не стремились обсуждать каждый из них в отдельности, фактически в ходе изложения при обсуждении различных вопросов мы затрагиваем более 400 ферментов. Для облегчения идентификации ферментов рядом с названием данного фермента дается кодовый номер, соответствующий его положению в Списке ферментов.

Приведенная в конце книги библиография, хотя она и содержит свыше 2300 наименований, отнюдь не исчерпывает всей литературы предмета. Мы пытались выбрать такие работы, которые давали бы читателю возможность получить наиболее полные сведения по интересующей его теме. Многие оригинальные работы не приведены потому, что рассматриваемые в них вопросы достаточно полно излагаются в более поздних статьях или обзорах, на которые и даются ссылки. Ссылки на литературу по каждому ферменту приведены в Списке ферментов.

Книги подобного масштаба, написанные целиком одним или двумя авторами, в последнее время вышли из моды; теперь обычно издают сборники с участием многих авторов, каждому из которых принадлежит какая-нибудь одна глава. Тем не менее мы полагаем, что большинство книг «старомодного» типа обладают определенным преимуществом, которое заключается в непрерывности и последовательности изложения. Все разделы данной книги написаны нами совместно; мы в равной мере ответственны за все ошибки, которые могут в ней встретиться, но и честь любой удачи мы также, разумеется, делим поровну.

8 ноября 1957 г.

*М. Диксон
Э. Узбб*

Благодарности

Мы благодарим: издательство Academic Press Inc. (London) Ltd. и авторов работ за разрешение опубликовать рисунки из *Journal of Molecular Biology*; издательство Academic Press Inc. и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *Bioorganic Chemistry*, *Isozymes Vol. II* и *Biochemical and Biophysical Research Communications*; M. Adams за разрешение опубликовать рисунки из *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States*; A. Lilyas за разрешение опубликовать рисунки из *Nature New Biology*; American Chemical Society и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *Journal of the American Chemical Society*, *Biochemistry* и *Essays in Biochemistry*; American Society of Biological Chemists и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *Journal of Biological Chemistry*; J. Botts за разрешение опубликовать рисунки из *Transactions of the Faraday Society*; Chung-Kuo Ko Hsueh за разрешение опубликовать рисунки из *Scientia Sinica II*; издательство Elsevier/North Holland Biomedical Press и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *Biochimica Biophysica Acta*; издательство Van Nostrand Reinhold Co. (London) и C. Gray за разрешение опубликовать рисунки из *Enzymes-Catalysed Reactions*; издательство Longman Group Ltd. и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *Companion to Biochemistry* под редакцией Bull et al. (1974); National Biomedical Research Foundation за разрешение опубликовать рисунки из *Atlas of Protein Sequence and Structure Vol. 5* (1972); H. G. Nimmo за разрешение опубликовать отрывок из его докторской диссертации; издательство North Holland Publishing Co. и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *FEBS European Journal of Biochemistry*; издательство Prentice-Hall Inc. и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *Development Genetics* (1971); The Biochemical Society и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *The Biochemical Journal*; Royal Society и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *Phil. Trans. Roy. Soc. B257* (1970); издательство John Wiley and Sons Ltd. и авторов за разрешение опубликовать рисунки из *Enzymes Physical Principles* (1970).

Глава I

Введение

Изучение ферментов представляет особый интерес, так как эта область знания находится на стыке биологических и физических наук. С одной стороны, ферменты имеют исключительное значение в биологии. Жизнь зависит от сложной совокупности химических реакций, осуществляемых специфическими ферментами, и любое изменение действия ферментов может повлечь за собой серьезные последствия для живого организма. С другой стороны, ферменты как катализаторы все больше и больше привлекают внимание физикохимиков. Изучение механизма действия ферментов представляет собой одну из самых увлекательных областей современного научного исследования.

В настоящее время наука о ферментах — энзимология¹ — превратилась в обширную бурно развивающуюся отрасль знания с многочисленными ответвлениями, тесно связанную со многими науками, особенно с биохимией и молекулярной биологией, физической химией, бактериологией и микробиологией, генетикой, ботаникой и сельским хозяйством, фармакологией и токсикологией, физиологией, медициной и химической технологией. Кроме того, она имеет важное практическое значение. Многие исследователи в различных странах сосредоточивают свои усилия на решении проблем энзимологии; созданы специальные институты для изучения ферментов. Все большее число журналов печатает статьи по энзимологии, и литература по различным разделам этой ветви науки в настоящее время очень обширна.

Иногда трудно себе представить, что энзимология возникла сравнительно недавно; зарождение этой области науки можно

¹ Слова «фермент» и «энзим» являются в настоящее время синонимами. В разных странах предпочитают употреблять либо тот, либо другой термин. В научной литературе на русском языке в равной мере используют как слово «энзим», так и слово «фермент». Пока предпочтение отдается последнему. Тем не менее для обозначения науки о ферментах мы сохраняем наименование «энзимология», чтобы не смешивать в одном слове «ферментология» корни латинского и греческого происхождения. — *Прим. ред. 2-го издания А. И. Опарина.*

отнести к первой половине XIX в., но особенно бурное развитие она претерпела в течение последних 40 лет. Хотя явления брожения и переваривания были известны с незапамятных времен, первое ясное представление о ферменте появилось, по-видимому, только в 1833 г., когда Пайен и Персо [3633] обнаружили в осадке, образующемся при добавлении спирта к солодовому экстракту, термолабильное вещество, обладающее способностью превращать крахмал в сахар¹. Это вещество, которое мы теперь называем амилазой, было названо ими диастазой (от греч. *diastasis* — разделение) за его способность отделять растворимый декстрин от нерастворимой оболочки крахмальных зерен. Название «диастаза» впоследствии было распространено на все ферменты как общее наименование².

В 1898 г. Дюкло предложил последние три буквы этого видового названия (суффикс «аза») прибавлять к корню названия того вещества, на которое данный фермент действует. Этот принцип был положен в основу применяемой ныне номенклатуры ферментов; однако несколько названий пищеварительных ферментов, оканчивающихся на «ин», сохранились до настоящего времени. Поскольку число ферментов продолжает увеличиваться, в названии фермента стали указывать не только природу вещества, на которое он действует, но также и характер катализируемой им реакции (например, лактатдегидрогеназа). Вопрос о номенклатуре ферментов мы обсудим подробно в гл. 5.

Сразу же после открытия ферментов многие исследователи обратили внимание на сходство между их действием и действием дрожжей при брожении. Так появился термин «фермент»³. Во второй половине XIX в. разгорелся большой спор между Либихом, придерживавшимся того взгляда, что брожение и сходные процессы обусловлены действием химических веществ, и Пастером, утверждавшим, что брожение неотделимо от жизнедеятельности клеток. Отсюда возникло разделение ферментов на «неорганизованные» и «организованные», т. е., как сказали бы мы теперь, на экстрагируемые ферменты и ферменты, функционирующие в живой клетке. Для того чтобы избежать применения этих неудобных наименований, Кюне [2624] в 1878 г. ввел в употребление термин «энзим». Поскольку среди ученых были распространены неправильные представления о причинах, побудивших Кюне предложить этот термин, мы цитируем высказывание самого Кюне:

¹ Историю энзимологии правильнее начинать с 1814 г. В этом году действительный член Петербургской Академии наук К. Кирхгоф открыл явление превращения крахмала в сахар в высушенном ячменном солоде. — *Прим. ред. 2-го издания А. И. Опарина.*

² Во французской технической литературе оно сохранилось в указанном смысле и до настоящего времени. — *Прим. ред. 2-го издания А. И. Опарина.*

³ От лат. *fermentatio* — брожение. — *Прим. ред. 2-го издания А. И. Опарина.*

«Таким образом, мы не намереваемся выдвигать какую-либо особую гипотезу, а только констатируем: в дрожжах (*ev ζυμη*) имеется что-то, что обладает той или иной ферментативной активностью. Название энзим, однако, применимо не только к инвертину дрожжей. Оно должно подчеркнуть, что более сложные организмы, из которых можно получить такие ферменты, как пепсин, трипсин и т. п., не столь резко отличаются от одноклеточных организмов, как это иногда принято думать». Кюне хотел подчеркнуть, что фермент находится в дрожжах, и вместе с тем противопоставить его самим дрожжам.

Спор Пастера и Либиха был разрешен после того, как Бухнеру удалось получить систему ферментов, осуществляющих брожение, из дрожжевого экстракта, не содержащего дрожжевых клеток. Однако название «фермент» сохранилось в Германии¹ до настоящего времени.

К концу XIX в. благодаря замечательным успехам в изучении структуры органических веществ, представляющих биологический интерес, стало возможным изучение пределов действия ферментов, или их так называемой специфичности. Развитием представления о специфичности ферментов и близком стерическом соответствии между ферментом и субстратом мы обязаны Эмилю Фишеру [1345]. На основании своих наблюдений над субстратами известной структуры Фишер выдвинул свое знаменитое положение о том, что субстрат подходит к ферменту так, как ключ подходит к замку. Изучение специфичности составляет в настоящее время очень важный раздел учения о ферментах, и этому вопросу посвящена гл. 6. Вследствие определенного соответствия между ферментом и субстратом фермент может действовать только на очень ограниченный ряд субстратов, и это является причиной существования множества различных ферментов. Надежное изучение специфичности ферментов, разумеется, невозможно без выделения индивидуальных ферментов в чистом виде.

До 1920 г. сколько-нибудь серьезных работ по получению ферментов в чистом виде не было. Большинство ранних экспериментов такого рода проведены Вильштеттером и его сотрудниками между 1922 и 1928 гг. (см. [1749], табл. XX). Несколько работ были выполнены в течение того же периода и другими исследователями (в качестве примера можно привести опыты Диксона и Кодама [1118] по очистке ксантиноксидазы), но ни в одном из этих случаев не удалось достичь полной очистки. Следующим важным шагом было получение ферментов в кристаллическом виде. Первым ферментом, полученным в кристаллическом виде, оказалась уреаза, кристаллы которой получил Самнер в 1926 г. [4575]. Однако эти первые кристаллы бы-

¹ См. примечание к с. 14. — *Прим. ред. 2-го издания А. И. Опарина.*

ли далеко не чистыми. За этой работой вскоре последовала серия классических работ Нортропа и его сотрудников [3473] по выделению в кристаллическом виде протеолитических ферментов. И хотя еще 35 лет назад число полученных в чистом виде ферментов было очень мало, в наше время число ферментов, полученных в чистом и кристаллическом виде, уже превышает 200, а число ферментов, очищенных до той или иной степени, превышает 1500.

Первая работа по очистке ферментов была встречена резкой критикой. Критики указывали, что «нефизиологично» выделять ферменты из клетки и что ценность представляют только те исследования, которые проводятся на неповрежденных клетках. Позднее, когда были получены первые белковые кристаллы, обладающие высокой ферментативной активностью, возникли сомнения относительно возможности кристаллизации самих ферментов. Предполагалось, что ферменты лишь адсорбированы на кристаллах инертного белка. Нортроп, однако, привел убедительные доказательства, что полученные им белковые кристаллы сами являются ферментами. С тех пор были выделены в чистом виде многие ферменты, причем все они также оказались белками. Таким образом, представление о ферменте с течением времени менялось. Сначала этим словом обозначали неопределенные влияния или свойства, присущие некоторым препаратам, потом определенные химические вещества и, наконец, специфические белки.

Основное внимание в ранний период развития энзимологии было сосредоточено на изучении ферментов пищеварения и брожения; лишь значительно позднее была осознана важная роль внутриклеточных ферментов. Фактически серьезных работ по очистке внутриклеточных ферментов не было до 1937 г., несмотря на то, что в естественных условиях вне живых клеток встречается сравнительно мало ферментов. Однако с 1937 г. положение кардинально изменилось, и то громадное число ферментов, которые известны в настоящее время, обусловлено главным образом открытием новых внутриклеточных ферментов. Огромная информация, полученная при изучении этих ферментов, привела в свою очередь к значительно более глубокому пониманию механизма многих фундаментальных жизненных процессов, особенно лежащих в основе жизни процессов метаболизма, связанных с накоплением и использованием энергии. Наши знания о таких процессах, как фотосинтез, дыхание, биологическое окисление, брожение, синтез множества необходимых для роста органических веществ, выполнение механической или осмотической работы, значительно пополнились благодаря выделению и изучению ферментов, ответственных за эти процессы.

Наиболее фундаментальной проблемой энзимологии является установление механизма действия ферментов, выяснение вопроса о том, каким образом химическое строение ферментов обеспечивает их исключительно высокую и специфическую каталитическую активность. До сравнительно недавнего времени детальные данные о химическом строении ферментов отсутствовали и изучать указанную проблему можно было только непрямыми методами. Так, например, в результате исследования кинетики действия ферментов (как видно из материалов гл. 4, это направление получило значительное развитие после классических исследований Брауна, Анри и Михаэлиса, опубликованных в начале века) оказалось возможным во многих случаях выявить последовательные стадии ферментативных реакций и высказать предположения относительно механизма действия ферментов. Другие методы (в первую очередь изотопные) внесли значительный вклад в наши представления о механизме действия ферментов; они рассматриваются в гл. 7.

Важная информация о природе участвующих в катализе химических групп молекулы фермента была получена как при исследовании уникальной специфичности ферментов, которая не свойственна другим катализаторам (гл. 6), так и при изучении действия ингибиторов и реагентов, атакующих определенные химические группы (гл. 8).

Именно возможность получения ферментов в чистом виде привела к успешному развитию структурной энзимологии в последнее время. Исследование чистых ферментов с помощью специальных химических методов (в которых сами чистые ферменты используются в качестве инструментов) позволило определить полные последовательности аминокислот в полипептидных цепях молекул многих ферментов. Далее, с помощью метода рентгеноструктурного анализа была установлена детальная трехмерная структура молекул некоторых ферментов, полученных в кристаллическом состоянии. Была определена конформация пептидных цепей, расположение различных групп, образующих субстратсвязывающий участок, и характер взаимодействия последнего с молекулой субстрата. Естественно, что эти новые данные явились значительным вкладом в понимание механизма катализа. Располагая данными о полной структуре относительно простого фермента, оказалось даже возможным чисто химическими методами синтезировать в лаборатории каталитически активный фермент. Эти структурные исследования, которые из-за технических трудностей возможны пока только с немногими ферментами, рассматриваются в гл. 10.

Исследования последнего времени способствовали также выяснению механизма биосинтеза ферментов в живых клетках и способа кодирования их химической структуры в генетическом материале хромосом. Биосинтез ферментов осуществляется

чрезвычайно интересной, но крайне сложной системой, в которой участвует ряд других ферментов; эти материалы приведены в гл. 11.

Наконец, не следует забывать, что ферменты имеют столь большое значение вследствие того, что сама жизнь тесно связана с ферментативным катализом. По необходимости развитие энзимологии происходило главным образом в направлении исследования изолированных ферментов. Только в последние годы появились возможности для изучения биологической стороны предмета, т. е. для изучения ферментов и ферментных систем непосредственно в живой клетке. Мы заканчиваем книгу главой о некоторых биологических аспектах энзимологии, о направлении, значение которого непрерывно растет.

Энзимология достигла, по-видимому, уже такой стадии развития, когда в ближайшем будущем можно надеяться пожать обильные плоды всех тех многочисленных исследований, которые были проведены в последние годы в различных направлениях. В настоящее время дальнейшее развитие происходит чрезвычайно быстро. Однако предстоит еще огромная работа; несомненно, многие важные ферменты еще не открыты, а многие из тех, которые обнаружены, почти не охарактеризованы. В настоящее время исследования сосредоточены в основном на сравнительно небольшом числе ферментов, и, вероятно, справедливо утверждать, что мы еще очень мало знаем о структуре 95% уже известных ферментов.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ТЕРМИНЫ

У энзимологов очень распространен ряд специальных терминов, и, поскольку они будут часто употребляться в этой книге, мы считаем полезным разъяснить здесь значение, которое вкладывается в них. Термины эти: «фермент», «субстрат», «активация», «активный центр», «кофермент» и «ингибитор».

Мы уже упоминали о происхождении термина «фермент». Со времени введения этого термина все яснее становится смысл вкладываемого в него понятия, хотя точное его определение является и сейчас совсем не легким делом. Были предложены самые различные формулировки. Наиболее удовлетворительной из них можно считать, вероятно, ту, которая определяет фермент как «белок, который благодаря своей способности к специфическому активированию других веществ обладает каталитическими свойствами». В этом определении имеется ряд спорных моментов, которые мы здесь кратко рассмотрим.

С одной стороны, в той своей части, которая указывает на белковую природу фермента, это определение неприложимо к таким катализаторам, как глутатион и другие коферменты. Однако в основе утверждения о белковой природе ферментов ле-

жит обобщение того факта, что все полученные до сих пор в чистом виде ферменты представляют собой белки, а также что ферменты вообще, независимо от того, изолированы они или нет, обладают свойствами, характерными для белков, например термолабильностью. Правда, раньше время от времени появлялись сообщения о получении ферментов якобы небелковой природы, но впоследствии всегда выяснялось, что авторы этих сообщений использовали слишком разбавленные растворы высокоактивных ферментов. Из этих растворов при их концентрировании выделяли ферменты, которые оказывались белками. Современное общепринятое представление о ферментах настолько тесно связано с представлением об их белковой природе, что если даже и будет открыт какой-либо небелковый макромолекулярный биологический катализатор, то, вероятно, многие будут возражать против зачисления его в категорию «ферментов». Существование подобных катализаторов небелковой природы представляется, во всяком случае сейчас, маловероятным, поскольку все полученные до сих пор в чистом виде ферменты были выделены только по прослеживанию каталитической активности, без предварительного выяснения химической природы ответственного за активность вещества.

С другой стороны, под приведенное выше определение не подходят такие каталитические белки, как цитохром *c*, так как последний является лишь переносчиком электронов и не обладает способностью активировать другие вещества. Подобного рода белки можно сравнить с другими коферментами, функционирующими в качестве биологических катализаторов лишь после того, как они активируются специфическими ферментами.

Вещества, на которые действуют ферменты и которые ими активируются, называются субстратами ферментов. Там, где речь идет о ферментативных реакциях, этот термин, первоначально предложенный немецкими учеными и употребляющийся уже свыше 60 лет, следует предпочесть более общему термину «реактант».

Понятие «активация» существует не только в энзимологии. Оно часто используется в химии без какого-либо указания на сам механизм явления, просто для обозначения того факта, что реагирующая молекула стала более реакционноспособной. Физико-химики употребляют этот термин в двух различных значениях. В рамках теории скоростей реакций Аррениуса активированными являются те молекулы, у которых запас кинетической энергии превышает некую определенную величину; согласно же более современной теории абсолютных скоростей реакций (которую мы обсудим ниже, в гл. 4), активация происходит путем образования специфического активированного комплекса, которое сопровождается изменением как кинетической, так и потенциальной энергий. В ферментативных реакциях активация

субстрата происходит путем образования фермент-субстратного комплекса. Этот процесс имеет много общего с процессом образования активированного комплекса, постулируемого теорией абсолютных скоростей. Однако эту аналогию не следует переоценивать: фермент-субстратный комплекс представляет собой более стабильную структуру, нежели активированный комплекс; фактически он в процессе своего образования и распада проходит через стадию активированных комплексов. Этот вопрос более детально обсуждается ниже.

Изучение специфичности (гл. 6) позволило установить, что субстрат соединяется не со всей молекулой фермента, а с отдельным ее участком, получившим название «активного центра». Этот термин применяется физикохимиками для обозначения особо активных участков на поверхности неорганических катализаторов примерно с 1920 г., а применительно к ферментам его начали использовать несколькими годами позже. Реакция, катализируемая ферментом, протекает в таком центре. Первоначально предполагалось, что в каждой молекуле фермента имеется много активных центров; однако сейчас стало ясно, что в большинстве случаев в молекуле (или в субъединице, если молекула является агрегатом двух или большего числа субъединиц) находится только один активный центр. За последнее время установлена полная структура ряда различных активных центров; в каждом случае было показано, что активный центр находится в углублении, поверхность которого комплементарна по форме субстрату; в этом углублении находится несколько групп, образующих водородные связи с определенными группами субстрата (гл. 10).

Во многих случаях (хотя, впрочем, отнюдь не всегда) для осуществления реакции помимо фермента и субстрата требуются еще некоторые дополнительные вещества. Подобные вещества, называемые коферментами, составляют часть каталитической системы и остаются неизменными в конце реакции. Этим они отличаются от субстратов. Однако необходимо отметить, что вещество может вести себя как кофермент в системе из двух ферментов и как субстрат для каждого из этих ферментов в отдельности. Так, NAD и NADP функционируют в качестве коферментов в сопряженных дегидрогеназных системах и в то же время служат настоящими субстратами для индивидуальных дегидрогеназ. Нередки случаи, когда вещество, функционирующее в качестве кофермента в реакции, катализируемой неочищенным ферментным препаратом, оказывается при разделении системы на два самостоятельных фермента субстратом для каждого из ферментов. Несколько примеров такого рода приведены в гл. 9.

Часто находят, что при добавлении определенных веществ, не принимающих участия в реакции, скорость реакций умень-

шается. Такие вещества обычно называют «ингибиторами». Этот термин, однако, не принято относить к таким, например, веществам, как сильные кислоты, которые просто разрушают ферментный белок. Многие из ингибиторов действуют избирательно как яды для отдельных ферментов, иногда в необычайно малых концентрациях. Изучение таких ингибиторов существенно обогатило наши знания о ферментах; кроме того, оно имеет большое значение в токсикологии и фармакологии. Отдельные ингибиторы мы обсудим подробно в гл. 8.

Глава 2

Методика работы с ферментами

Специальные приемы, применяемые при выделении ферментов, будут описаны в следующей главе; в этой же главе мы рассмотрим технику работы при изучении ферментативной активности. Характерным свойством ферментов является их способность катализировать определенные химические реакции. За исключением небольшого числа ферментов, которые могут быть обнаружены непосредственно при помощи спектрального анализа или наблюдений другого рода, присутствие ферментов обнаруживается по протеканию катализируемых ими специфических реакций, количество же присутствующего фермента определяется по скорости реакции. Поэтому измерение скорости реакции составляет наиболее существенную часть в методике исследования ферментов.

ИЗМЕРЕНИЕ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Кривые хода большинства ферментативных реакций имеют общую форму, показанную на рис. 2.1. На приведенном графике видно, что скорость реакции уменьшается со временем. Это уменьшение скорости может объясняться различными причинами. Например, продукты реакции могут угнетать фермент; степень насыщения фермента субстратом может уменьшаться в результате падения концентрации субстрата по мере осуществления реакции; при увеличении концентрации продуктов реакции более существенной может становиться обратная реакция; фермент (или кофермент) может подвергаться инактивации из-за нестабильности в данных условиях температуры или pH; в некоторых случаях может действовать одновременно ряд перечисленных выше причин. Вследствие сказанного кривые хода ферментативных реакций, как правило, не описываются обычными уравнениями для гомогенных химических реакций и получение уравнения, соответствующего экспериментальной кривой, может оказаться очень трудной задачей (гл. 4). Чтобы обойти это затруднение, при изучении ферментативных реакций используют иной подход, а именно измеряют *начальную ско-*

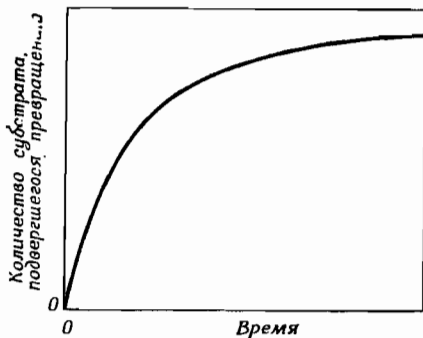


Рис. 2.1. Типичная кривая хода реакции.

рость реакции. В начальный период упомянутые выше различные факторы еще не успевают проявить своего действия и условия протекания реакции поддаются точному определению. Поэтому при работе с ферментами принято проследивать изменение начальной скорости реакции под влиянием изменений только одного из факторов, определяющих скорость реакции, при сохранении всех остальных факторов постоянными.

Для отыскания начальной скорости достаточно построить только начальный участок кривой хода реакции и определить тангенс угла наклона в начальной точке. До тех пор пока степень превращения не превысит 20% максимально возможной, графики обычно представляют собой практически прямые линии.

Количество субстрата, прореагировавшего за определенный отрезок времени от начала реакции, может рассматриваться как показатель скорости реакции только до тех пор, пока не перейден этот предел. В прошлом очень часто пренебрегали этим ограничением. Следующий простой пример показывает, что подобный подход не дает правильной характеристики процесса. Кривые хода реакции на рис. 2.2, А могут характеризовать опыты при трех различных значениях рН, с тремя разными субстратами, или с тремя различными концентрациями либо фермента, либо кофермента. Для простоты предположим, что кривые I, II и III были получены при добавлении 1, 2 и 4 единиц фермента соответственно. Если мы построим график зависимости между начальной скоростью в момент времени t_0 и количеством фермента, как это сделано на рис. 2.2, Б, то получим прямую, показывающую, что скорость реакции пропорциональна количеству фермента. Однако количество субстрата, подвергшегося превращению к моменту времени t_1 , не пропорционально количеству фермента, и сравнение кажущихся скоростей реакции, полученных путем деления соответствующих величин на промежуток времени между t_0 и t_1 , дает совершенно ошибочный результат, как это видно из рис. 2.2, Б.

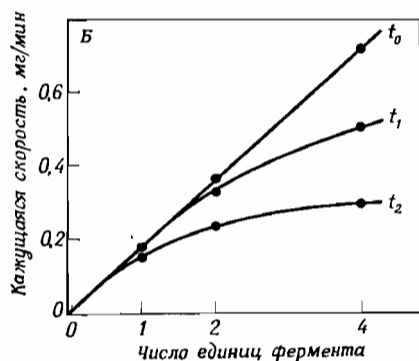
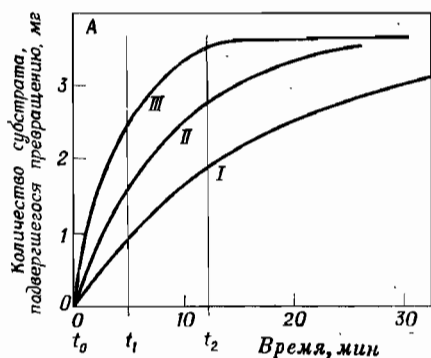


Рис. 2.2. Графики, иллюстрирующие необходимость использования величин начальных скоростей. А. Кривая хода реакции с тремя различными количествами фермента. Б. Изменение «кажущихся» скоростей, полученных по точкам графика А, в зависимости от количества добавленного фермента. I — 1 ед. фермента; II — 2 ед. фермента; III — 4 ед. фермента.

Не в каждом случае получают кривую, подобную приведенной на рис. 2.1. Иногда ряд факторов вызывает не уменьшение, а увеличение скорости в течение первой фазы реакции. В этом случае кривая имеет S-образную, или аутокаталитическую, форму с максимумом скорости в одной из промежуточных точек. В таком случае совсем нелегко решить, как охарактеризовать активность фермента — по начальной скорости, максимальной скорости или по наклону кривой в какой-либо другой точке.

По-видимому, общего правила нет, и в каждом случае следует поступать с учетом особенностей системы. Лучшим путем является установление причины ускорения (это часто удается сделать, проведя несколько предварительных экспериментов); затем модифицируют процедуру определения так, чтобы устранить действие обнаруженной причины, и обычным путем определяют начальную скорость. Например, оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3) функционирует при участии флавинового кофермента, который относительно медленно связывается с ферментом; в результате количество «активного фермента» в течение некоторого периода времени после смешивания реагентов

возрастает и наблюдается ускорение реакции [1116, 1117]. Это осложнение можно устранить, если вначале проинкубировать фермент с коферментом и запускать реакцию добавлением субстрата. В другом случае в концентрированном исходном растворе фермент находится в частично активной агрегированной форме; при разведении инкубационной смесью происходит его диссоциация (не мгновенная) в полностью активную форму. В этом случае к инкубационной смеси сначала следует добавить фермент, а затем субстрат. Далее в исходном растворе фермент может обратимо комплексоваться с примесным металлом-ингибитором; при разведении же комплекс диссоциирует. В данном случае следует поступать так же, как в предыдущем. В особом случае, приведенном на рис. 4.16, основная реакция начинается только тогда, когда исчерпывается конкурентный субстрат, выступающий как ингибитор; здесь за начальную скорость можно принять наклон прямолинейного участка.

В дальнейшем изложении (а также в главе по кинетике), когда пойдет речь о скорости реакции, под этим следует понимать начальную скорость, если не сделано специальных оговорок.

ТИПЫ МЕТОДОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Различают два типа методов изучения ферментативных реакций: методы, связанные с отбором проб, и непрерывные методы. В первом случае за самой реакционной смесью не следят, а через определенные промежутки времени отбирают пробы и в результате измерений получают ряд отдельных точек, по которым строят кривые хода реакции. Во втором случае наблюдения проводят (по ходу реакции) над самой реакционной смесью: при этом с помощью большого числа измерений или автоматической регистрации удается получать непрерывные кривые хода реакции.

При работе по методу отбора проб измеряют обычно концентрацию либо субстрата, либо продукта реакции. Если реакция проста, то для измерения ферментативной активности можно использовать оба этих пути; однако при двухстадийной реакции, в ходе которой может накапливаться промежуточный продукт, результаты, полученные этими двумя различными способами, не обязательно совпадают. При двухстадийной реакции скорость первой стадии правильно характеризуется только убылью субстрата.

В особых случаях, например при гидролизе белков и полисахаридов, молекула которых содержит много связей одного и того же типа, атакуемых одним и тем же ферментом, глубину реакции принято оценивать по числу гидролизированных связей,

а для определения степени гидролиза использовать такие методы, как формольное титрование или измерение восстановительной способности.

В опытах с отбором проб в каждом случае определения скорости обычно необходимы измерения по крайней мере в трех точках: в одной при нулевом отсчете времени, во второй по прошествии определенного выбранного промежутка времени и в третьей по истечении примерно вдвое большего времени. Это дает возможность проверить линейность графика на протяжении рассматриваемого промежутка времени. Каждую пробу необходимо немедленно после отбора смешивать с реагентом, мгновенно останавливающим ферментативную реакцию, так чтобы проба точно отражала состав реакционной смеси в определенный момент. Поскольку используемые реагенты всегда высокотоксичны для ферментов, необходимо соблюдать большую осторожность и ни в коем случае не вносить в реакционную смесь следы реагента (например, на кончике пипетки).

Большинство методов, используемых для изучения ферментативных реакций, относятся к непрерывному типу, им исследователи обычно отдают предпочтение. При работе с помощью этих методов необходимо, в сущности, одно — получить достаточное число отсчетов, чтобы быть уверенным в том, что соответствующие точки укладываются на прямую. Если же используется непрерывно регистрирующий прибор, то скорость определяют по наклону прямой. В некоторых случаях прибор может непосредственно регистрировать скорость процесса: так, например, в системе люциферазы интенсивность люминесценции прямо пропорциональна скорости ферментативной реакции [746].

НЕКОТОРЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ СООБРАЖЕНИЯ

Здесь мы коснемся некоторых на первый взгляд тривиальных моментов техники работы с ферментами. Для получения линейной зависимости между количеством фермента и скоростью реакции условия в реакционной смеси должны, насколько это возможно, поддерживаться постоянными в течение всего периода наблюдений. Реакцию следует проводить в термостате, и прежде чем в результате смешения реагентов начнется реакция, каждый из них следует довести до требуемой температуры. Необходимо предусмотреть достаточное забуферивание растворов для предотвращения заметного изменения pH в тех случаях, когда в результате реакции образуется кислота. По возможности следует выбирать условия, при которых фермент достаточно стабилен: температура не должна быть слишком высокой, и величина pH должна поддерживаться в пределах зоны стабильности фермента. Данное требование, однако, не всегда удается соблюдать при изучении фермента в широком диапазоне условий.

Так как ферменты обладают высокой каталитической активностью, особое внимание следует обращать на то, чтобы по небрежности не внести их следы в реакционный сосуд на кончиках пипеток или в виде пыли при работе с сухими препаратами ферментов, или, наконец, со следами слюны в пипетках. При работе с амилазами верхний конец пипеток непременно следует заткнуть ватой.

Скорость реакции следует всегда предварительно отрегулировать (путем подбора количества взятого в опыт фермента) с таким расчетом, чтобы измерения могли быть проведены надлежащим образом. Ферменты обычно хранят в высококонцентрированных исходных растворах, очень небольшие объемы которых используют для определения активности. Поэтому все более широкое применение для внесения фермента в опытную смесь получают различные микрошприцы, с помощью которых можно отбирать объемы порядка 0,005 мл. При запуске реакции путем добавления либо фермента, либо одного из других компонентов реакции необходимо тщательно и быстро перемешивать смесь.

При спектрофотометрических исследованиях можно использовать небольшие пластиковые плунжеры, имеющие на верхней поверхности углубление, в которое помещают вносимый раствор; добавление раствора и перемешивание достигается однократным опусканием плунжера в кювету.

ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ

Ферменты — относительно неустойчивые вещества; при неблагоприятных условиях они легко денатурируются и инактивируются. Поэтому в работе с ферментами всегда следует прежде всего заботиться о том, чтобы не допустить их инактивации. Сравнительно жесткие воздействия (сильные кислоты, высокая температура, сильнодействующие реагенты и т. д.), часто используемые в органической химии, мгновенно разрушают ферменты. Таким образом, воздействия, которым могут быть подвергнуты ферменты, строго ограничены пределами их стабильности.

Успех при работе с ферментами зависит от соблюдения условий, при которых ферменты остаются стабильными. Эти условия для разных ферментов различны, но всегда следует избегать высоких температур, а также растворов с выраженной кислотной или щелочной реакцией. Рекомендуется (там, где это возможно) не подвергать ферменты воздействию температуры, превышающей температуру тела. В настоящее время при очистке многих ферментов поддерживают температуру 0 °C как само собой разумеющееся условие. Использование для этой цели бани с охлажденным спиртом предпочтительнее, чем работа в

холодной комнате, не только потому, что при этом создаются более комфортабельные условия для работающего, но также и потому, что сосуд с жидкостью, погруженный в подобную баню, охлаждается очень быстро, в то время как в холодной комнате, будучи окружен плохо проводящим тепло воздухом, он охлаждается относительно медленно. Для работы при 0°C сосуды из нержавеющей стали (вследствие их высокой теплопроводности) предпочитают стеклянным.

Большинство ферментов инактивируются в растворах с $\text{pH} < 5$ или > 9 , хотя из этого правила имеются исключения. Поэтому важно, чтобы при доведении pH раствора фермента до определенного значения путем добавления кислоты или щелочи вокруг каждой капли добавляемого к раствору реагента не возникало зоны деструкции. Реагент следует добавлять медленно, давая ему стекать по стенке сосуда, и одновременно энергично перемешивать раствор, желательно с помощью механической мешалки. Добавление реагента следует производить, если это возможно, при 0°C .

Многие ферменты подвергаются денатурации на поверхностях раздела. Поэтому важно избегать образования пены — переливать раствор фермента из одного сосуда в другой следует по стенке сосуда. По той же причине не следует употреблять мешалки, вспенивающие поверхность жидкости. Лопастные мешалки должны быть глубоко погружены, и поток жидкости должен быть относительно спокойным. Иногда возникают трудности при фракционировании сульфатом аммония, если соль добавляется в сухом виде, так как при этом растворенный в жидкости воздух «высаливается» в виде мелких пузырьков и вызывает денатурацию фермента. Это затруднение встречается редко, но если оно имеет место, то его можно преодолеть, добавляя соль в виде насыщенного раствора.

Органические растворители, например спирт, инактивируют большинство ферментов при комнатной температуре, если только они не применяются в достаточно низких концентрациях. Поэтому фракционное осаждение ферментов спиртом или ацетоном необходимо проводить при возможно более низкой температуре, следя за тем, чтобы раствор не нагревался в результате выделения тепла при смешивании растворителя с водой. Ни одной из полученных фракций нельзя давать нагреваться даже на несколько градусов, пока растворитель не будет удален или пока в результате разведения концентрация его не станет безопасной.

Иногда для солюбилизации ферментов используют детергенты (гл. 3); однако в некоторых случаях они оказывают повреждающее действие на фермент, и, как правило, их очень трудно впоследствии удалить.

Отделение осадков путем центрифугирования обычно предпочитают фильтрованию, и центрифуга с охлаждением — незаменимый предмет лабораторного оборудования. В некоторых случаях, однако (например, в условиях высоких концентраций сульфата аммония, когда различие в плотностях между твердой и жидкой фазами слишком мало для того, чтобы можно было эффективно разделить их центрифугированием), следует предпочесть фильтрование с помощью фильтрующих средств, таких, как бумажная пульпа, целит, суперсел и т. п.

Во многих случаях даже при наиболее благоприятных условиях наблюдается медленное инактивирование фермента при стоянии. Поэтому рекомендуется проводить очистку фермента по возможности быстро, заканчивая выделение в течение 2—3 дней, если только фермент не является достаточно устойчивым.

Иногда возникают трудности в связи с необходимостью сохранять ферменты в лаборатории без потери активности. Если раствор фермента можно подвергать замораживанию и оттаиванию без потери активности, то удобнее всего хранить его в состоянии глубокого охлаждения; при этом он обычно остается стабильным в течение многих месяцев. Некоторые ферменты стабильны в концентрированных растворах солей; их можно длительное время сохранять без потери активности в форме осажденных суспензий в насыщенном растворе сульфата аммония, с тем чтобы, когда это понадобится, отцентрифугировать и растворить в воде.

Высушивание растворов ферментов при комнатной температуре обычно вызывает полную инактивацию, но высушивание в условиях высокого вакуума при низкой температуре из замороженного состояния представляет собой ценный метод; с помощью этого метода часто удается получать активный растворимый препарат, который можно хранить при комнатной температуре.

Бактериальное загрязнение растворов ферментов в период проведения самих процедур фракционирования обычно не представляет опасности, но если раствор оставляют стоять на продолжительное время на какой-либо из стадий очистки, то необходимо принимать соответствующие меры предосторожности.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТА

Всестороннее изучение фермента связано с исследованием целого ряда его характерных свойств. Нижеследующий перечень может дать представление о том, какие именно свойства имеются в виду. Однако необходимо ясно представлять, что в действительности имеется очень мало ферментов, охарактеризованных достаточно полно с учетом перечисляемых ниже свойств.

Свойства белка: гомогенность; число изоферментов; константы седиментации и диффузии; молекулярная масса; форма молекулы (отношение осей); кривая титрования; изоэлектрическая точка; электрофоретическая подвижность; степень гидратации; стабильность по отношению к изменениям pH, нагреванию, окислению и облучению; диссоциации на субъединицы; спектр поглощения и т. д.

Структура: аминокислотный состав; число пептидных цепей; последовательность аминокислот; укладка цепей и трехмерная структура молекулы (если могут быть выращены требуемые кристаллы); наличие простетической группы, специальной группы или атома металла; число простетических групп в молекуле фермента; их природа и характер присоединения; число SH-групп и их влияние на активность фермента; действие химических реагентов; спектры дисперсии оптического вращения, кругового дихроизма (КД), ЯМР- и ЭПР-спектры (см. список сокращений).

Свойства фермента: природа катализируемой реакции; в случае если в реакции участвует кофермент — его природа и тип действия; субстратная специфичность; особенности химической структуры субстрата, необходимые для связывания с ферментом, а также для осуществления реакции; стереохимическая специфичность; в случае обратимости реакции — специфичность в обратной реакции; специфичность по отношению к ингибиторам.

Характеристика активных центров: число активных центров в молекуле; их химическая структура; влияние, оказываемое на субстрат при его взаимодействии с активным центром; механизм реакции; характер действия простетической группы, если такая имеется.

Кинетические характеристики: удельная активность; молекулярная активность; абсолютная активность в расчете на один активный центр; константы скоростей соединения фермента с субстратом, диссоциации субстрата из фермент-субстратного комплекса, диссоциации продукта и суммарной реакции; влияние активаторов; влияние различных ионов при различных pH; аллостерические эффекты, последовательность стадий реакции, уравнение скорости реакции и его интерпретация в терминах связывающих участков.

Термодинамические свойства: обратимость и константа равновесия ферментативной реакции; температурный коэффициент; тепловые эффекты; величины свободной энергии и энтропии соединения фермента с субстратом, активации комплекса фермент — субстрат, превращения его в комплекс фермент — продукт и диссоциации этого комплекса на свободный фермент и продукт; сопоставление этих величин с соответствующими величинами, характеризующими суммарную реакцию; сродство фермента к субстрату; константа Михаэлиса; влияние pH на срод-

ство фермента к субстрату (для получения сведений о природе связывающих субстрат групп); сродство фермента к ингибиторам, константы ингибиторов и влияние на них pH; конкуренция ингибиторов с субстратом.

Биологические свойства: значение фермента в реакциях обмена веществ; сопряжение с действием других ферментов при осуществлении биологических реакций; распространенность фермента у различных видов живых существ и его распределение в различных тканях; внутриклеточная локализация; образование фермента из предшественников; адаптивное образование; генетика фермента, влияние генных мутаций; существование изоферментов; влияние недостатка фермента на организм; биологические эффекты избирательного «отравления» фермента; иммунологическое поведение; антиферменты.

Большинство перечисленных свойств ферментов рассматриваются в последующих главах; однако нам кажется полезным привести в этой главе некоторые данные по вопросу о технике определения двух основных величин, характеризующих соответственно скорость ферментативной реакции и сродство фермента к субстрату.

УДЕЛЬНАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ АКТИВНОСТИ

Целесообразно дать определение величине, характеризующей скорость реакции, которая может быть достигнута при данном количестве препарата фермента. В прошлом для этого пользовались самыми различными показателями. В других областях науки активность, отнесенную к единице веса, принято называть удельной, а активность в расчете на молекулу — молекулярной. Этими же обозначениями можно воспользоваться и при характеристике ферментативной активности.

Удельную активность можно выразить различными способами: 1) в произвольно выбранных единицах на 1 мг фермента (единица активности характеризует при этом превращение определенного количества субстрата или образование определенного количества продукта за определенное время); 2) в единицах константы скорости реакции на 1 мг фермента; 3) числом микромолей субстрата, превращаемых за 1 мин на 1 мг фермента; 4) числом микромолей субстрата, превращаемых за 1 мин на 100 000 г фермента.

1) Определение удельной активности числом условных единиц на 1 мг фермента представляет собой наиболее простой метод, но получаемая этим способом информация является далеко не полной. Единицы активности обычно выбирают совершенно произвольно и для разных ферментов используют различные единицы, что весьма затрудняет сравнение данных для отдельных ферментов. Нередко для одного и того же фермента

разные авторы используют различные единицы активности. В отдельных случаях для обозначения удельной активности ферментов использовали специальные показатели. Таков, например, показатель *P.Z.* (пурпурогаллиновое число) для пероксидаз.

2) Иногда для измерения удельной активности применяли константу скорости ферментативной реакции. Так, например, активность каталазы (КФ 1.11.1.6; «*Kat. f.*»; *Katalasefähigkeit*) выражали константой скорости реакции (мин^{-1}), рассчитанной по стандартному уравнению мономолекулярной реакции (протекающей в определенных условиях) и деленной на число граммов (не миллиграммов!) фермента, находящихся во всем объеме опытной пробы, равном 51 мл. Так как в действительности реакция не следует кинетике мономолекулярной реакции, этот метод нельзя считать достаточно удовлетворительным. Недоразумения возникали также и вследствие того, что одни авторы при расчете константы скорости используют десятичные, а другие — натуральные логарифмы. Для пептидаз широко использовался «протеолитический коэффициент» [2145]. При низких концентрациях субстрата реакция гидролиза идет по мономолекулярному типу, и в опыте с определенным субстратом протеолитический коэффициент представляет собой константу скорости мономолекулярной реакции (протекающей в определенных условиях), деленную на концентрацию фермента. Показатель «протеолитическое отношение» представляет собой отношение протеолитических коэффициентов, полученных в опытах с двумя разными субстратами. Этот показатель применяли для оценки гомогенности фермента.

3) Показатель «число микромолей субстрата, превращаемых за 1 мин на 1 мг фермента» принят в настоящее время по международному соглашению в качестве основы для определения удельной активности [3900].

4) Следует считать мало удачной попытку охарактеризовать молекулярную активность фермента (при неизвестной молекулярной массе), принимая его молекулярную массу в среднем равной 100 000. Если молекулярная масса фермента неизвестна, то лучше пользоваться удельной активностью, а если она известна, то следует вычислить значение молекулярной активности.

Молекулярную активность выражали: а) числом молекул субстрата, превращаемых за одну минуту на одну молекулу фермента, или б) числом молекул субстрата, превращаемых за одну минуту на один активный центр (это предполагает наличие метода, позволяющего определить число активных центров). Термин «число оборотов» в прошлом использовали для обозначения обеих этих величин. Так как это приводило к недоразумениям, то по международному соглашению рекомендуется при-

менять термин «молекулярная активность» в случае (а), в случае же (б) пользоваться термином «активность каталитического центра» [3900].

Все три величины, установленные Комиссией по ферментам Международного биохимического союза, основываются на идее стандартной единицы фермента. В отчете Комиссии [3900] говорится следующее:

«Одна единица (Е) любого фермента представляет то количество фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата в одну минуту или одного микроэквивалента затронутой группы в тех случаях, когда атакуется более одной группы в каждой молекуле субстрата. Должна быть указана температура, при которой проводится реакция; рекомендуется, где это возможно, придерживаться температуры 25 °С. Температура 25 °С была рекомендована в связи с тем, что она является стандартной в физической химии. Однако в 1964 г. Международный биохимический союз во втором издании своих рекомендаций [1265] предложил проводить определения при температуре 30 °С в связи с заявлениями из ряда стран, климатические условия которых затрудняют термостатирование при 25 °С. В 1972 г. в пересмотренных рекомендациях [1266] Комиссии по биохимической номенклатуре предлагается выражать активность фермента в *каталах* (символ *кат*); 1 *кат* это количество фермента, которое превращает 1 моль субстрата за 1 с (эта величина в $6 \cdot 10^7$ раз больше прежней единицы) в соответствии с системой единиц SI; температура, однако, не была указана¹. В 1976 г. в издании «Инструкции для авторов» Биохимического общества [412] эта единица активности была адаптирована в отношении скорости, однако снова без уточнения температуры; цитируем: «Единица количества фермента должна быть указана в каждой статье как величина характеризующая скоростью реакции (моль/с) в определенных условиях... Единицу количества фермента можно охарактеризовать также и другой скоростью, например 1 мкмоль субстрата/мин». Прочие условия, в частности pH и концентрация субстратов, должны быть по возможности оптимальными. Во избежание несообразно малых или больших величин допускается применение таких терминов, как меллиединицы (МЕ), килоединицы (кЕ) и т. п.»

«Удельная активность выражается в единицах фермента на 1 мг белка».

«Молекулярная активность соответствует числу единиц в одном микромоле фермента (при оптимальной концентрации субстрата), т. е. числу молекул субстрата, превращаемых в од-

¹ За истекшие годы «катал» как единица активности фермента не получила широкого применения в энзимологической литературе. Как правило, за единицу активности принимается количество фермента, превращающего 1 мкмоль субстрата в 1 мин, реже — в 1 с или в 1 ч. — *Прим. ред.*

ну минуту одной молекулой фермента. Если фермент имеет простетическую группу или каталитический центр, концентрация которых доступна измерению, то его каталитическую силу можно выразить в величинах *активности каталитического центра*, иначе говоря, числом молекул субстрата, превращаемых в одну минуту одним каталитическим центром».

«Рекомендуется определять активность ферментов по возможности на основе измерений начальной скорости ферментативной реакции во избежание осложнений, зависящих, например, от обратимости реакции или от образования тормозящих реакцию продуктов. Концентрация субстрата должна, если это достижимо, быть достаточной для насыщения фермента, с тем чтобы в стандартном тесте кинетика реакции приближалась к кинетике нулевого порядка. Там, где приходится применять субоптимальную концентрацию субстрата, рекомендуется определять константу Михаэлиса, что позволяет по измеренным скоростям реакции вычислить скорость реакции в системе, насыщенной субстратом».

«Если реагируют две идентичные молекулы, то единицей является количество фермента, которое катализирует превращение двух микромолей субстрата в минуту».

Следует отметить, что единицы, определение которых приведено выше, в отличие от многих ранее предлагавшихся единиц, являются абсолютными, что дает возможность сравнивать активность различных ферментов. Этими единицами можно пользоваться во всех тех случаях, когда хорошо известен характер катализируемой реакции.

Для определения удельной активности фермента необходимо измерить скорость реакции и установить то количество фермента, которое обеспечивает наблюдаемую скорость. Вторая задача не представляет трудностей, если фермент доступен в чистом виде, что позволяет получить его раствор заданной концентрации, или если количество фермента можно определить спектрофотометрически или же химически. В том случае, когда это невозможно, удельную активность фермента, очевидно, нельзя определить, хотя можно определить удельную активность *препарата* (отличающуюся от активности чистого фермента). Если известна удельная активность чистого фермента, то определение удельной активности препарата, т. е. активности на единицу веса препарата, позволяет охарактеризовать чистоту препарата.

СРОДСТВО ФЕРМЕНТА К РЕАГИРУЮЩИМ ВЕЩЕСТВАМ

Катализируемые ферментами реакции осуществляются в комплексах фермента с реагирующими веществами. Концентрации таких комплексов в данный момент определяются концентрациями фермента и реагирующих веществ, а также величина-

ми, характеризующими сродство фермента к реагирующим веществам. Поэтому определение сродства фермента к реагирующим веществам имеет чрезвычайно важное значение при изучении ферментативных реакций.

Равновесие между комплексом и его компонентами, находящимися в свободном состоянии, может быть выражено либо при помощи константы ассоциации, либо при помощи константы диссоциации. Однако уже давно при изучении кинетики действия ферментов пользуются, как правило, только константой диссоциации. Мы будем следовать этой практике, которая одобрена Международным биохимическим союзом.

Фермент может соединяться с веществами двух классов, а именно с теми, которые изменяются в процессе реакции (т. е. с субстратами), и с теми, которые в результате реакции не изменяются. Среди последних некоторые могут быть ингибиторами, а некоторые — активаторами. Особо важное значение, очевидно, имеет константа сродства фермент—субстрат.

Вопрос о зависимости скорости реакции от концентрации субстрата составляет важный раздел кинетики ферментов, и он подробно рассматривается в гл. 4. В подавляющем большинстве случаев эта зависимость выражается соотношением

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s}}, \quad (2.1)$$

где v — скорость реакции при концентрации субстрата, равной s ; V — максимальная скорость, достигаемая при концентрации субстрата, достаточно высокой для насыщения фермента; K_M — константа Михаэлиса рассматриваемого фермента для данного субстрата. Эту константу можно определить несколькими графическими методами, которые описаны в гл. 4. K_M численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции вдвое меньше максимальной. Долгое время считали, что эта константа равна константе диссоциации фермент-субстратного комплекса, однако в настоящее время известно, что это не всегда так. Поэтому необходимо различать эти две величины; по рекомендации международной комиссии наименование «константа Михаэлиса» и символ K_M следует сохранять для обозначения концентрации субстрата, при которой $v = V/2$, а наименование «субстратная константа» и символ K_s — для обозначения константы равновесия (диссоциации) реакции $E + S = ES$. Методы для определения истинной K_s описаны в гл. 4.

Ингибиторная константа K_i и активаторная константа K_A по аналогии с субстратной константой являются константами равновесия (диссоциации) реакций $E + I = EI$ и $E + A = EA$ соответственно, где I и A — ингибитор и активатор. Методы определения K_i и K_A обсуждаются в гл. 8 и 9.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

А. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Многие субстраты и продукты ферментативных реакций поглощают свет либо в видимой, либо в ультрафиолетовой области спектра. Наличие в молекуле двойной связи или кольцевой структуры обычно сказывается на характере спектра поглощения. Так как маловероятно, чтобы субстрат и продукт рассматриваемой ферментативной реакции обладали идентичными спектрами поглощения, часто оказывается возможным найти такую длину волны, при которой в результате рассматриваемого превращения поглощение значительно изменяется. Измеряя величину этого изменения, можно изучать течение данной ферментативной реакции на количественном уровне. Появление спектрофотометра Бекмана и других подобных приборов обеспечило лаборатории наиболее удобным методом для изучения ферментативных реакций, который теперь широко применяется. В тех случаях, когда можно применить спектрофотометрический метод, его обычно предпочитают любому другому вследствие его простоты и чувствительности. При этом нет необходимости отбирать пробы, не требуется каких-либо реагентов, помимо тех, которые находятся в реакционной смеси, и весь ход реакции может быть прослежен на одной небольшой пробе.

Часто, когда необходимы только сравнительные определения, для измерения скорости реакции используют величины изменений оптической плотности и единицы фермента выражают в величинах изменения оптической плотности за определенное время. Если же необходимы данные, выраженные в абсолютных единицах, то предварительно измеряют поглощение субстрата и продукта реакции при избранной длине волны, так как существование линейной зависимости между оптической плотностью и концентрацией вещества позволяет быстро выразить результаты отсчетов в форме количества прореагировавшего субстрата.

При изучении ферментативных реакций с помощью этого метода необходимо, чтобы во время измерений кювета, содержащая реакционную смесь, находилась в условиях постоянной температуры. Обычные приборы не снабжены соответствующим приспособлением, и требуется специальный держатель кюветы с кожухом, по которому циркулирует вода из прибора типа ультратермостата.

В настоящее время имеется ряд приборов, которые позволяют непрерывно регистрировать изменения оптической плотности во времени при определенной длине волны. При этом результаты записываются в виде непрерывной кривой, а не в виде от-

дельных точек; это позволяет быстро и точно определять начальную скорость реакции. Непрерывная запись становится в настоящее время одним из наиболее распространенных приемов наблюдения за скоростью ферментативных реакций.

Можно указать на отдельные типичные ферментные системы, которые изучались с помощью спектрофотометрических методов (вообще говоря, число случаев, в которых эти методы применялись, очень велико). Во-первых, имеются реакции, в которых продукт поглощает свет при данной длине волны, а субстрат не поглощает. Сюда относятся, в частности, обратимые реакции присоединения групп по месту двойных связей, катализируемые, например, енолазой (КФ 4.2.1.11) [4989] и фумарат-гидратазой (КФ 4.2.1.2) [3009, 3788]. В случае фумаратгидратазы фумарат благодаря наличию двойной связи довольно сильно поглощает при 300 нм, тогда как малат не поглощает при этой длине волны. При действии ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2) происходит изменение в кольцевой структуре субстрата; окисление гипоксантина до мочевой кислоты сопровождается значительным увеличением поглощения при 290 нм [2301].

Имеется также большая группа окислительных ферментов; в катализируемых ими реакциях у второго реагента (акцептора водорода) при восстановлении субстратом изменяется спектр поглощения. Коферменты NAD и NADP имеют, например, полосы поглощения при 340 нм в восстановленном, но не в окисленном состоянии, и это дает возможность использовать спектрофотометрический метод при изучении действия большого числа дегидрогеназ. Можно привести ряд примеров подобного рода. Флавопротеиновые ферменты поглощают при 450 нм в окисленной форме весьма интенсивно, а в восстановленной гораздо слабее. Цитохромы в восстановленной форме дают очень четкие полосы поглощения в видимой области спектра, и потому спектрофотометрический метод является идеальным для изучения процессов их окисления и восстановления. Наконец, с помощью спектрофотометрических методов можно очень точно проследить за ферментативным восстановлением феррицианида или красителей типа метиленового синего и индофенолового синего.

В табл. 2.1 приведены молярные коэффициенты поглощения ряда окислителей и восстановителей, которые обычно используются в подобных реакциях.

Таким образом, с помощью спектрофотометра легко изучать действие практически всех окислительных ферментов. К сожалению, такие ферментативные реакции, как перенос фосфатных или гликозильных групп, обычно не сопровождаются изменением поглощения, и эти реакции приходится изучать с помощью других методов.

Таблица 2.1

Молярные коэффициенты поглощения ряда окислителей и восстановителей

Вещество	Длина волны, нм	Молярные коэффициенты поглощения	
		восстановленная форма	окисленная форма
FMN	450	—	12 200
FAD	450	—	11 300
NAD, NADP	340	6 220	0
Дихлорфенолиндифенол	600	0	21 000
Метиленовый синий (в изобестической точке)	610	0	41 000
Феназинметасульфат	388	1 500	22 000
Бензо(гидро)хинон	295	2 640	322
Аскорбат	265	15 100	—
Дитионит	314	8 000	0
Ферри(ферро)цианид	420	0	1 020
Ферри(ферро)цианид	314	340	1 140
Цитохром <i>c</i>	550	29 500	8 300

Молярный коэффициент поглощения — это поглощение 1 М раствора вещества в односантиметровой кювете; молярную концентрацию раствора находят путем деления наблюдаемой величины поглощения на величину молярного коэффициента поглощения. Ссылки на источники приведены в [1112]. Указанные длины волн соответствуют максимумам полос поглощения, за исключением величин для метиленового синего, восстановленного феназинметасульфата, ферри- и ферроцианида при 314 нм и окисленного цитохрома *c*. Следует отметить, что некоторые из приведенных веществ, особенно восстановленные формы флавинов и красителей, быстро реагируют с кислородом, от которого система должна быть полностью изолирована. Приспособления для анаэробной спектрофотометрии рассматриваются в работе Диксона [1111].

Иногда в тех случаях, когда не происходит изменений поглощения при превращении обычных субстратов, оказывается возможным использовать специальный субстрат, превращение которого сопровождается изменением поглощения при подходящей длине волны. Для гидролитических ферментов в качестве таких субстратов широко используют производные нитрофенола; например, при гидролизе *p*-нитрофенилсульфата максимум поглощения смещается от 278 к 318 нм, и ход реакции, катализируемой арилсульфатазой (КФ 3.1.6.1), может быть прослежен по значительному увеличению поглощения при 330 нм [5012]. Сходным образом реакция образования тиоэфирной связи бу-

тирил-СоА-синтетазой (КФ 6.2.1.2) может быть прослежена при использовании кислоты с системой сопряженных двойных связей (например, сорбиновой кислоты, так как при образовании эфира этой кислоты возникает новая полоса поглощения в области 300 нм [4944]).

Даже если течение изучаемой ферментативной реакции не сопровождается заметным изменением поглощения, то все же спектрофотометрический метод можно нередко использовать, прибегая к добавлению к изучаемой системе другого фермента, действие которого на продукты реакции приводит к изменению спектра поглощения. Во многих случаях, например, продукт ферментативной реакции сам служит субстратом для одной из дегидрогеназ, поэтому добавление избытка (очищенной) дегидрогеназы вместе с соответствующим коферментом позволяет проследить за ходом первой реакции по восстановлению кофермента, которое определяется по увеличению поглощения при 340 нм. За образованием цитрата из аконитата под действием аконитат-гидратазы (КФ 4.2.1.3) можно проследить после добавления изокитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) и NADP [3498]. Важно отметить, что необходимо добавлять избыток дегидрогеназы (или же уменьшать в достаточной мере количество изучаемого фермента) с таким расчетом, чтобы скорость всего процесса никоим образом не лимитировалась дегидрогеназной реакцией и восстановление кофермента точно следовало за первичной ферментативной реакцией. Примером подобного рода может служить также превращение NADP в NAD под действием очищенной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) [3269], которое можно проследить в присутствии дрожжевой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) и спирта. Эта дегидрогеназа не реагирует с NADP, но, как только образуется NAD, он сразу же ею восстанавливается.

Можно назвать и еще один вариант, а именно тот, при котором продукт первичной реакции является одновременно окисленным продуктом дегидрогеназной системы. В этом случае в реакционную смесь часто добавляют дегидрогеназу и восстановленную форму кофермента и затем следят за реакцией: уменьшение поглощения характеризует при этом окисление кофермента в обратной дегидрогеназной реакции. Метод Рэкера [3787] для измерения активности 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) может служить примером такого рода. Этот фермент фосфорилирует фруктозо-6-фосфат с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата. При добавлении вместе с восстановленным коферментом избытка фруктозобисфосфат-альдолазы (КФ 4.1.2.13) (которая превращает фруктозо-1,6-бисфосфат в смесь глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата) и глицерол-3-фосфат — дегидрогеназы (КФ 1.1.1.8) (которая катализирует восстановление дигидроксиацетонфосфата с помощью NADH)

Фосфокиназная реакция может быть прослежена по окислению кофермента. Таких систем можно подобрать достаточно много, и метод не ограничивается использованием только дегидрогеназ.

Б. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

В ряде случаев флуоресцентный метод является более чувствительным, чем спектрофотометрический. Флавиновые соединения, сильно флуоресцирующие в окисленной форме, утрачивают флуоресценцию при восстановлении. NAD и NADP не флуоресцируют в окисленной форме, но в восстановленной форме обладают голубой флуоресценцией; это свойство используется как основа чувствительного метода определения для регистрации протекания ферментативных окислительных и восстановительных реакций [959, 4711].

Помимо определения скоростей реакций, о котором здесь в основном идет речь, измерения флуоресценции позволяют получить значительную дополнительную информацию. Например, при взаимодействии флуоресцентной молекулы с другими участвующими в реакции веществами или с ферментным белком нередко изменяется интенсивность флуоресценции, благодаря чему можно рассчитать константы сродства; поведение же флуоресцентных групп в молекулах белка позволяет судить об их ближайшем окружении [528].

В. МАНОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Манометрические методы представляют собой удобные и точные методы для наблюдения за ходом реакций, в которых один из компонентов находится в газообразном состоянии. Они, следовательно, пригодны для изучения оксидаз (поглощение O_2) или декарбоксилаз (выделение CO_2), а также таких ферментов, как гидрогеназа, уреазы или карбоангидраза. Однако их использование отнюдь не ограничивается реакциями подобного рода. Многочисленные реакции, при которых образуется или потребляется щелочь или кислота, могут быть изучены с помощью манометрических методов, если эти реакции проводить в бикарбонатном буфере, находящемся в равновесии с газовой смесью, содержащей определенный процент CO_2 . Образующаяся кислота будет освобождать из бикарбонатного буфера соответствующее количество CO_2 , которое можно измерить манометрически.

Примером такого рода может служить окисление альдегидной группы до карбоксильной, скажем, при действии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.12) в системе гликолиза. Границы применения манометрического метода можно расширить, дополняя, например, действие изучаемых дегидрогеназ

действием глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, и многие дегидрогеназные реакции, осуществление которых связано с участием кофермента, изучались именно манометрически [1646]. Карбоксильные группы могут образовываться и в результате гидролиза пептидной или эфирной связи, что было использовано при манометрическом изучении гидролиза белков [2592], а также при изучении действия эстераз, особенно действия холинэстеразы (КФ 3.1.1.8) [104]. Были изучены также некоторые реакции переноса фосфата, связанные с изменением ионизации фосфатного остатка [845]. Феррицианид восстанавливается многими окислительными ферментами, и его восстановление, сопровождаемое образованием водородного иона, можно измерять манометрически в бикарбонатном буфере [3768].

Манометрические методы подробно рассматриваются в ряде работ [1107, 4843]. При определении потребления O_2 они постепенно вытесняются методом с использованием кислородного электрода.

Г. ЭЛЕКТРОДНЫЕ МЕТОДЫ

Использование стеклянного электрода дает в руки исследователя другой метод изучения тех реакций, в результате которых образуется кислота. Наиболее простым приемом является регистрация изменений рН в ходе реакции, однако против него имеются два возражения. Во-первых, изменение рН в ходе реакции может, вероятно, вызывать осложнения, связанные с изменением активности фермента. Во-вторых, скорость изменения рН зависит не только от скорости реакции, но также и от буферной емкости раствора. Последнее обстоятельство представляет серьезное затруднение, так как белки обладают высокой буферной емкостью. Неочищенные же препараты фермента содержат значительное количество неактивного белка, который удаляется в ходе очистки, в результате чего изменяется буферная емкость изучаемых препаратов.

Значительно большими преимуществами обладает метод непрерывного титрования. В этом случае с помощью частых добавлений небольших количеств щелочи поддерживают приблизительно постоянный уровень рН; скорость добавления щелочи отражает скорость реакции и не зависит от количества буфера. Количество буфера влияет, однако, на точность метода: если буфера берут слишком мало, то трудно поддерживать рН на постоянном уровне, если же его берут слишком много, то метод становится нечувствительным.

В продаже имеются очень удобные автоматические приборы (рН-статы), в которых поддерживается постоянное значение рН за счет непрерывного добавления кислоты или щелочи и в то же время вычерчивается кривая, показывающая количество до-

бавленного реактива во времени. С помощью такого прибора получают кривые хода реакций для многих ферментов. Имеется прекрасный обзор по использованию рН-стата [2179].

Реакции, в которых участвует O_2 , удобно изучать полярографическим методом. Сила тока, проходящего через поляризованный платиновый электрод, зависит от концентрации O_2 в растворе, в который погружен электрод, и при непрерывном измерении можно получать кривую, показывающую изменение концентрации O_2 . Для этой цели используют кислородные электроды двух типов. Чанс [728] в большинстве своих работ по окислительному фосфорилированию пользовался вибрирующим платиновым электродом, погруженным непосредственно в реакционную смесь. Электрод Кларка отделен от реакционной смеси полиэтиленовой мембраной, через которую способен диффундировать молекулярный кислород. Этот электрод в последнее время все более широко применяется при изучении окисления субстратов суспензий митохондрий и сходными системами; описание техники работы с этим электродом приведено в работе Чеппела [738]. Полярографический метод отличается от манометрического тем, что жидкость находится в закрытой системе без газовой фазы.

Исследование окислительных ферментов, которые не взаимодействуют с O_2 , нередко удается осуществить при добавлении к системе подходящего акцептора водорода и измерении его окислительно-восстановительного потенциала с помощью гладкого платинового электрода, потенциал которого зависит от отношения концентраций восстановленной и окисленной форм акцептора. Восстановление акцептора прослеживается по изменению потенциала электрода.

Имеется также электрод для измерения концентрации CO_2 [4005, 4207], однако время установления потенциала на этом электроде весьма велико, поэтому он не может быть использован при исследовании быстро протекающих реакций.

Д. ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Многие ферменты действуют только на один из оптических изомеров своих субстратов. Если, как это часто имеет место, продукт реакции оптически неактивен, то за ходом реакции следят по изменению оптического вращения. С аналогичным положением мы сталкиваемся и в том случае, когда субстрат оптически неактивен, но в ходе реакции образуется оптически активный продукт или когда и субстрат, и продукт оптически активны, но значительно различаются по величине удельного вращения. Этот метод, хотя и не столь удобный, как другие, все же может быть использован при изучении ряда ферментов, по отношению к которым другие методы неприменимы, особенно при

изучении ферментов, действующих на углеводы. Классическим примером может служить β -фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26). При работе поляриметрическим методом опыты проводят в термостатированной поляриметрической трубке.

В некоторых случаях оптическая активность субстрата слишком мала для того, чтобы ее можно было непосредственно измерить, но иногда она значительно возрастает в результате образования комплексного соединения. Именно так обстоит дело с оксикислотами, например с яблочной кислотой, которая образует комплексы с молибдатом, характеризующиеся высокими значениями удельного вращения. Впервые таким путем изучали фумаразу, но так как катализируемая ею реакция не протекает в присутствии молибденового реагента, необходимо было отбирать пробы по ходу реакции. В связи с тем что это довольно сложная процедура, в настоящее время этот метод уступил место более быстрым спектрофотометрическим методам.

Е. МЕТОДЫ С ОТБОРОМ ПРОБ

Многие ферментативные реакции изучают, отбирая пробы через определенные промежутки времени и определяя количество субстрата или продукта химическими методами. По этому поводу можно сделать мало каких-либо общих замечаний, так как различные ферменты требуют разных методов определения. Существует, однако, несколько методов более общего характера, применимых к целым классам ферментов. Удобный колориметрический метод Фиске и Суббароу [1936] для определения неорганического фосфата находит широкое применение, так как в очень многих ферментативных реакциях участвуют различные фосфорные соединения. Таким путем можно непосредственно изучать фосфатазы, фосфорилазы и нуклеотидазы. Кроме того, пирофосфатные связи расщепляются за 10 мин в результате гидролиза в 1 н. HCl при 100°C, и выражение «10-минутный фосфор» стало общепринятым, когда говорят о неорганическом фосфате, освобождающемся под влиянием такой обработки. Это позволяет исследовать многочисленные реакции, в которых участвуют АТФ или ADP, в том числе и реакции, катализируемые некоторыми киназами и синтетазами, так как АТФ имеет две пирофосфатные связи, а ADP — только одну.

Поскольку расщепление гликозидной связи приводит к образованию восстанавливающей группы, при изучении ферментов, действующих на углеводы, широко используются методы, связанные с восстановлением меди.

Как показал Липман, добавление гидроксилamina к ацил-фосфатам приводит к образованию гидроксамовой кислоты, которая дает пурпурное окрашивание с солями окисного железа. Таким путем можно определять ацетилфосфат, и при изучении

ферментативных реакций с участием ацетил-СоА к реакционной смеси добавляют СоА и избыток фосфат-ацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.8). Например, цитрат (*si*)-синтаза (КФ 4.1.3.7) образует цитрат из оксалоацетата и ацетил-СоА, и если вместо ацетил-СоА добавить ацетилфосфат, СоА и фосфат-ацетилтрансферазу, то за реакцией можно следить по исчезновению ацетилфосфата [3502].

В ряде случаев, когда другие методы не позволяют получить необходимые данные, образование продукта удается обнаружить с помощью хроматографии. Это, по существу, метод отбора проб: через определенные интервалы времени из реакционной смеси берут пробы, наносят на хроматографическую бумагу, высушивают и проводят хроматографию. Появление и увеличение (в последовательных пробах) размера нового пятна позволяет качественно оценить протекание ферментативной реакции. Если необходимы количественные данные, то пятна вырезают, экстрагируют вещества и определяют их количество подходящим химическим или спектрофотометрическим методом. Иногда используют также субстраты, содержащие радиоактивные изотопы; количество радиоактивного продукта в пятне определяют с помощью счетчика. В некоторых случаях для отделения меченого продукта вместо хроматографии можно применять экстракцию органическими растворителями.

Главный недостаток хроматографического метода заключается в том, что вся процедура в целом занимает слишком много времени; особенно много времени — несколько часов — требуется для хроматографирования. Выделение фермента, при котором ход очистки контролировался бы с помощью такого метода, было бы, несомненно, очень медленным и трудоемким делом. По этой причине хроматографические методы не нашли очень широкого применения при работе с ферментами, за исключением тех случаев, где другие методы непригодны.

Для подробного ознакомления с методами изучения отдельных ферментов см. серийное издание «Методы энзимологии» [846].

Глава 3

Выделение ферментов

ЗНАЧЕНИЕ ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты встречаются в природе в виде сложных смесей в клетках, где обычно число их измеряется сотнями, и для того, чтобы тщательно изучить каждый отдельный фермент, его прежде всего нужно очистить. Можно, конечно, в некоторых случаях, пользуясь достаточно специфическими методами определения активности, исследовать и неочищенные ферменты. Так оно и бывало в действительности. Исследования по биохимии ферментов начались задолго до того, как были получены первые чистые ферменты. Однако в большинстве случаев примеси других ферментов мешают глубокому изучению выделяемого фермента. Иногда они действуют на субстрат, и тогда появляются продукты побочных реакций, а иногда — на продукт реакции, который превращается в какое-либо другое вещество; могут действовать они также на кофермент и даже на сам фермент. Поэтому до тех пор, пока фермент не получен в чистом виде, трудно с уверенностью сказать, какую именно реакцию он катализирует.

Часто после очистки ферментов обнаруживают, что реакции, казавшиеся простыми, на самом деле включают несколько отдельных этапов, причем каждый из этапов катализируется своим особым ферментом. Гипотетические схемы различных метаболических процессов обычно остаются неясными и полными противоречий до тех пор, пока благодаря получению в чистом виде ферментов, участвующих в том или ином процессе, не разъяснится его механизм. Примером может служить цикл лимонной кислоты, механизм которого стал ясен только тогда, когда удалось выделить фермент, катализирующий образование цитрата (КФ 4.1.3.7).

Для изучения свойств и поведения фермента как химического катализатора, необходимо иметь ферментный препарат очень высокой степени чистоты. Это особенно важно при исследовании его специфичности, ибо если обнаруживается, что неочищенный препарат катализирует какую-либо дополнительную реакцию, то всегда остается сомнение, не вызвано ли это примесью другого фермента в препарате. В настоящее время уже

нет нужды особо подчеркивать, насколько важно работать с чистыми ферментами.

Ферменты представляют интерес не только как химические катализаторы, которые можно выделить, но главным образом как компоненты метаболического аппарата живой клетки. Окружающая фермент среда в пробирке сильно отличается от окружающей его естественной среды в клетке, и нельзя не принимать во внимание, что это отличие может влиять на поведение фермента. Очистка фермента может сказываться на его активности различным образом. Очевидно, что в результате очистки могут быть удалены какие-то кофакторы, существенные для катализа, но их можно добавлять при определении активности фермента. В некоторых случаях роль кофакторов могут играть (помимо специфических коферментов) структурные компоненты клетки, такие, как мембраны, содержащие липиды; например, очищенная 3-гидроксibuтиратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.30) активна только после добавления липида [1371], а свойства некоторых других ферментов при взаимодействии с мембранами внутри клетки, по-видимому, модифицируются [2207, 2903]. Иногда свойства фермента меняются под влиянием операций, используемых при очистке, особенно при нагревании, которое в ряде случаев применяется как стадия очистки. Сказанное относится к ряду регуляторных ферментов [4445]; так, некоторые свойства сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1) меняются при переводе ее в раствор [1513], а некоторые приемы очистки, по-видимому, способствуют частичному протеолитическому расщеплению и изменению свойств фруктозо-бисфосфатазы (КФ 3.1.3.11) [4787].

В общем можно сказать, что исследование изолированных ферментов пролило свет на их каталитический потенциал внутри клетки и что отличия, наблюдающиеся между ферментами внутри клетки и ферментами, выделенными из клетки, вероятнее всего обусловлены факторами проницаемости или влиянием других компонентов системы, а не модификацией ферментов в процессе очистки. Было бы, однако, неверно думать, что естественное окружение фермента несущественно для его активности.

Целенаправленную очистку ферментов начали проводить с 1922 г.; первый кристаллический фермент уреазы (КФ 3.5.1.5) был получен Самнером [4575] в 1926 г.; к 1940 г. число ферментов, полученных в высокоочищенном виде, приблизилось к 20, и с тех пор оно продолжает увеличиваться. Ежегодно поступают сведения об очистке десятков новых ферментов, и в настоящее время общее число очищенных ферментов измеряется многими сотнями. Далеко не все они получены в кристаллическом виде, хотя некоторые некристаллические препараты, возможно, чище кристаллических; известно, что кристаллизация белка не гарантирует его чистоты, и часто в первых полученных

кристаллах белка чистота не превышает 50%. В списке ферментов, помещенном в конце третьего тома, приведено около 200 различных ферментов, полученных в кристаллической форме; однако мы допускаем, что нам известны не все такие ферменты.

МЕТОДЫ ОЧИСТКИ

По данному вопросу много полезных сведений собрано в обзоре Швиммера и Парди [4168], вышедшем в 1953 г. К этому обзору мы и отсылаем читателя за более подробной информацией.

Для удобства изложения предположим, что открыт какой-то новый фермент и что нам предстоит выделить его в чистом виде.

А. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Первое, что необходимо сделать перед тем, как приступить к работе по очистке данного фермента, — это подобрать количественный тест для определения его активности. Поскольку при выделении фермента большая часть времени уходит на определение активности во множестве различных фракций, желательно как-то по возможности ускорить эту процедуру. В данном случае быстрота определений более важна, чем высокая точность. В процессе фракционирования метод определения активности, требующий 5 мин и дающий точность 5%, предпочитают методу, требующему 30 мин и дающему точность 0,5%.

Выбор метода, естественно, зависит от типа реакции, катализируемой ферментом, и в каждом конкретном случае должен быть разработан подходящий тест. В гл. 2 приведено несколько методов, используемых при выделении ферментов.

Одно из наиболее часто встречающихся затруднений при разработке теста состоит в том, что система может оказаться более сложной, чем это представляется на первый взгляд. Допустим, например, что в процессе ферментативной реакции субстрат А превращается в вещество В и тест основан на определении этого вещества В. В действительности вполне может оказаться, что превращение идет с образованием незамеченного нами промежуточного продукта С и что в процесс фактически вовлечены два фермента: один превращает вещество А в С, а другой превращает С в В. В таком случае на той ступени очистки, на которой эти два фермента разделяются, обнаружится общее уменьшение активности при использовании данного теста. Картина может разъясниться, если при соединении неактивных фракций вновь появится активность. Следовательно, данный тест должен быть заменен тестом, позволяющим изме-

рять количество вещества С; тогда первый фермент можно очистить независимо от второго или, если это окажется неудобным, можно приготовить препарат второго фермента и добавить его в избытке ко всем пробам в качестве одного из реагентов.

Аналогичная картина наблюдается, когда в реакции, катализируемой простым ферментом, участвует кофермент, о присутствии которого в данной системе мы не знали. И в этом случае активность при очистке исчезает. Если удаленный фактор окажется одним из известных коферментов, то его можно просто добавить в пробы; если же природа кофермента неизвестна, то активность фермента может восстановиться добавлением к нему либо прокипяченного тканевого экстракта (кипячение служит для удаления ферментов и белков, так как большинство коферментов относительно теплоустойчивы), либо трихлоруксусного экстракта (нейтрализованного), либо, наконец, диализата (молекулы большинства коферментов сравнительно невелики и проходят сквозь целлофановые мембраны).

Б. ОБЩИЕ ПРИЕМЫ

Так как мы предположили, что изучаемый нами фермент ранее не был очищен, его удельная активность, а следовательно, и чистота исходного препарата, естественно, нам неизвестны. Фермент может присутствовать в ткани в количестве, составляющем от $1/10$ до $1/10\,000$ части всего материала. Поэтому необходимо иметь такую произвольно выбранную *единицу фермента*, с помощью которой можно было бы количественно выразить чистоту и активность различных фракций. В большинстве случаев выбор единицы зависит от избираемого метода определения. Если это спектрофотометрический метод, то такой единицей может служить количество фермента, которое вызывает определенное изменение оптической плотности за определенное время при данных условиях опыта; если определяется какой-то продукт реакции, то единицей будет количество фермента, которое вызывает образование определенного количества вещества в минуту, и т. д. В интересах единообразия желательно выбрать такую единицу, которая, насколько это возможно, соответствует рекомендациям Комиссии по ферментам (гл. 2). После того как выбрана единица фермента, другие показатели могут быть выражены с помощью этой же единицы. *Концентрацию фермента* в растворе выражают числом единиц в 1 мл; *удельную активность фермента*, которая является мерой чистоты ферментного препарата, выражают числом единиц в 1 мг вещества.

До последнего времени удельную активность фермента выражали различными способами: числом единиц на 1 мг всего сухого остатка, на 1 мг всех органических веществ, на 1 мг

сухого остатка, не проходящего через мембрану при диализе, или, наконец, на 1 мг белкового азота. Согласно рекомендации Комиссии по ферментам, удельную активность ферментов следует выражать числом единиц в 1 мг белка. Такой способ выражения наиболее удовлетворителен, хотя он, очевидно, не дает верного представления о достигнутой степени очистки в том случае, если в исходном материале присутствует большое количество небелковых веществ (например, полисахаридов). Дрожжевой экстракт содержит, например, большое количество углеводов (гумми), которые осаждаются вместе с белками; однако освобождение от них не будет отражено при выражении степени очистки данным способом.

Количество белка можно определить несколькими методами, многие из которых обсуждаются Бэйли [237]. Классическим методом является определение общего азота по Кьельдалю [770]. Обычно белки содержат 15—16% азота, однако вклад в эту величину могут вносить и азотсодержащие вещества небелковой природы. Последнее обстоятельство причиняет особенно большое неудобство в тех случаях, когда для фракционирования пользуются сульфатом аммония; необходимость удалять небелковые примеси еще более замедляет и без того достаточно медленную процедуру, так как сжигание по методу Кьельдаля продолжится не менее 8 ч (для полного превращения азота всех аминокислот в аммиак).

Для измерения количества белка используют несколько колориметрических методов. Разработаны количественные методы, основанные на биуретовой реакции, при которой состав белка, очевидно, не должен сказываться на результатах определения, поскольку это реакция на пептидные связи, а не на боковые группы в белке. Метод Горнелла и соавторов [1618], основанный на измерении полосы поглощения в области 550—650 нм, используется для определения значительных количеств (1—10 мг) белка в пробе. Предложены биуретовые микрометоды, основанные на поглощении ультрафиолета медно-белковыми комплексами: они позволяют определять 0,1—2 мг белка в пробе [1592, 2166]. Число небелковых веществ, которые могут влиять на определения с помощью биуретовой реакции, невелико, но следует вносить поправки на те вещества, которые присутствуют в высокой концентрации, например трис, сахарозу или соли аммония [3956].

Метод Фолина и Чиокальто, предложенный для определения количества белка [2881], основан на хромогенной природе некоторых боковых групп аминокислот, а также на присутствии в белках пептидных связей. Поскольку аминокислотный состав белков колеблется в широких пределах, при определении этим методом количества разных белков возможны значительные вариации. Метод обладает высокой чувствительностью (на пробу

достаточно 0,01—0,1 мг белка), но многие небелковые вещества мешают определению.

Ючау и Фоутс [2278] сравнили результаты, полученные при определении белков разными методами. Они исследовали разные фракции гомогената печени и обнаружили значительные расхождения в результатах.

В настоящее время для определения количества белка широко пользуются измерением интенсивности поглощения света при 280 нм, которое обусловлено присутствием в белке ароматических аминокислот. Количество этих аминокислот в разных белках различно, и поэтому интенсивность поглощения света у них неодинакова. Напомним, однако, что в сантиметровой кювете у раствора, содержащего 1 мг «усредненного» белка в 1 мл, оптическая плотность при 280 нм равна 1. Нуклеиновые кислоты также поглощают при этой длине волны, но можно сделать приблизительную поправку на их присутствие, проводя измерения и при 260, и при 280 нм [4989].

Ранее мы уже отмечали, насколько важна быстрота измерений активности ферментов. То же относится и к измерению количества сухого остатка или количества белка. Поэтому в процессе очистки предпочтителен быстрый метод определения белка путем измерения величины поглощения при 280 нм. Выиграть время важнее, чем исключить возможные ошибки за счет того, что удельное поглощение выделяемого белка иногда значительно отличается от средней величины поглощения смеси белков, присутствовавших в исходном материале. Если, однако, используется метод, при котором результаты определения зависят от присутствия какого-либо компонента в белке, то необходимо время от времени проверять, не произошли ли значительные изменения в среднем содержании этого компонента в ходе фракционирования. Такую проверку проводят, измеряя количество белка на главных этапах его очистки с помощью одного из наиболее надежных методов, таких, как биуретовый метод или определение азота по Кьельдалю.

Полезно при описании метода выделения фермента составить таблицу, по которой прослеживается процесс очистки на различных стадиях, эффективность различных операций, общая степень очистки и выход. Желательно, чтобы результаты были представлены в таблице стандартной формы. Вполне удовлетворительна содержащая необходимые сведения приводимая ниже табл. 3.1, которая состоит из восьми столбцов. В столбце 1 дается краткое описание измеряемых фракций, в столбце 2 — их объем, в столбце 3 — концентрация фермента, в столбце 4 (цифры столбца 3, умноженные на цифры столбца 2) — общее число единиц фермента во всем объеме, в столбце 5 — концентрация белка, в столбце 6 (цифры столбца 3, разделенные на цифры столбца 5) — удельная активность, в столбце 7 — выход

Таблица 3.1

**Очистка изоцитратдегидрогеназы (NADPH⁺) (КФ 1.1.1.42)
из печени свиньи [2121]¹⁾**

Фракция или процедура	Объем, мл	Концентрация, ед./мл	Общее число единиц	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	7000	2,85	19 950	35,5	0,08	(100)	(1,0)
Осаждение хлороформом (супернатант)	5800	3,6	20 880	19,2	0,187	105	2,34
Осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄ (фракция между 37,5 и 55% насыщения, диализованная)	1500	11,25	16 875	21,4	0,525	84,5	6,56
Фракционирование на ДЭАЭ-целлюлозе	2380	3,82	9 090	1,0	3,82	45,5	47,7
Фракционирование на колонке с фосфатом кальция	450	15,05	6 772	0,9	16,7	34	209
Гель-фильтрация, элюция изоцитратом	52	98	5 096	2,15	45,6	25,5	570

¹⁾ Эта таблица дана как иллюстрация стандартного способа изображения результатов очистки; приведенные в ней цифры отражают реальный эксперимент. Описание процесса очистки значительно сокращено. Для воспроизведения этого процесса следует обратиться к оригинальной статье.

(цифры получены из цифр столбца 4 при условии, что активность исходного экстракта принята за 100%), в столбце 8 — степень достигнутой очистки (цифры получены из цифр столбца 6 при условии, что первая цифра этого столбца равна 1).

В табл. 3.1 приведен пример типичной очистки фермента. Чаще всего число этапов разделения при очистке фермента приближается к 6, и на каждом этапе чистота фермента возрастает в среднем в 3 раза, хотя, естественно, возможны варианты. Общая степень очистки постепенно возрастает в несколько сотен и даже тысяч раз, а общий выход чистого фермента обычно составляет всего ~5%. В том случае, когда исходный материал достаточно доступен, низкий выход фермента не имеет особого значения.

В. ИСТОЧНИК ФЕРМЕНТА

После того как избран удовлетворительный метод определения активности фермента, полезно потратить некоторое количество времени на поиски источника, богатого данным ферментом,

если, разумеется, нет особых причин для получения его только из какого-нибудь вполне определенного источника. Количество данного фермента в различных тканях может сильно варьировать (табл. 12.3). При работе с тканью, богатой ферментом, не только получают больше фермента, при этом для получения чистого препарата достаточно в 10 и даже в 100 раз меньшая степень очистки. Естественно, следует отдавать предпочтение легко доступным источникам.

При работе с бактериями, которые обычно трудно получать в больших количествах, можно использовать феномен индукции фермента. Если выращивать бактерии на среде, содержащей соответствующий субстрат, то получают культуру, значительно обогащенную данным ферментом.

Многие ферменты сосредоточены в особых клеточных структурах, например в митохондриях. Поэтому в некоторых случаях имеет смысл сначала выделить митохондрии скоростным центрифугированием тканевых экстрактов и затем использовать их в качестве исходного материала. При этом удаляются ферменты, а также другие компоненты цитоплазмы и достигается значительная степень очистки еще до применения обычных методов фракционирования. Однако для получения митохондрий в больших количествах необходимы большие высокоскоростные центрифуги.

Г. ЭКСТРАКЦИЯ

Когда подходящий источник фермента найден, фермент необходимо перевести в раствор. Для этого обычно требуется разрушить клеточную оболочку. Вообще говоря, из животных тканей экстрагировать ферменты легче, чем из микроорганизмов, и часто для извлечения ферментов из измельченной ткани мышцы или печени достаточно простая экстракция водой. При работе с тканью, для которой характерен интенсивный гликолиз, должны быть приняты меры, предупреждающие подкисление, иначе может быть поврежден фермент. В таких случаях бывает целесообразно экстрагировать ткань буферным раствором. Иногда в целях более полной экстракции фермента необходимо тщательно измельчить ткань при помощи гомогенизатора с большим числом оборотов ножа или блендера Уоринга (хотя последним следует пользоваться с некоторой осторожностью).

Часто для разрушения клеточных оболочек приходится принимать более энергичные меры. Один из приемов, применяемых для механического разрушения ткани, состоит в растирании ее с песком или быстро встряхивании с измельченным стеклом; аналогично действуют звуковая или ультразвуковая вибрация, замораживание и оттаивание, обработка растворителями (таки-

ми, как ацетон), автолиз (либо сам по себе, либо в присутствии толуола, этилацетата или сульфида натрия) или лизис с помощью специально добавленных ферментов. Следует по возможности избегать предварительного автолиза ткани или ее обработки протенназами в том случае, если пригодны какие-либо другие методы, так как в противном случае исследователь вынужден выделять фермент из чрезвычайно сложной смеси продуктов расщепления белков, возникшей в результате переваривания. Однако часто, особенно при обработке дрожжевых клеток, автолиз оказывается единственным методом, который можно применить в достаточно большом масштабе. Высушивание ткани ацетоном не только служит хорошим методом разрушения клеточной оболочки, но позволяет также заготавливать впрок активный обезвоженный порошок. Такой порошок может храниться достаточно долго; он представляет собой удобный исходный материал, из которого фермент можно экстрагировать водой или буферным раствором. Обработку ацетоном следует проводить при низкой температуре, но даже и в этих условиях некоторые ферменты разрушаются. Особый случай ферментативного лизиса представляет обработка лизоцимом (КФ 3.2.1.17) клеток *Micrococcus lysodeikticus*. Большинство приемов механического разрушения ткани малоприменимы для работы с большими количествами материала.

Экстракция ферментов из субклеточных органелл представляет особую проблему. До недавнего времени ферменты митохондрий считались нерастворимыми и неотделимыми от самих митохондрий. Теперь мы знаем, что многие ферменты, находящиеся в митохондриях, свободно переходят в раствор, как только мембрана митохондрий оказывается поврежденной или приобретает проницаемость.

Однако некоторые ферменты прочно связаны со структурой митохондрий (возможно, в виде липопротейдного комплекса), и для их экстракции требуются специальные методы. В число этих методов входят: высушивание ацетоном, обработка материала смесью бутанола с водой, экстракция высушенных митохондрий различными органическими растворителями, экстракция водными растворами детергентов, таких, как холат, дезоксихолат, твин, тритон, типол, эмазол и др.; обработка материала хаотропными агентами, такими, как перхлорат [1776], или обработка гидролитическими ферментами, например липазами, нуклеазами или протеолитическими ферментами.

При обработке бутанолом, дающей при выделении некоторых ферментов очень хорошие результаты и очень популярной [3270], по-видимому, разрушается липопротейдный комплекс, в результате чего фермент переходит в водную фазу. Обработка детергентом, широко используемая в последние годы, в частности при выделении компонентов дыхательной цепи, приводит

иногда, к истинному растворению фермента, который и после удаления детергента остается в виде прозрачного раствора (однако полностью удалить детергент, вероятно, невозможно); иногда всю процедуру очистки фермента приходится вести в присутствии детергента, в противном случае фермент выпадает в осадок.

МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

В получаемом экстракте помимо фермента, подлежащего очистке, присутствует и ряд других веществ большой и малой молекулярной массы. Малые молекулы могут быть удалены диализом или гель-фильтрацией, после чего в экстракте остаются крупные молекулы—преимущественно молекулы белков, хотя могут присутствовать и полисахариды. Очистка состоит в основном из серии фракционирований, при которых ферментный белок отделяется от других присутствующих в растворе белков. В прошлом использовали целый ряд различных методов фракционирования, но в настоящее время пользуются относительно небольшим числом стандартных приемов, которые оказались особенно эффективными и удобными.

Последовательность этих приемов определяют экспериментальным путем, но в общем можно сказать, что более быстрая очистка достигается сменой различных методов фракционирования, а не повторением однотипных операций.

Фракционирование обязательно должно контролироваться измерением активности фермента; далеко не всегда удается получить хорошие результаты, слепо следуя описанной методике.

Для каждой стадии очистки перед обработкой основной массы раствора проводят пробное фракционирование с небольшим количеством материала. В опытах с малыми объемами всегда необходимо иметь в виду задачу проведения данной операции в тех же условиях с большими объемами. Легко, например, прогреть несколько миллилитров раствора при 55°C в течение 5 мин, но это невозможно сделать с 10 л раствора, так как очень трудно нагреть и охладить такой большой объем за такой короткий промежуток времени. Между тем, поскольку часто требуется очистка фермента в несколько тысяч раз, на первых стадиях обычно приходится иметь дело именно с большими объемами жидкости.

При всех способах фракционирования следует уделять особое внимание двум факторам, которые весьма сильно влияют на результаты, а именно значению рН и концентрации электролитов (особенно первому из них). Большинство трудностей, встречающихся при попытках воспроизвести опубликованные результаты выделения, связаны с нарушением именно этих ус-

ловий. Для успешной работы незаменим хороший стеклянный электрод.

На каждом этапе фракционирования суммарный белок делится на ряд фракций (6—12 в предварительных опытах) путем постепенного увеличения концентрации соли, количества добавленного адсорбента, концентрации органического растворителя, кислотности и т. п. с таким расчетом, чтобы большая часть фермента попадала, если это возможно, в одну фракцию. Иногда для удаления балластных белков применяют также дробную денатурацию нагреванием или изменением pH.

Неправильно при фракционировании использовать несколько порций раствора фермента и добавлять к каждой из них иное количество соли или какого-либо другого осадителя. При таком фракционировании любой данный осадок будет содержать все белки, осажденные солью при данной концентрации; другими словами, он будет содержать все компоненты предыдущих фракций. И наоборот, правильно работать только с одной порцией раствора фермента, удаляя каждую предыдущую фракцию до осаждения следующей. При таком способе каждая фракция содержит только те белки, которые осаждаются при малых изменениях концентрации соли; иными словами, таким путем достигается истинное фракционирование.

При работе с большими объемами белковых растворов белки обычно не делят на столь же большое число фракций, как в пробном опыте. Как правило, получают только три фракции, из которых две отбрасывают. Если, например, пробное фракционирование показало, что осаждение изучаемого фермента начинается только после того, как концентрация сульфата аммония достигнет 66% насыщения, и что большая часть осаждается при 69%-ном насыщении, то основной раствор нужно сразу довести до 65%, осадок отбросить, затем довести раствор до 70%, осадок, содержащий фермент, сохранить и оставшийся раствор отбросить. Однако такое фракционирование без контрольных измерений активности фермента небезопасно, так как условия осаждения белков в больших объемах не полностью совпадают с условиями их осаждения при пробном фракционировании в малых объемах. На осаждение фермента может, например, влиять присутствие белков, которые в пробном фракционировании удаляются на предыдущих стадиях, но которые при работе с большими объемами могут вызывать осаждение фермента уже при 62% насыщения сульфатом аммония. По этой причине целесообразно провести еще одно пробное разделение — на этот раз только на три фракции — до того как приступить к фракционированию в большом объеме. Это позволит убедиться в том, что границы концентраций определены правильно.

А. ФРАКЦИОННОЕ ОСАЖДЕНИЕ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ pH

При работе с экстрактами животных тканей часто бывает очень выгодно в качестве первой ступени (до начала основной очистки) довести реакцию среды до pH 5,0, оставить экстракт стоять на несколько минут и затем отцентрифугировать. В результате удаления из экстракта большого количества нуклеопротеидов и нерастворимых частиц нередко удается превратить мутный экстракт в совершенно прозрачный раствор. Правда, иногда при этом случайно может быть осажден тот или иной фермент.

Б. ФРАКЦИОННАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ НАГРЕВАНИЕМ

Это другой способ обработки, иногда весьма удобный как предварительная ступень при работе с относительно термостойкими ферментами. Тепловая денатурация белков характеризуется высоким значением температурного коэффициента; поэтому температура, вызывающая разрушение, обычно достаточно четко ограничена и различна для каждого белка. Прогревая раствор в течение определенного времени при температуре немного ниже той, при которой фермент разрушается, можно иногда вызвать коагуляцию большого количества балластного белка, а затем отделить этот белок на центрифуге и отбросить. Можно также использовать специфический стабилизирующий эффект субстрата. В присутствии субстрата раствор фермента удастся иногда нагреть на 10°C выше той температуры, которая в отсутствие субстрата вызывает разрушение фермента. Это дает возможность избавиться от большого количества балластных белков [216, 635].

Для нагревания лучше всего иметь три водяные бани: одну с желаемой температурой, одну с несколько более высокой температурой и одну холодную. Раствор наливают в круглодонную колбу, которая должна быть наполнена не больше, чем наполовину; колбу помещают в наиболее горячую баню и быстро вращают так, чтобы раствор ни в одной части не перегревался. За температурой раствора все время следят и, как только раствор нагреется до желаемой температуры, колбу переносят в баню с той же температурой, где и оставляют на определенный срок (в первой бане тем временем нагревается следующая порция раствора). После окончания прогрева колбу переносят в холодную баню, где также вращают, чтобы быстро охладить ее содержимое на несколько градусов. После этого раствор можно оставить стоять до тех пор, пока он совсем не остынет. Время нагревания составляет обычно 10—15 мин.

В. ФРАКЦИОННОЕ ОСАЖДЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Фракционирование органическими растворителями — один из стандартных приемов разделения белков. Кон и его сотрудники [828] для разделения белков крови широко использовали этанол. Исследуя возможность применения различных растворителей для разделения ферментов мышечного экстракта, Асконас [171] пришла к заключению, что самое четкое разделение и наименьшие потери дает ацетон. Для получения хороших результатов при фракционировании белков ацетоном требуется низкая концентрация электролитов (менее чем $M/30$), и поэтому желательно предварительно белковый раствор диализовать. Раствор, однако, не должен быть полностью свободен от электролитов, иначе осадки не удастся отцентрифугировать. Было найдено, что наилучшие результаты при работе с мышечной тканью получаются, когда рН поддерживается на уровне 6,5.

Поскольку большинство ферментов инактивируются органическими растворителями при комнатной температуре, необходимо принимать специальные меры для поддержания низкой температуры на всем протяжении работы. Раствор фермента помещают в металлический сосуд из нержавеющей стали или алюминия, снабженный хорошей мешалкой и погруженный в баню, температура которой поддерживается на уровне -5°C . Ацетон находится в мерном цилиндре, также погруженном в баню, и под небольшим давлением воздуха выталкивается маленькими порциями через капилляр на стенку металлического сосуда. Он стекает тонким слоем по холодной металлической поверхности до смешивания с белковым раствором. Добавление растворителя начинают сразу же после того, как температура раствора упадет до 0°C (чтобы предупредить замерзание), и продолжают до получения желаемого количества осадка для первой фракции (или пока не будет достигнута желаемая концентрация ацетона). Затем раствор центрифугируют в центрифуге с охлаждением при той же самой температуре (обычно достаточно нескольких минут). Центрифугат вновь помещают в металлический сосуд и продолжают добавление ацетона. Осадок либо подвергают лиофильной сушке, либо немедленно растворяют в достаточном количестве холодной воды или буфера, для того, чтобы разбавить ацетон до безвредной концентрации; можно также подвергнуть раствор диализу на холоду (при температуре замерзания воды).

Определение ферментативной активности проводят в растворенных белковых фракциях. Нельзя определять активность фермента в основном растворе, из которого ведется осаждение белков, поскольку возрастающая концентрация ацетона может оказывать значительное влияние на результаты.

Некоторые ферменты очень устойчивы к ацетону. При работе с ними выгодно оставить раствор с ацетоном стоять при комнатной температуре: ацетон вызовет интенсивную денатурацию и инактивацию сопутствующих белков и ферментов, после чего их можно удалить.

Г. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СОЛЯМИ

Фракционирование солями применяется очень широко. Чаще всего для фракционирования белков употребляют сульфат аммония, так как он хорошо растворим в воде и на большую часть ферментов не оказывает вредного действия. Более того, на многие ферменты он оказывает даже стабилизирующее действие, и потому при работе с ним нет необходимости проводить фракционирование белков при низкой температуре. Часто количество выделяемого фермента во всех фракциях в сумме составляет 100%, но обычно при разделении жертвуют некоторым количеством фермента в отбрасываемых фракциях, чтобы обеспечить большую чистоту.

Для фракционирования белков целесообразно пользоваться сульфатом аммония хорошего качества, чтобы не вносить в раствор токсичных примесей или свободной кислоты, имеющейся в некоторых образцах соли. Даже чистые препараты сульфата аммония имеют слабокислую реакцию; поэтому следует тщательно контролировать pH. Для того чтобы не увеличивать объем, к белковому раствору обычно добавляют твердую соль.

Фракционирование опытным путем удобно проводить, поместив раствор фермента в центрифужную пробирку, а твердый сульфат аммония — в обычную пробирку. Пробирку с сульфатом аммония взвешивают и к раствору фермента добавляют такое количество соли, которое способно осадить белок в количестве, достаточном, чтобы составить одну фракцию. При этой процедуре внимательно следят за тем, чтобы растворился весь добавленный сульфат аммония. Затем вновь взвешивают пробирку с оставшимся сульфатом аммония. Разница в весе соответствует весу соли, добавленной к раствору фермента. При осаждении белков сульфатом аммония рекомендуется выждать не менее 15 мин, а если возможно, то и дольше, до начала центрифугирования; в противном случае не будет четкого разделения фракций. Осадки не всегда легко отделяются на обычной центрифуге, и может оказаться желательным использовать скоростную центрифугу (10 000 об/мин). Эти осадки обычно хорошо отделяются на складчатых бумажных фильтрах под собственным давлением, но такая процедура занимает много времени. Фильтрование с отсасыванием обычно неэффективно, если не используются дополнительные фильтрующие средства, однако эти последние могут адсорбировать часть фермента, и поэтому они не

годятся при фракционировании малых объемов, хотя в работе с большими объемами их применяют вполне успешно.

После того как первая фракция отцентрифугирована, раствор переносят в другую центрифужную пробирку и продолжают добавление соли. Осадок растворяют в малом объеме воды или буферного раствора.

В полученном растворе белка проводят определение ферментативной активности; нецелесообразно проводить определение активности в маточном растворе, остающемся после осаждения определенных фракций, из-за высокой концентрации содержащейся в нем соли.

Обычно при повторении пробного фракционирования на основной массе раствора трудностей не возникает. Можно сэкономить немного времени на процедуре отвешивания соли. Известно, что обычные мелкие кристаллы сульфата аммония вместе с заключенным между ними воздухом имеют плотность около 1, так что если заполнить мерный цилиндр сульфатом аммония, то деления укажут число граммов последнего. Этот метод недостаточно точен, чтобы заменить взвешивание, но он помогает быстро отмеривать приблизительное количество соли.

При описании методов выделения ферментов количество сульфата аммония обычно выражают в процентах насыщения и часто употребляют выражение вроде «... фракция, осажденная между 55 и 60% насыщения». Правильно рассчитать количество соли, которое нужно добавить к данному объему раствора, чтобы получить указанный процент насыщения, — отнюдь не простое дело. Поскольку при растворении соли меняется объем жидкости, количество соли, которое нужно добавить к данному объему жидкости, не пропорционально требуемому проценту насыщения. Так, например, количество соли, которое нужно добавить, чтобы получить 50% насыщения, составляет только 41%, а не 50% того количества, которое требуется для 100%-ного насыщения. На рис. 3.1 приведена номограмма, с помощью которой можно определить количество соли, необходимое для перехода от одной степени насыщения к другой [1108]. Обычно при фракционировании сульфатом аммония за 100%-ное принимают полное насыщение при комнатной температуре, а не при 0°C.

В основе теории фракционирования ферментов высаливанием [1121] лежит хорошо известное уравнение

$$\lg s = \beta' - K_s' \frac{I}{2},$$

где s — растворимость фермента, выраженная в граммах на 1 л раствора; $I/2$ — ионная сила в молях на 1 л раствора; β' и K_s' — константы. При увеличении концентрации соли наступает момент, когда растворимость фермента соответствует его кон-

центрации и фермент начинает выпадать в осадок. При дальнейшем повышении концентрации соли большая часть фермента переходит в осадок; обычно (в случае сульфата аммония) выпадение фермента в осадок в основном завершается при дальнейшем увеличении насыщения раствора на 5—10%. Точная концентрация соли, при которой начинается высаливание, определяется не только значением рН, температурой и природой соли, но также и концентрацией фермента. Таким образом, чтобы успешно повторить условия очистки по опубликованным данным, следует довести исходную активность фермента в растворе до тех же значений, с которыми работали авторы.

Обычно не стоит тратить время на повторное фракционирование сульфатом аммония в одних и тех же условиях несколько

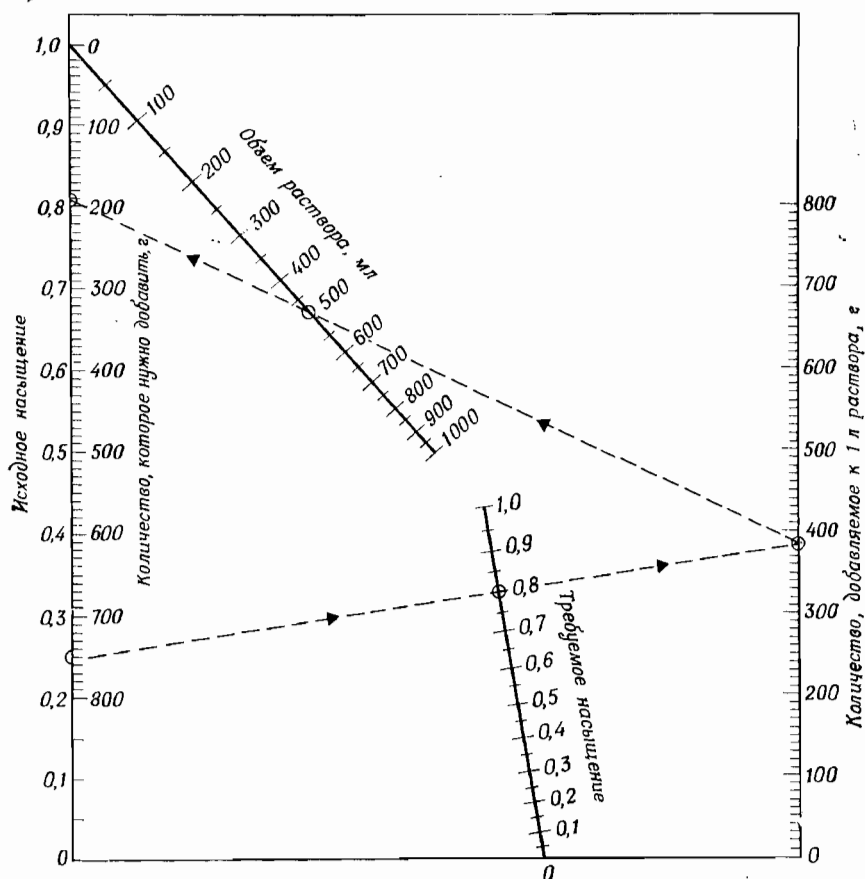


Рис. 3.1. Номограмма для вычисления количества сульфата аммония, которое необходимо добавить, чтобы получить заданный процент насыщения [1108].

раз подряд. Однако, если при фракционировании варьировать рН или температуру, то порядок, в котором будут осаждаться различные белки, может существенно меняться, и в таком случае имеет смысл проводить последовательно фракционирование при различных условиях.

Д. ФРАКЦИОННАЯ АДСОРБЦИЯ

Это один из наиболее важных и ценных методов фракционирования ферментов. Фракционную адсорбцию можно проводить двумя способами: при первом способе последовательно при перемешивании вносят адсорбент в раствор фермента и затем каждую порцию отделяют центрифугированием. При втором способе ферментный раствор пропускают через колонку с адсорбентом и с помощью коллектора собирают фракции, как описано в разд. Е.

В первом методе если фермент адсорбируется, то его отделяют от других компонентов раствора, а затем экстрагируют или элюируют с адсорбента. Если же фермент не адсорбируется, то обработку адсорбентом можно использовать для удаления из раствора фермента большого количества балластных веществ.

В настоящее время в качестве адсорбентов используются главным образом гель фосфата кальция и гель гидроокиси алюминия Сг ; они имеют очень широкое применение¹. Для адсорбции нежелательных примесей применяли древесный уголь [1118, 3267]; иногда используют другие адсорбенты, например

¹ *Приготовление геля фосфата кальция* [2383]. 150 мл раствора хлористого кальция ($132 \text{ г CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 1 л) разбавить до 1600 мл водопроводной водой и встряхивать со 150 мл раствора трехзамещенного фосфата натрия ($152 \text{ г Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1 л). Реакцию среды довести до рН 7,4 разбавленным раствором уксусной кислоты, и образовавшийся осадок 3 или 4 раза промыть большим объемом воды (15—20 л), каждый раз сливая жидкость. Затем осадок промыть дистиллированной водой на центрифуге (выход сухого вещества 9,1 г). Мы суспендировали его в дистиллированной воде и оставляли стоять приблизительно в течение месяца. Затем слой прозрачной воды сливали, гель тщательно встряхивали и определяли вес сухого вещества в 1 мл. После этого препарат был готов к употреблению. Его следует хранить в темноте.

Приготовление геля гидроокиси алюминия Сг [5107]. Растворить 300 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 6,5 л воды, нагреть до 60°C и добавить 420 мл 20%-ного (по весу) NH_3 (т. е. 77,5 г NH_3 ; теоретически — 76,6 г). Раствор должен иметь слабощелочную реакцию в течение всей последующей процедуры осаждения. К нему прилить горячий раствор, содержащий 500 г $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды, при энергичном перемешивании. Продолжать перемешивать в течение 15 мин, поддерживая температуру не ниже 60°C . Разбавить взвесь до 40 л, дать осадку осесть (осаждение должно быть довольно быстрым) и жидкость слить. Промывание повторить несколько раз, и каждый раз сливать водный слой; к четвертой промывной воде добавить 80 мл 20%-ного NH_3 . После 12—20 промываний вода становится опалесцирующей; осадок промыть еще 2 раза и оставить на несколько недель для перехода Са-формы в Сг -форму.

гель $Zn(OH)_2$. Однако гель фосфата кальция, по-видимому, лучше других отвечает предъявляемым к адсорбенту требованиям.

Лучше всего адсорбция происходит в слабокислых растворах, при pH 5—6 и при низкой концентрации электролитов. Присутствие сколько-нибудь значительного количества солей обычно мешает адсорбции, поэтому в данном случае требуется большее количество адсорбента. В целях экономии адсорбента полезно предварительно проводить диализ. Описываемый метод фракционирования относится к числу быстрых, так как равновесие между адсорбентом и раствором наступает очень скоро, а для того, чтобы отцентрифугировать адсорбент, требуется всего несколько минут.

Процедура состоит в последовательном добавлении порций геля к раствору фермента, перемешивании полученной суспензии, центрифугировании и удалении каждой порции геля перед добавлением следующей. В отличие от других методов фракционирования активность фермента можно определить в небольших порциях основного раствора и таким образом удается проследивать эффективность адсорбции фермента. В частности, при работе с фосфатом кальция нередко можно обнаружить, что первые порции адсорбента совершенно не адсорбируют фермент, но в то же время адсорбируют другие белки; затем сразу обычно в одной или двух порциях геля из раствора адсорбируется фермент, после чего остается неактивный раствор, который все еще содержит большое количество белка. Наибольшая степень очистки обычно получается в том случае, когда количество адсорбента добавлено с таким расчетом, чтобы первые (отбрасываемые) фракции удаляли около 10% фермента и 10% фермента оставалось в растворе после удаления из него активных фракций.

Далее необходимо элюировать фермент из адсорбента в активных фракциях. Если фермент не элюируется водой, то выгодно промыть гель, диспергируя его в воде и повторно центрифугируя. Для диспергирования геля в промывающих жидкостях или элюентах при работе с большими объемами требуется быстродействующая мешалка. Часто фермент элюируется слабощелочными растворами буферов, например фосфатным буфером с pH 7,6. Если же этим буфером не удастся элюировать фермент, то это обстоятельство следует считать весьма благоприятным, так как при повторении элюции фосфатным буфером до прекращения перехода в раствор белка можно достигнуть более высокой степени дальнейшей очистки фермента. Элюцию большей части материала, оставшегося адсорбированным, почти всегда можно осуществить с помощью раствора фосфата, содержащего около 10% сульфата аммония [216]. Этот метод элюции с успехом применялся в работе с различными ферментами. Объ-

ем элюирующей жидкости не должен быть слишком большим и не должен превышать объема отцентрифугированного геля. Лучше проводить элюцию несколько раз малыми порциями, чем один раз большим объемом элюента.

Е. КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В последние годы метод очистки ферментов путем хроматографии на колонках стал наиболее эффективным среди различных методов разделения. Вне зависимости от того, на чем основано разделение белков — на адсорбции, ионном обмене, избирательном сродстве к иммобилизованным лигандам или эффектах молекулярного сита, — техника работы во всех случаях практически одинакова. Процесс начинают с нанесения белка, растворенного в подходящем растворителе (буфере), на колонку, предварительно уравновешенную этим же растворителем. Затем через колонку пропускают либо определенный буферный раствор, либо извлекают белок ступенчато растворами элюента в возрастающей концентрации или же градиентной элюцией, или, наконец, специфическим для выделяемого фермента лигандом. Элюат собирают на коллекторе фракций. В получаемых фракциях определяют ферментативную активность и количество белка.

Гели, используемые для фракционирования методом адсорбции (разд. Д), не подходят для работы на колонках. Для хроматографии на колонках применяют специальные препараты. Так, можно, например, использовать определенные формы фосфата кальция, смешанные с суперцелом [4607], целлюлозой [3013] или целитом. Фосфат кальция может быть превращен в микрокристаллический гидроксилapatит¹, который используют в колонках без добавления к нему какого-либо гранулированного материала.

В типичном опыте в колонку помещают гель фосфата кальция, смешанный с 5—10-кратным количеством (по весу) целита. Раствор белка перед нанесением на колонку следует развести

¹ *Приготовление гидроксилapatита* [2774]. 2 л 0,5 М Na_2HPO_4 и 2 л 0,5 М CaCl_2 слить со скоростью 15 мл/мин в 5-литровый сосуд при постоянном перемешивании механической мешалкой. Надосадочную жидкость отсосать, осадок 4 раза промыть порциями воды по 3 л каждая. К осадку, суспендированному в 3 л воды, добавить 100 мл 40%-ного (по весу) NaOH и суспензию кипятить в течение 1 ч при помешивании. Дать осадку в течение 5 мин осесть, после чего надосадочную жидкость отсосать и осадок в течение 5 мин взбалтывать с 4 л воды. Эту процедуру повторить 3 раза. Затем к осадку прилить 4 л 0,01 М фосфатного буфера, pH 6,8 и довести смесь почти до кипения при постоянном перемешивании. Вновь дать взвесить осесть в течение 5 мин, после чего надосадочную жидкость отсосать. Эту процедуру повторить 1 раз с 0,01 М и 2 раза с 0,001 М фосфатным буфером, каждый раз кипятить суспензию в течение 15 мин. При хранении в 0,001 М фосфате препарат стабилен в течение года.

10 мМ фосфатным буфером с нейтральным значением рН, соотношение фосфата кальция и белка должно составлять примерно 5:1 (по весу). В этих условиях многие белки адсорбируются на поверхности геля. Далее проводят элюцию выделяемого фермента либо с помощью солевого градиента, либо ступенчатой элюцией, т. е. возрастающими концентрациями того же фосфатного буфера. Описание применения колонок с фосфатом кальция дано в работе [4753].

Для ионообменной хроматографии ферментов обычно используют производные целлюлозы или смолы. Могут быть использованы целлюлозы либо «волоконистые» с нативной, относительно неизменной физической структурой полисахаридов, либо «микрогранулированные», из которых удален аморфный материал, а полисахаридные цепи сшиты поперечными связями химическими методами. Микрогранулированные формы более тонко измельчены, и при их упаковке получают более компактные колонки, однако при повторном использовании они требуют более тщательной обработки, чем волокнистые материалы. В последнее время целлюлозные гели используют в качестве матрицы для прикрепления ионообменных групп [1069].

Катионообменники, используемые для хроматографии, несут отрицательно заряженные группы (например, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ в карбоксиметилцеллюлозе, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ в сульфэтилцеллюлозе, $-\text{COO}^-$ в слабокислых акриловых смолах), присоединенные к матрице; значения рК этих групп находятся в области величин от 2 до 7. Наиболее широко используемыми анионообменниками являются диэтиламиноэтилцеллюлоза [ДЭАЭ; $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$], триэтиламиноэтилцеллюлоза [ТЭАЭ; $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$] и эктеола-целлюлоза (целлюлоза с присоединенным к ней триэтаноламином); значения рК ионообменных групп этих целлюлоз находятся в области величин от 7 до 10. Плотность заряженных групп на углеводной матрице низкая—она варьирует от 0,1 до 5 мэкв/г,—но такая плотность весьма выгодна, так как позволяет проводить элюцию крупных полиэлектролитов в относительно мягких условиях.

Чаше других ионообменников для фракционирования ферментов используются карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза) и диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза). При работе с катионообменником фермент следует наносить в условиях, способствующих максимальной адсорбции на ионообменнике, а именно в буфере, имеющем рН около 5 и содержащем 10 мМ катион (обычно Na^+). При рН буфера ниже изоэлектрической точки фермента последний будет нести положительный заряд и образовывать ионную связь с кислотными группами ионообменника. Последующее постепенное увеличение ионной силы и (или) рН элюирующего буфера (до примерно 500 мМ

катиона и рН 8) приводит в результате катионного обмена и нейтрализации положительного заряда на ферменте к освобождению фермента из его связи с ионообменником. Если условия элюции тщательно подобраны, может быть достигнута высокая степень очистки. При работе с ДЭАЭ-целлюлозой используется сходная процедура с той лишь разницей, естественно, что адсорбцию проводят при рН 8 и в среде с 10 мМ фосфата или хлорида; градиентную элюцию осуществляют при постепенном снижении рН до 5 и увеличении концентрации хлорида до 500 мМ или фосфата до 200 мМ; это часто обеспечивает подходящие начальные условия для разделения.

Данные об ионообменниках на целлюлозной основе приведены в обзоре [3656]. Для градиентной элюции целесообразно использовать буферные системы, в которых противоион (т. е. ион с зарядом, противоположным заряду эффективного иона) представлен одной формой (чтобы избежать образования в элюирующем буфере цвиттерионов), употреблять короткие колонки и наносить на колонку растворы белка с относительно низкой концентрацией. Ионообменники могут быть также использованы для хроматографии белков в условиях определенных конечных коэффициентов распределения (равновесная хроматография). В настоящее время ее используют главным образом при работе с относительно небольшими белками, не применяя ступенчатую или градиентную элюцию. Этот метод является в ряде случаев очень эффективным, так как для разделения веществ достаточны очень небольшие различия в свободной энергии адсорбции ($\sim 0,25$ Ккал/моль) [1104].

Повышения избирательности при ионообменной хроматографии можно достигнуть с помощью приема, который называют элюцией субстратом. В простейшем виде этот прием состоит в том, что фермент вносят в колонку в условиях, при которых его связь с ионообменником весьма слабая; при добавлении специфического субстрата, аналога субстрата или ингибитора нейтрализация заряженных групп фермента позволяет осуществить его избирательное элюирование с колонки. Поскольку вещество, являющееся субстратом, естественно, подвергнется на колонке превращению под действием фермента, целесообразно для специфической элюции использовать один из субстратов в случае двухсубстратной реакции или же аналог субстрата [5249].

Специфичность фермента можно также использовать в хроматографии не на стадии элюции, а на стадии связывания. При *аффинной хроматографии*, применяемой для фракционирования ферментов, используют лиганд (субстрат, аналог субстрата, ингибитор или эффектор), иммобилизованный на нерастворимом носителе. Такой сорбент избирательно связывает фермент из раствора, пропускаемого через колонку. Элюируют фермент различными способами, приводящими к диссоциации комплек-

са фермент — лиганд. Выбор носителя, лиганда и условий элюции зависит от фермента. Чаще других веществ в качестве носителя используют агарозу, но кроме агарозы для этой цели применяют также полиакриламидные гели и стеклянные шарики. Лиганд должен быть соединен с носителем таким образом, чтобы не была нарушена его способность взаимодействовать с ферментом. Для того чтобы элюировать вещество с колонки, часто бывает достаточно изменить pH среды или включить в состав элюирующего раствора растворимый лиганд, который будет конкурентно вытеснять фермент из его комплекса с присоединенным к носителю лигандом. Недавно были опубликованы обзоры по аффинной хроматографии [924, 1315]. О'Карра и Бэрри указывают, что для некоторых полисубстратных ферментов с успехом может быть использована своеобразная «негативная» элюция. Так, лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) задерживается на колонке с сефарозой с оксаматом (аналогом второго субстрата, пирувата) в качестве лиганда только в том случае, если в состав элюирующей жидкости введен NADH (первый субстрат). Если затем NADH исключают из раствора, то лактатдегидрогеназа элюируется с колонки. С помощью указанного приема из экстракта плаценты удалось получить почти чистый фермент за один этап выделения [3497].

Смесь белков можно разделить по их молекулярным размерам методом гель-фильтрационной хроматографии. В этом методе используются колонки из гелей поперечно сшитого декстрана, гранулированного полиакриламида или агарозных гелей в виде шариков, которые выполняют роль «молекулярных сит». В колонке из пористых гранул часть раствора занимает пространство между гранулами, а часть находится внутри пор гранул. Гель-фильтрация — одна из форм распределительной хроматографии, при которой растворенное вещество (фермент) распределяется между более подвижной (наружной) и менее подвижной (внутренней) частями раствора. Степень удержания растворенного вещества на колонке зависит от эффективности его проникновения в поры геля. Таким образом макромолекулы обычно выходят из колонки в порядке убывания их молекулярных размеров.

Декстраны, выпускаемые в виде сефадексов (более восьми типов), позволяют фракционировать белки по размеру молекул в области молекулярных масс примерно до 250 000; в этой же области молекулярных масс функционируют и гранулированные полиакриламидные гели, 10 типов которых поступает в продажу под названием биогель. Гранулированные агаровые гели, выпускаемые рядом фирм, позволяют фракционировать белки с молекулярными массами в пределах 50 000—40 000 000.

Теоретические основы гель-фильтрации пока еще мало разработаны, однако поведение растворенного вещества, по-види-

мому, зависит в первую очередь от его стоксова радиуса. Молекулы, имеющие приблизительно сферическую форму, разделяются в соответствии с теорией, в то время как поведение асимметричных молекул значительно отклоняется от теоретического [121].

В настоящее время применяются ионообменники на основе декстрана и полиакриламидные гели, содержащие ионогенные группы (карбоксиметильные, диэтиламиноэтильные и др.); плотность ионизируемых групп в случае декстрановых ионообменников (2—5 мэкв/г) может быть выше, чем у целлюлозных ионообменников. Следовательно, они имеют высокое сродство к полиэлектролитам и в то же время сохраняют в значительной степени свойства молекулярных сит.

Ионообменные гели часто успешно использовали для фракционирования ферментов. Однако при работе с ионообменными гелями могут возникнуть осложнения на стадии элюирования из-за изменений pH в результате обмена ионов буфера с ионами, удерживаемыми ионогенными группами геля; кроме того, при изменении pH и ионной силы может изменяться объем колонки. Отмеченные явления затрудняют теоретический анализ процесса разделения. Складывается впечатление, что ионообменники на основе сефадексов редко обладают преимуществами по сравнению с более традиционными ионообменниками на целлюлозной основе. Тем не менее в некоторых случаях возможность сочетания в одной стадии двух принципов разделения приобретает существенное значение при выделении фермента.

Во многих из описанных методов хроматографии на колонках используется градиентная элюция; устройства для создания градиента описаны в статьях [473, 2374, 3656].

Ж. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Различия в скорости перемещения различных белков (как электролитов) в электрическом поле послужили основой для разработки электрофоретических методов очистки ферментов. Большинство из них применимы в аналитических исследованиях при работе с относительно небольшими количествами веществ, тогда как при применении этих методов для разделения относительно больших количеств белков часто возникают трудности. Определенные трудности связаны также с выделением разделенных веществ. Однако метод электрофореза обладает большой разрешающей способностью и поэтому широко используется в работах по выделению ферментов.

а) Электрофорез со свободной границей в стандартном аппарате Тизелиуса пригоден в основном как тест для определения гомогенности или некоторых свойств очищенного фермента, а не как метод препаративного выделения его в сколько-нибудь

значительном количестве. Этот метод не позволяет полностью отделить один белок от другого. Однако с его помощью для специальных исследований можно получить небольшие порции относительно чистого фермента, если он является либо самым подвижным, либо самым медленным из компонентов смеси. При работе с двухсекционной кюветой опыт продолжают до тех пор, пока пики, соответствующие различным компонентам, не разделяются достаточно хорошо. Затем ток выключают и очень осторожно перемещают раствор в обратном направлении до тех пор, пока в верхней половине кюветы (на восходящей границе) не останется только самый быстрый компонент. В верхней части другой секции кюветы часто при этом может оказаться только самый медленный компонент. Таким образом, при отборе жидкости из верхних половин обеих секций кюветы можно получить эти два компонента отдельно в относительно чистом состоянии.

Хьертен недавно опубликовал обзор, в котором собран материал, касающийся теории, оборудования и применения электрофореза с подвижной границей [1973].

б) Зональный электрофорез на инертной поддерживающей среде, такой, как бумага, крахмал или целлюлозный порошок, имеет ряд преимуществ по сравнению с электрофорезом со свободной подвижной границей; такими преимуществами являются компактность приборов, отсутствие конвекционных эффектов и полнота разделения компонентов. При электрофоретическом разделении на простой фильтровальной бумаге можно использовать лишь небольшое количество материала. Этот метод, а также метод электрофореза на полосках ацетата целлюлозы используют главным образом для быстрого аналитического разделения ферментов, которые затем идентифицируют с помощью соответствующих цветных реакций. Прибор Грассмана и Ханнига [1634] позволяет проводить электрофорез на бумаге непрерывно: раствор буфера равномерно стекает вниз по листу фильтровальной бумаги; электрический ток пропускают в горизонтальном направлении; раствор фермента непрерывно подается на бумагу в точке, расположенной в верхней части листа. Компоненты, имеющие различные подвижности в горизонтальном электрическом поле, стекая к нижнему краю листа, достигают его в различных точках. Таким путем можно разделить значительно большие количества вещества, чем в аппарате Тизелиуса, однако поддерживающая среда остается двумерной.

В качестве трехмерной поддерживающей среды для зонального электрофореза используют блоки из порошков крахмала или целлюлозы; на них можно разделить значительное количество материала. Для препаративного электрофореза в блоке из крахмальной пасты [2650] обычно используют горизонтально расположенные камеры, а для электрофореза в целлюлозном по-

рошке [3722] — вертикально расположенные колонки. Перед извлечением фермента из крахмального блока может потребоваться идентификация соответствующей зоны с помощью специфической цветной реакции; далее зона вырезается и из нее элюируют белок. Во втором случае после окончания опыта разделенные компоненты получают с колонки простой элюцией. Описан также метод непрерывной элюции.

Однако ни крахмал, ни этанолизированная целлюлоза не являются абсолютно нерастворимыми, что создает трудности при выделении фермента. Кроме того, электрофоретическое разделение часто осложняется электроосмотическим перемещением растворенных веществ. Недавно в качестве поддерживающей среды для горизонтального электрофореза белков в блоке предложен поливинилхлорид [4346], а для электрофореза белков в вертикальных колонках — сефадекс [5074].

в) Зональный электрофорез в крахмальном геле позволяет лучше разделить вещества, чем электрофорез на упакованных в блоки порошках, поскольку в этом случае проявляется также эффект молекулярного сита. Этот метод, подробно описанный Смитом [4346], широко используется для аналитических целей, но возможности разделения с его помощью больших количеств белка ограничены. Для препаративного электрофореза используют акриламидный гель; поскольку размер пор в этом геле можно варьировать, он имеет большие преимущества перед крахмальным. Были приложены значительные усилия для разработки систем, позволяющих увеличить количество вносимого белка, а также приемов для автоматического непрерывного количественного получения разделенных компонентов [1981, 4271]. Емкость геля по отношению к белкам зависит от его поперечного сечения; в препаративных опытах удается разделить несколько сот миллиграммов белка. Техника непрерывной элюции в процессе электрофореза состоит в собирании вытекающего раствора в небольшой ячейке, расположенной на одном конце геля; эта ячейка отделяется от прилегающего электродного резервуара полупроницаемой мембраной. Объем ячейки, в которой осуществляется элюция, должен быть небольшим; через нее непрерывно протекает буфер, используемый для элюирования белков.

При электрофорезе в полиакриламидном геле можно улучшить разделение белков, используя градиент размера пор геля [3936].

«Изотахорофрез» — название, данное недавно новому методу электрофоретического разделения ионизированных веществ. При изотахофорезе зоны разделяемых веществ оказываются между «ведущим электролитом», подвижность которого выше, чем подвижность любого из разделяемых ионов, и «замыкающим электролитом», подвижность которого в идеальном случае

должна быть ниже подвижности разделяемых ионов. В равновесном состоянии все ионы движутся с одинаковой скоростью; в качестве «разделителей» между зонами используют амфолиты. В препаративных опытах в качестве поддерживающей среды используют полиакриламидный гель, а белковые фракции собирают с помощью проточной ячейки, как в обычно применяемом приборе для гель-электрофореза [1741].

г) Метод изоэлектрического фокусирования в стабилизированном градиенте рН позволяет разделять белки, отличающиеся по изоэлектрической точке всего на 0,01 единицы. В этом методе используют колонки, в которых находятся низкомолекулярные амфолиты в смеси с ферментом; в электрическом поле амфолиты мигрируют, создавая градиент рН, и индивидуальные белковые компоненты концентрируются, или «фокусируются», в зонах рН, соответствующих их изоэлектрическим точкам [1742]. При проведении опыта необходимо стабилизировать систему для защиты от конвекционных токов; обычно для этого в колонке создают градиент концентрации сахарозы или глицерина. Разделенные в градиенте плотности белки можно легко собрать с помощью коллектора фракций. Однако количество белка, которое может быть сфокусировано в одной зоне, ограничено, поскольку не исключены изоэлектрическая преципитация и локальная перегрузка градиента.

Изоэлектрическое фокусирование проводят также в геле, обычно для этой цели используют полиакриламидный гель. Данный вариант метода имеет преимущества перед методом, в котором используют градиент плотности, поскольку в каждой зоне может накапливаться большее количество белка и обычно требуется меньше времени для разделения [1344]. Однако элюирование фермента после изоэлектрического фокусирования в геле более трудоемко. Метод зонального электрофокусирования (zone convection) сочетает ряд преимуществ обоих упомянутых выше вариантов. В этом методе электрофокусирование протекает в серии U-образных трубок (оптимально от 50 до 100), соединенных друг с другом, и не используются ни гель, ни градиент плотности. Внесение образца и элюирование проб осуществляются легко, причем можно наносить большое количество белка; однако время, требующееся для разделения, такое же, как и в варианте с градиентом плотности [4898].

Принцип изоэлектрического концентрирования белков был также использован при очистке белков методами электрофореза в геле и электродекантацией. В первом случае электрофорез в крахмальном геле проводят при рН, соответствующем изоэлектрической точке фермента, и последний остается на старте, в то время как другие белки уходят со старта. Исследуемый фермент извлекают из зоны нанесения образца [4135]. При электродекантации между двумя электродами помещают ряд камер,

сообщающихся через полупроницаемые мембраны. В электрическом поле белки, несущие заряд, накапливаются около полупроницаемых мембран, и при возрастании плотности раствора последний перемещается книзу, где может быть собран через отверстие для слива. Белок, находящийся в условиях опыта в изоэлектрической точке, остается в центре камеры и может быть собран отсасыванием и перенесен в соседнюю камеру для дальнейшей очистки [5116].

3. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

Когда фермент достаточно очищен, в отдельных случаях удается его закристаллизовать. Однако получение фермента в кристаллическом виде не должно рассматриваться как доказательство его чистоты. Первые кристаллы белка или фермента могут содержать посторонние белки. При перекристаллизации удельная активность кристаллов возрастает; иногда требуется перекристаллизовывать их несколько раз до тех пор, пока удельная активность фермента не достигнет постоянного максимального значения. Поэтому кристаллизацию лучше всего рассматривать как специфический метод фракционирования, который следует использовать на конечных стадиях очистки, когда ферментный раствор сконцентрирован и имеет небольшой объем. Кристаллы чистого фермента могут быть использованы для исследования его структуры (гл. 10).

Кристаллизацию ферментов часто проводят из растворов сульфата аммония. Обычный метод состоит в добавлении соли к достаточно концентрированному раствору фермента до появления слабого помутнения. Затем раствор оставляют стоять и постепенно (очень медленно) повышают концентрацию соли. Это можно сделать различными способами: добавляя концентрированный раствор соли по каплям с большими интервалами с помощью очень тоненького капилляра или добавляя соль через мембрану для диализа, или, наконец, просто подвергая раствор медленному испарению. Прежде чем будет получен удовлетворительный результат, могут оказаться необходимыми эксперименты при нескольких значениях pH и температуры.

Кристаллизацию проводят также при постоянной концентрации солей, постепенно изменяя pH или температуру.

Джекоби [2197] описал общий метод кристаллизации, который включает экстракцию небольшой порции осажденного фермента последовательно все более разбавленными растворами сульфата аммония на холоду. После каждого добавления раствора суспензию центрифугируют, прозрачный надосадочный раствор сливают и оставляют при комнатной температуре. В этих условиях через большой или меньший период времени обычно появляются кристаллы.

Нельзя дать общие правила кристаллизации ферментов — наиболее подходящие условия должны быть найдены экспериментально в каждом отдельном случае; обзор Цока и Бюхера [941], посвященный этому вопросу, содержит ряд полезных сведений. Кристаллизация обычно облегчается, если одной из предшествующих стадий было фракционирование органическим растворителем. Это явление, вероятно, связано с удалением какого-то мешающего кристаллизации материала липидной природы.

В отдельных случаях удается кристаллизовать ферменты и другими путями, например из их растворов в органических растворителях. Там, где другие методы непригодны, может оказаться эффективной кристаллизация фермента в виде соли тяжелого металла, но в таких случаях перед определением активности фермента необходимо удалить металл.

Появление кристаллов, обладающих ферментативной активностью, отнюдь не является доказательством того, что закристаллизовался сам фермент. Много разочарований было связано с тем, что иногда кристаллы либо имели неорганическую природу, либо состояли из побочного белка, содержащего небольшую примесь фермента. Лучшей проверкой чистоты кристаллов служит перекристаллизация. Падение активности указывает на то, что фермент присутствует в кристаллах в виде примеси, тогда как ее увеличение до некоего постоянного значения свидетельствует о том, что кристаллы состоят из самого фермента.

И. ЧЕРЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

Следует рассмотреть последовательность применения различных методов фракционирования при выделении чистого фермента. Очевидно, что кристаллизацию следует проводить в конце очистки фермента, тогда как прогревание логично проводить вначале, поскольку оно имеет целью удалить большое количество балластного белка и поскольку при нем не требуется добавлять большие объемы жидкости, сильно затрудняющие работу. Во многих случаях, однако, тепловая обработка нежелательна либо по причине нестабильности фермента, либо из-за присутствия таких ферментов (например, протеиназ), которые при повышенной температуре могут вызвать слишком большое разрушение белков, либо, наконец, просто потому, что степень достигаемой при этом очистки невелика и, следовательно, затраты труда не оправдываются. Однако для удаления некоторого количества балластного материала часто бывает очень удобно в качестве первой стадии фракционирования неочищенного экстракта использовать такие методы, как нагревание, слабое подкисление, обработка хлороформом или адсорбция на образующемся *in situ* фосфате кальция. Обработка экстракта

таким путем может оказаться очень полезной для успешного проведения последующих стадий очистки, в частности для более полного отделения надосадочной жидкости от осадка при фракционировании солью, а также для предотвращения засорения хроматографических колонок.

Остается выбор между солями, органическими растворителями, адсорбентами, хроматографией и электрофорезом. Наилучший порядок чередования приемов очистки определяют экспериментально, но при этом следует учесть несколько моментов. На ранних стадиях очистки чаще всего имеет дело с большими объемами ферментного раствора, и использование органических растворителей на этих стадиях, естественно, ограничивается размерами имеющейся центрифуги с охлаждением. Такой центрифуги не требуется, если исходный материал представляет собой стабильный сухой препарат, который можно использовать для работы в небольших удобных порциях. В качестве первой стадии очистки фермента можно использовать осаждение белков сульфатом аммония, но и в этом случае придется центрифугировать большие объемы растворов. Удобно также использовать сепараторную центрифугу или, если время не является лимитирующим фактором, можно отделить осадок из большого объема фильтрованием. Преимущество солевого фракционирования в качестве ранней стадии очистки состоит в том, что не нужно предварительно проводить диализ или обессоливание, поскольку для его проведения состав среды не имеет существенного значения. Адсорбция и хроматография на больших колонках также очень удобны в качестве первой ступени при фракционировании фермента; в первом случае обычно требуется предварительный диализ раствора, а для второго метода может оказаться достаточным разбавление пробы до такой степени, чтобы содержание электролитов не препятствовало сорбции на колонке. Если можно предварительно провести диализ, то адсорбцию следует считать наилучшей первой стадией очистки. Адсорбенты обычно оседают достаточно быстро, так что через короткий промежуток времени большую часть жидкости можно слить с осадка и таким образом избежать центрифугирования большого объема. При использовании хроматографии можно значительно сконцентрировать фермент в малом объеме.

Элюаты, полученные при адсорбционном фракционировании или хроматографии, содержат соли, поэтому логично вслед за адсорбцией провести фракционирование сульфатом аммония, чтобы таким образом избежать дополнительной стадии диализа. Диализ или фильтрование требуются после фракционирования сульфатом аммония (если за первым фракционированием сразу не следует второе), но при этом уже имеют дело с меньшим объемом жидкости, и поэтому обессоливание провести значительно легче. Обессоливание очень больших объемов жидкости

представляет значительные трудности. Удобным и быстрым методом обессоливания является гель-фильтрация, которую обычно проводят на колонках с сефадексом. Этот метод с успехом применяется для обессоливания разных объемов растворов вплоть до 1 л, хотя стоимость больших колонок весьма велика. Диализ — очень медленная операция, часто самая медленная из применяемых при очистке ферментов, но она не требует сложных аппаратов и поэтому очень дешевая. Тем не менее для обработки нескольких литров ферментного раствора, с которыми приходится работать на ранних стадиях фракционирования, требуется много метров целлофановых трубок. Если учесть к тому же, что диализ идет очень долго, его следует применять только в случае относительно небольших объемов жидкости. Однако если проводить диализ не до полного удаления солей и при частой смене жидкости, то процесс можно ускорить. Мак-Фай [3092] предложил много практических рекомендаций, которые следует учитывать при диализе.

Во время диализа возможна потеря активности фермента — либо из-за нестабильности самого фермента, либо из-за удаления какого-то кофактора. Однако наиболее частая причина инактивации — попадание в раствор фермента из воды следов металлов-ингибиторов (например, Cu), если для диализа не применяется очень чистая вода. Ферменты обычно имеют очень большое сродство к этим ингибиторам, и даже если концентрация ионов металла в воде чрезвычайно мала, фермент может связать все количество металла, имеющееся в весьма большом объеме воды. Это не имеет особого значения при работе с неочищенными препаратами, но зато очень важно на последних стадиях очистки фермента.

Многие хроматографические и все электрофоретические процедуры более удобно проводить с малыми объемами материала, и поэтому лучше ими пользоваться на более поздних стадиях очистки ферментов. Фракционирование сульфатом аммония, а также некоторые хроматографические методы, в частности использующие элюцию субстратом, позволяют получить очень концентрированные растворы фермента, подходящие для кристаллизации; поэтому они часто используются как заключительные стадии очистки.

К. ДРУГИЕ МЕТОДЫ

Значительная часть работ по очистке ферментов, проводившихся вплоть до настоящего времени, выполнялась с помощью четырех главных методов, упомянутых выше, а именно с помощью осаждения органическими растворителями, адсорбции на гелях, фракционирования сульфатом аммония и хроматографии на колонках. Представляется вполне вероятным, что боль-

шинство ферментов можно очистить, пользуясь комбинацией только этих методов. В действительности с увеличением степени специфичности, которой можно достигнуть в некоторых хроматографических процедурах, становится возможным получить практически чистый фермент за одну стадию очистки [3497]. Однако нет сомнений, что во многих случаях целесообразно использовать широкий ассортимент приемов. Не исключено, что в особых случаях, когда перечисленные выше методы не дают желаемого результата, станет необходимо применение других методов, которые мы здесь не рассматривали.

Иногда на ранних стадиях очистки можно удалить большое количество белковых примесей без потери фермента путем осторожного добавления солей тяжелых металлов, например свинца [295], правда, слишком большое количество свинца может привести к потере фермента. В ряде случаев ферменты осаждали добавлением нуклеиновой кислоты [4988], которую затем удаляли, осаждая ее протамином.

На ранних стадиях очистки большое количество неактивного белка можно удалить по методу [4806], в основе которого лежит денатурация белков при встряхивании их растворов со смесью спирта и хлороформа. Этот метод особенно полезен для удаления гемоглобина из экстрактов тканей животных или из эритроцитов [486, 1919].

Л. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ

Обычно при очистке фермента по одному из описанных выше методов объем раствора уменьшается, однако бывают особые случаи, когда требуется концентрировать раствор фермента до еще меньшего объема. Описан ряд методов, с помощью которых это можно осуществить. Растворитель удаляют выпариванием, частичным замораживанием раствора и отбрасыванием образовавшегося льда, а также высушиванием растворов из замороженного состояния (лиофилизация). Ни один из этих методов не является полностью удовлетворительным, так как ни в одном из них не исключена денатурация фермента, и, кроме того, при использовании всех этих методов концентрируется не только фермент, но и соли. Упаривание путем обдувания током воздуха целлофановых диализных трубок, в которые помещен раствор фермента, считается удачным приемом, если объемы жидкости, подлежащие упариванию, относительно малы; однако в этом случае также происходит концентрирование солей. Более приемлемым можно считать две другие процедуры с использованием мембран [458]. Одна из них — диализ против непроникающих через мембрану набухающих макромолекул, таких, как полиэтиленгликоль или декстраны, — приводит к очень быстрому

уменьшению объема достаточно большого количества раствора. (Декстраны, в частности в форме сефадекса, и некоторые препараты полиакриламидов можно добавлять непосредственно в растворы фермента; после того как декстран оседает или его отделяют на центрифуге, фермент в надосадочной жидкости оказывается сконцентрированным; однако часть вещества при этом неизбежно теряется из-за адсорбции.) Вторая процедура — концентрирование раствора с помощью ультрафильтрации — по-видимому, наиболее ценный метод из имеющихся в настоящее время, тем более, что мембраны с различным размером пор имеются в продаже. При ультрафильтрации раствор фермента помещают в камеру, снабженную мембраной, через которую не проходит выделяемый белок, но проходят растворитель и малые молекулы. Приложенное к раствору давление или создание в камере вакуума, где собирается жидкость, способствуют движению жидкости через мембрану. Довольно большие объемы растворов можно довести до нескольких миллилитров за один-два часа. Для концентрирования белков с низкой молекулярной массой надо, очевидно, использовать ультрафильтры с малым размером пор, но для более высокомолекулярных белков удобнее использовать фильтры с большими порами, так как растворитель будет через них протекать быстрее. Хорошие результаты получают, используя вначале ультрафильтр с большими порами, через которые проходит фермент, а затем ультрафильтр с малыми порами, которые задерживают данный фермент; этот прием является одновременно и методом очистки и методом концентрирования фермента.

КРИТЕРИИ ЧИСТОТЫ ФЕРМЕНТОВ

Вероятно, единственного теста, с помощью которого можно было бы доказать, что выделенный продукт состоит только из одного белка — собственно фермента, не существует. На основании данных какого-либо одного теста о чистоте продукта можно говорить лишь с известной степенью вероятности. Если же продукт оказывается гомогенным при проверке несколькими различными тестами, то эта вероятность значительно увеличивается и фермент может быть признан чистым.

Большинство тестов на гомогенность основаны на определении физических свойств белка, которые используются для проверки гомогенности любых белков. С помощью ультрацентрифугирования и гель-фильтрации проводят дифференцировку по размеру молекул, а электрофорез и изоэлектрическое фокусирование позволяют дифференцировать белки по заряду. Если фермент имеется в большом количестве, то проверить чистоту препарата можно также по тесту растворимости. Для ферментов

существуют и дополнительные тесты, основанные на присущей им каталитической активности, и эти тесты могут убедительно подтвердить данные, полученные с помощью физических методов.

Чтобы определить, седиментирует ли анализируемый белок в виде одного компонента, используют аналитическую ультрацентрифугу. Поведение белка при седиментации зависит от размера его молекул и их формы. Следует отметить, что если при использовании шпирен-оптики (метод скрещенных диафрагм) наблюдают один пик, то это еще не достаточно надежное доказательство гомогенности препарата. Не исключено, что константы седиментации многих белков мало различаются, и поэтому в смеси, состоящей из двух белков, оба белка могут иметь приблизительно одинаковую скорость седиментации. Асимметрия пика может указывать на присутствие примесей; нужно помнить, однако, что этот метод не отличается достаточной чувствительностью и примеси могут остаться совершенно незамеченными. В ходе седиментации нельзя определять ферментативную активность, однако при центрифугировании в градиенте плотности с последующим отбором проб в разных зонах градиента возможно определение и концентрации белка, и ферментативной активности. Один симметричный пик белка с постоянной удельной активностью фермента по всему пику является указанием на вероятную чистоту препарата. Выход белка при гель-фильтрации в виде одного пика с постоянной удельной активностью также является показателем его чистоты, однако следует иметь в виду, что белки, имеющие сходный размер молекул, и при этой процедуре останутся неразделенными.

Наиболее эффективное разделение компонентов смеси достигается методом электрофореза. Так, при анализе сложной смеси белков (например, мышечного экстракта) методом электрофореза со свободной границей или зональным электрофорезом наблюдают обычно большее число компонентов, чем с помощью метода ультрацентрифугирования или гель-фильтрации. Если очищенный препарат дает только один пик в аппарате Тизелиуса, то это можно считать неплохим доказательством его чистоты. Однако известно, что при электрофорезе смеси двух белков может наблюдаться один пик, если проводить опыт только при одном значении pH; поэтому, для того чтобы получить убедительные результаты, необходимо провести электрофорез при нескольких значениях pH. Для установления гомогенности препарата обычно используют зональный электрофорез; при этом разделяются даже белки, мало отличающиеся друг от друга свободным зарядом, особенно если разделение проводить при pH, близком к изоэлектрической точке рассматриваемого фермента. После проведения зонального электрофореза поддерживающую

среду обычно разделяют на две идентичные (или зеркальные) половины: одну половину окрашивают с целью обнаружения белка, а в другой определяют активность фермента. Если наблюдается только одна зона активности фермента, совпадающая с одной из белковых зон, то все другие не обладающие ферментативной активностью белковые зоны, следовательно, соответствуют примесям. Однако все чаще обнаруживают, что однотипной ферментативной активностью могут обладать два или даже больше видов белковых молекул. Выявляемые различные формы фермента [2167] часто очень близки по свойствам (гл. 12) и могут быть разделены с помощью более чувствительных приемов, например таких, которые обычно используют для определения гомогенности препаратов. Существование таких форм фермента (часто называемых изоферментами, или изозимами) значительно осложняет оценку чистоты препарата, и экспериментатор прежде всего должен решать, исследовать ли все семейство молекул, обладающих одинаковой ферментативной активностью, или ограничиться изучением молекул одного типа. Когда изоформы одного фермента имеют разные удельные активности, может казаться, что одна форма «чище», чем другая.

Изоэлектрическое фокусирование является очень мощным аналитическим методом благодаря тому, что с его помощью можно различать белки, изоэлектрические точки которых отличаются всего на 0,01 единицы pH. В отличие от других методов разделения в этом методе белковые зоны в течение опыта делаются более узкими, а не расширяются за счет диффузии. Если белки не окрашены и, следовательно, их нельзя обнаружить визуально, локализацию компонентов после изоэлектрического фокусирования устанавливают элюцией и определением белка в пробах (в случае стабилизированного жидкого градиента) или специфическим окрашиванием (в случае когда поддерживающей средой является гель). Изоэлектрическое фокусирование является одним из наиболее чувствительных методов определения гомогенности; в то же время этот метод позволяет обнаружить существование различных форм одного фермента. В ряде случаев ферменты, гомогенность которых была установлена по всем другим критериям, при изоэлектрическом фокусировании были разделены на несколько компонентов. Поэтому иногда предполагают, что сам метод ответствен за возникновение гетерогенности, которую он отражает.

Следует отметить, что ни один из до сих пор описанных методов, хотя все они достаточно чувствительны, не позволяет определить присутствие примесей, находящихся в растворе в очень малых количествах, так как обычно они составляют менее 1% общего количества анализируемого белка. Для определения чистоты белка может быть использован также метод по-

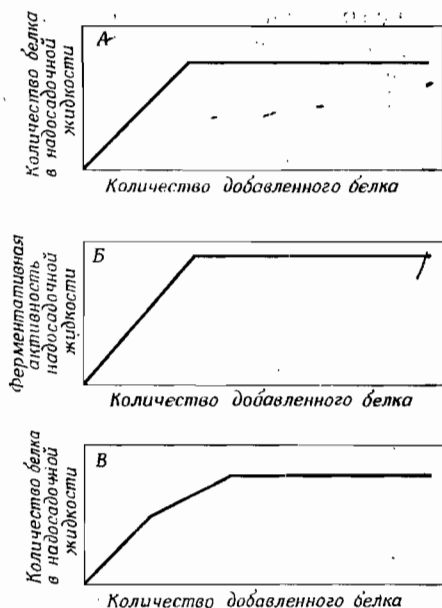


Рис. 3.2. Определение чистоты фермента по кривой растворимости.

строения кривых растворимости [3473]. Он заключается в том, что в серии проб определенный постоянный объем растворителя (вода или солевой раствор) взбалтывают с различными количествами фермента, после чего пробы фильтруют или центрифугируют и в полученных растворах определяют количество белка. Затем строят график, как показано на рис. 3.2,А, откладывая по оси ординат найденное, а по оси абсцисс взятое количество белка. В первых пробах серии весь добавленный белок растворяется, и количество его в растворе равно количеству добавленного белка, так что график представляет собой прямую, у которой тангенс угла наклона равен 1. Затем достигается насыщение. После этого (если мы имеем дело с чистым белком), сколько бы белка мы ни добавляли, количество его в растворе увеличиваться не будет, так что начиная с момента насыщения, график становится горизонтальным. Однако если в пробе присутствует второй белок, то после того, как будет достигнута точка насыщения для менее растворимого белка; второй белок все еще будет растворяться; так будет продолжаться до тех пор, пока и для него не будет достигнута точка насыщения, и лишь после этого график пойдет параллельно оси абсцисс. Поэтому первая часть графика в этом случае будет представлять собой ломаную линию (рис. 3.2,В), причем наклон первого ее отрезка будет больше наклона второго (вследствие того, что второй компонент составляет лишь часть

общего количества белка). И действительно, прямолинейные отрезки соответствуют каждому из двух присутствующих компонентов.

Более простой способ определения чистоты фермента предложил Нортроп. По этому способу определяют на графике только две точки, а именно точку, в которой происходит первый перелом, и точку со значительно большей абсциссой. Для определения берут две пробирки с растворителем; к первой добавляют такое количество белка, которого как раз достаточно, чтобы дать очень слабое помутнение, ко второй — в 10 раз большее количество, после чего обе пробирки центрифугируют. Если в обеих надосадочных жидкостях обнаружится совершенно одинаковое количество белка, то ясно, что график будет иметь форму, показанную на рис. 3.2, А; если же в надосадочной жидкости второй пробирки количество белка будет большим, то это свидетельствует о том, что препарат содержит более чем один компонент.

Однако данный метод используется реже, чем чувствительные методы электрофореза, поскольку для построения кривых растворимости требуются довольно большие количества белка в соответствующей форме.

ЗАТРУДНЕНИЯ, ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ ПРИ РАБОТЕ С ЧИСТЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

Благодаря существующей теперь возможности получать ферменты в чистом виде мы можем использовать в эксперименте относительно большие их количества. Обычно количество фермента, необходимое для определения его активности, выражается величиной порядка 1 мкг. В настоящее время имеется возможность вносить в опытную пробу до 10 мг фермента, но это таит в себе и некоторую опасность.

Для изучения специфичности желательнее работать с чистыми ферментами, однако не следует брать их в слишком больших количествах, ибо если в этих случаях наряду с основной обнаруживается иная дополнительная катализируемая реакция, то возникает подозрение, что она обусловлена другим ферментом, присутствующим в небольшом количестве как примесь. Особенно важно это в связи с тем, что примеси, составляющие менее 1%, обнаружить очень трудно, о чем уже упоминалось выше. Если для опыта был взят всего 1 мг фермента, то это означает, что в пробе может присутствовать 10 мкг сопутствующего фермента, а такое количество значительно превосходит то, которое обычно необходимо, чтобы эффективно катализировать ферментативную реакцию. Опасность уменьшается, если фермент много раз перекристаллизован, но она все же остается, если в опыте используют большие количества фермента.

При изучении двуферментной системы в тех случаях, когда один из ферментов добавляется в большом избытке, имеется опасность другого рода. Если два фермента обладают общим коферментом или носителем, к которому один из изучаемых ферментов имеет большое сродство, то этот фермент может связать практически весь присутствующий кофермент, так что второй фермент будет его совершенно лишен. Так, Штрауб [4527] показал, что в лактатдегидрогеназной системе (КФ 1.1.1.27) реакция вообще не будет протекать, если в систему добавить большое количество фермента (рис. 4.7)!

Глава 4

Кинетика действия ферментов

ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КИНЕТИКИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Характерным свойством ферментов является их способность катализировать определенные химические реакции. При изучении каталитической активности ферментов необходимо основываться на количественной оценке скоростей катализируемых реакций. Изучение влияния различных факторов на скорость данной реакции дает возможность делать выводы о механизме действия фермента. В идеальном случае данные кинетических исследований следует сопоставлять с данными, полученными при изучении химии и структуры фермента, чтобы получить более глубокую характеристику изучаемого процесса. Однако это возможно только тогда, когда соответствующий фермент достаточно хорошо очищен. Для тех же ферментов, которые еще не были получены в чистом виде (а таких ферментов много), изучение кинетики действия оказывается в настоящее время единственно возможным подходом при выяснении механизма ферментативного процесса.

Изучение кинетики действия ферментов важно не только с теоретической, но также и с чисто практической стороны. При выборе единицы активности фермента необходимо, например, знать наилучшие условия его действия, а также то, как влияют на его активность различные факторы. Подобное предварительное изучение кинетики действия обычно необходимо и для успешного осуществления очистки фермента, так как этот процесс должен количественно контролироваться путем систематических определений активности ферментного препарата на разных стадиях очистки (см. гл. 3).

Хорошо известно, что биологические системы, особенно живые клетки, более чувствительны к изменениям температуры, pH и ряда других факторов, чем большинство химических процессов в небиологических системах, и это является в основном отражением свойств ферментов, от действия которых зависит функционирование биологических систем. Поэтому знание кинетики действия ферментов помогает при анализе многих биологических явлений.

Исследователю, имеющему дело с биохимическими системами, необходимо помнить о том, что обычные уравнения кинетики, заимствованные из физической химии, в неизменном виде не могут быть использованы для изучения действия ферментов. Исследование кинетики действия ферментов можно рассматривать как самостоятельный раздел. Гораздо важнее, однако, видеть в этих исследованиях неотъемлемую часть любого детального изучения фермента. Без данных о кинетике действия фермента невозможно решить вопрос о химическом механизме его функционирования или о том, как он действует в клетке. В обоих случаях изучение кинетики действия фермента на первых стадиях его исследования необходимо для планирования последующих экспериментов и интерпретации их результатов. Таким образом, кинетическое исследование следует рассматривать как необходимую основу при изучении фермента.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Факторы, определяющие характер течения ферментативных реакций, многочисленны и разнообразны (см. гл. 2), поэтому трудно получить кинетические уравнения, которые достаточно точно описывали бы наблюдаемые кривые хода ферментативных реакций. В ряде случаев, однако, условия протекания реакций относительно просты, и это позволяет получить уравнения, достаточно хорошо отражающие ход реакций (с такими примерами мы встретимся в следующем разделе). Обычно если определение скорости реакции можно осуществить прежде, чем какой-либо из указанных в гл. 2 факторов проявит свое действие, иными словами — в начальный момент времени, то возможными осложнениями вообще можно пренебречь.

Метод определения начальных скоростей ферментативных реакций описан в гл. 2. Как уже указывалось, наилучшим следует считать такой метод исследования, при котором изменяют только один из факторов (сохраняя все остальные условия неизменными) и определяют влияние этого фактора на начальную скорость реакции. К числу главных факторов, определяющих начальную скорость ферментативной реакции, относятся: концентрация фермента, концентрация субстрата, pH , температура и присутствие активаторов или ингибиторов. В этой и последующих главах мы рассмотрим теперь каждый из этих факторов в отдельности.

А. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЕРМЕНТА

При данных условиях две молекулы фермента, действующие в растворе независимо друг от друга, за определенный проме-

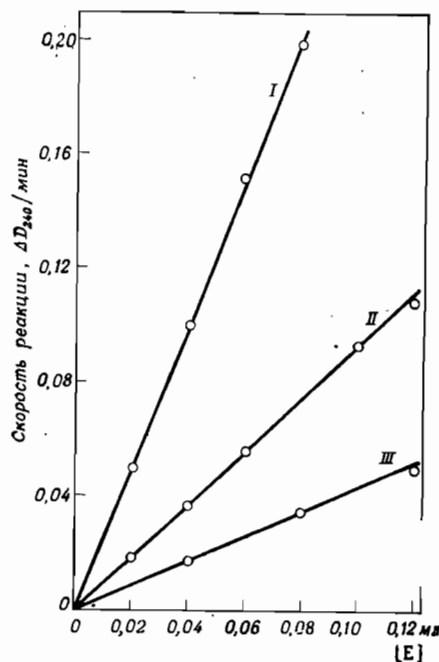


Рис. 4.1. Типичные примеры влияния концентрации фермента на скорость реакции [3788]. I — аспартат-аммиак-лиаза (К.Ф. 4.3.1.1); II — фумаратгидратаза (К.Ф. 4.2.1.2); III — аконитатгидратаза (К.Ф. 4.2.1.3).

жуток времени вызовут превращение в два раза большего количества субстрата, чем одна молекула; поэтому скорость реакции будет пропорциональна концентрации фермента

$$v = k[E]. \quad (4.1)$$

В подавляющем большинстве случаев действительно имеет место подобное соотношение, и именно на нем основываются почти все методы определения концентрации ферментов. Типичные примеры приведены на рис. 4.1, однако от них могут наблюдаться отклонения, и прежде чем проводить дальнейшие кинетические исследования или пытаться рассчитать удельные активности, необходимо показать, что между скоростью и концентрацией фермента (в исследуемом диапазоне) имеется линейная зависимость. Отклонения от линейности нередко обусловлены несовершенством системы определения активности; встречаются, однако, случаи, когда такие отклонения являются следствием свойств самого фермента.

1. Вогнутые кривые v — $[E]$

Возможные графики зависимости v — $[E]$ для этого случая приведены на рис. 4.2 и 4.3. Известны две причины подобного поведения.

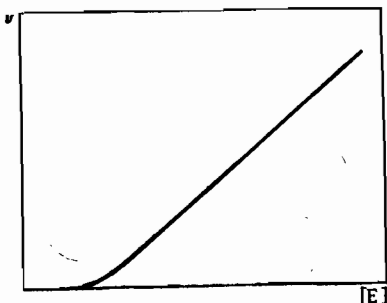


Рис. 4.2. Влияние токсичных примесей и реагентов на скорость реакции.

а. Присутствие в одном из компонентов реакционной смеси (но не в растворе самого фермента) небольших количеств высокотоксичной примеси. Эта примесь отравляет первые порции добавленного фермента. Лишь после того как фермент (или другой белок, присутствующий в препарате фермента) будет добавлен в количестве, достаточном для того, чтобы связать всю токсичную примесь, последующие порции фермента полностью сохраняют свою активность. При этом получают нормальный тип линейной зависимости, но прямая бывает смещена от начала координат на расстояние, пропорциональное количеству токсичной примеси. Если, например, фермент, как это часто бывает, чувствителен к следам ионов тяжелых металлов, то появление кривых такого рода может быть обусловлено присутствием небольших количеств меди в используемом буферном растворе или в дистиллированной воде.

б. Наличие диссоциирующего активатора или кофермента в препарате фермента. При обратимом взаимодействии образуется активный комплекс EA в соответствии с уравнением



Следовательно, доля фермента, находящегося в активной форме, увеличивается при увеличении в инкубационной смеси концентрации активатора. В данном случае активатор вводится в систему вместе с препаратом фермента, поэтому при увеличении концентрации фермента все большая доля его будет находиться в активированной форме и график зависимости $v-[E]$ будет вогнутым. В случае простой стехиометрии 1:1, отвечающей уравнению (4.2), следует ожидать квадратичной зависимости скорости от концентрации белка при сильном разведении. Однако при высоких концентрациях, когда фермент насыщен активатором, скорость окажется пропорциональной первой степени концентрации белка. Подобный эффект иллюстрирует рис. 4.3. На этом рисунке кривая I характеризует активность частично очищенной арилсульфатазы (КФ 3.1.6.1), которая была диализована против раствора хлористого натрия. В дейст-

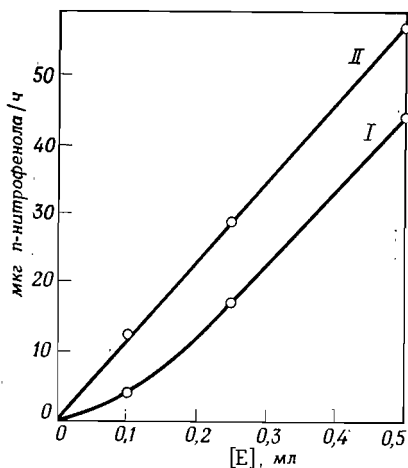


Рис. 4.3. Влияние активатора, присутствующего в препарате фермента, на скорость реакции [5011]. Фермент — арилсульфатаза (К.Ф. 3.1.6.1.). I — частично очищенная арилсульфатаза после диализа против NaCl; II — то же в присутствии активатора (0,05 М NaCl).

вительности фермент активируется ионами хлора, и, если активность определять при постоянной и оптимальной концентрации этих ионов, график будет представлять собой прямую (II) [5011, 5012]. Сходные кривые были получены [2145] для ряда протеиназ, нуждающихся в активаторе (рис. 4.4); в этих случаях, по-видимому, действует аналогичный механизм. В отсутствие активатора или при активации добавленным цианидом активность зависит от малых количеств тиоловых соединений, присутствующих в препарате фермента, и потому на графике видны отчетливые вогнутые кривые. При активации тиогликолатом концентрация тиоловых групп не изменяется с изменением концентрации фермента и зависимость бывает близка к линейной.

Особенно интересен случай, когда активный фермент является комплексом субъединиц, каждая из которых в отдельности не активна; таким образом, можно считать, что данная субъеди-

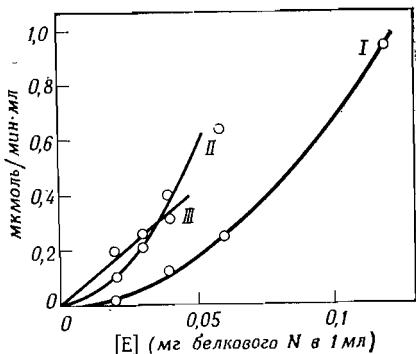
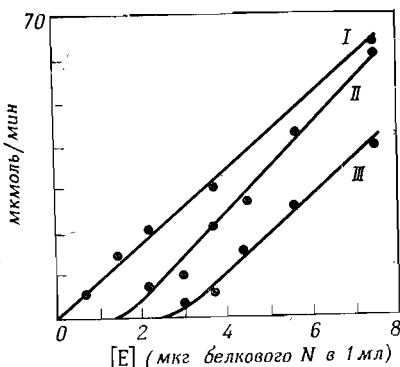


Рис. 4.4. Влияние активатора [2145]. Гидролиз бензоиларгининамида фидином (К.Ф. 3.4.4.3). I — активатор не добавлен; II — активирование цианидом; III — активирование тиогликолатом.

Рис. 4.5. Влияние ассоциации субъединиц [2084]. Активность фосфофруктокиназы определяли при концентрации F-6-P 200 мкМ; I — [АТР] = 200 мкМ, [АМР] = 200 мкМ; II — [АТР] = 500 мкМ; III — [АТР] = 500 мкМ, [Цитрат] = 500 мкМ.



ница активируется при взаимодействии с другой. Поскольку увеличение концентрации способствует агрегации субъединиц, график зависимости скорости от концентрации фермента будет иметь вид вогнутой кривой. Было показано, что подобная ситуация наблюдается для фермента 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) [2084], см. рис. 4.5. В растворе этот фермент обратимо диссоциирует на субъединицы, при этом активна только агрегированная форма. АМР связывается с агрегированной формой, смещая равновесие в пользу активной формы, в то время как цитрат связывается с неактивной формой. АТР может связываться с обеими формами фермента, поэтому наблюдается более сложная картина; однако при высоких концентрациях АТР, по-видимому, способствует диссоциации. Подобные системы рассматриваются более подробно в гл. 8.

2. Выпуклые кривые v — $[E]$

Графики зависимости скорости от концентрации фермента выходят в этом случае на плато, т. е. достигается кажущаяся предельная скорость (рис. 4.6). Такое отклонение от линейности встречается чаще, чем описанное выше, и может быть объяснено несколькими причинами,

а. Несовершенство метода определения, а не истинное снижение активности фермента.

В тех случаях, когда определение активности данного фермента предусматривает добавление второго фермента, активность последнего может лимитировать скорость изучаемой реакции, в результате чего будет наблюдаться кривая, подобная кривой I на рис. 4.6. При увеличении количества второго фермента скорость будет увеличиваться и мы получим картину, представленную кривой II. Те же самые рассуждения применимы к системе, содержащей несколько ферментов, если в этой системе количество одного фермента изменяется, а количество

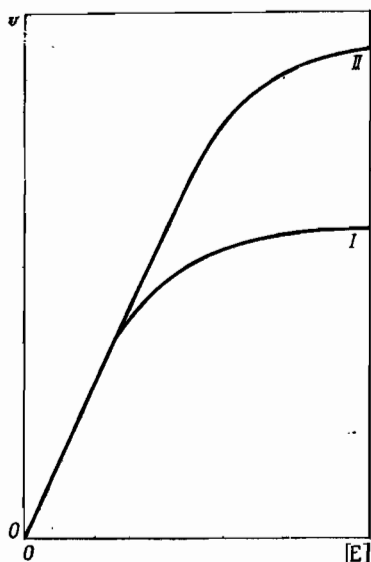


Рис. 4.6. Ограничение скорости реакции условиями измерения. Объяснение см. в тексте.

других ферментов остается постоянным. До тех пор пока количество определяемого фермента будет относительно невелико, так что другие ферменты будут иметься в избытке, общая скорость процесса будет пропорциональна концентрации определяемого фермента; если же его концентрация станет достаточно большой, скорость начнет лимитироваться концентрацией других ферментов. Таким образом, каталитическая эффективность фермента (определяемая, например, его молекулярной активностью) будет постоянной до тех пор, пока другие ферменты будут находиться в избытке, но начнет падать при более высоких концентрациях, когда лимитирующим становится количество одного из других ферментов.

Кривые, подобные приведенным на рис. 4.6, часто встречаются при манометрических измерениях, если роль лимитирующего фактора играет скорость диффузии газа в жидкость; поэтому скорость реакции может быть определена манометрическим методом только в известных пределах. При спектрофотометрическом измерении скорости исходная оптическая плотность раствора при высоких концентрациях фермента может оказаться столь большой, что результаты регистрации дальнейшего увеличения плотности окажутся некорректными. При этом результаты измерений зависят от оптических характеристик монохроматора, и кажущийся максимум скорости будет, следовательно, зависеть от типа используемого спектрофотометра. Применение методов регистрации активности протеолитических ферментов, которые основаны на определении суммарного ко-

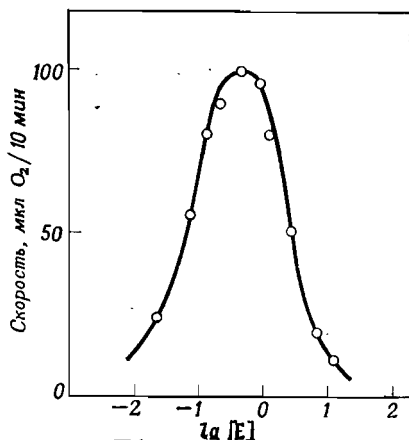


Рис. 4.7. Влияние очень высокой концентрации фермента на скорость процесса в сложной ферментной системе [4527]. Система: Лактат + Лактатдегидрогеназа (К.Ф. 1.1.1.27) + NAD^+ + Флавопротеид (К.Ф. 1.6.4.3) + Метиленовый синий + O_2 .

личества всех продуктов гидролиза белка, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой или другими подобными реагентами, также может приводить к нелинейности. «Допущение, согласно которому увеличение небелкового азота пропорционально числу гидролизованных пептидных связей, по-видимому, не имеет достаточного основания. Количество освободившегося небелкового азота определяется положением гидролизовавшейся пептидной связи в молекуле белка, а также природой продуктов расщепления» [2145].

Другие тривиальные причины, которые могут влиять на активность фермента и которые следует устранить, — это изменение рН среды, обусловленное добавлением больших количеств фермента, или изменение ионной силы. Последний эффект особенно важен в тех случаях, когда ионная сила исходного раствора фермента высока.

6. Как уже упоминалось в гл. 3, если в распоряжении исследователя имеется чистый фермент, то становится возможным добавлять его к изучаемой системе в относительно очень большом количестве. Если при этом фермент обладает значительным сродством к одному из компонентов системы, например к коферменту, то практически весь кофермент может оказаться связанным данным ферментом, и в результате кофермент станет недоступным для других ферментов рассматриваемой системы. В этом случае с увеличением концентрации фермента скорость сложной ферментативной реакции будет уменьшаться. Примером этого может служить лактатдегидрогеназная система. Штрауб [4527] показал, что если существенно увеличивать концентрацию лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) в условиях постоянной и притом небольшой концентрации NAD^+ и значительной концентрации флавопротеида [дигидролипоамид-дегидрогеназы ($NADP^+$), КФ 1.6.4.3], то ход реакции будет харак-

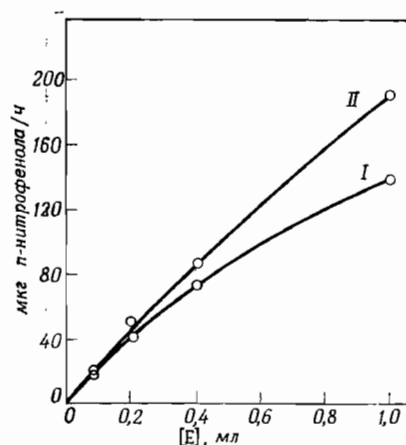


Рис. 4.8. Влияние ингибитора, присутствующего в препарате фермента, на скорость реакции. [5011]. Фермент — арилсульфатаза (К.Ф. 3.1.6.1). Ферментный препарат — неочищенный экстракт печени. I — недиализованный экстракт; II — диализованный экстракт.

теризоваться кривой, приведенной на рис. 4.7. На этом графике концентрация фермента для удобства отложена в логарифмическом масштабе. Чем выше концентрация дегидрогеназы, тем ниже концентрация свободного кофермента. Связывание кофермента при высоких концентрациях дегидрогеназы не дает ему возможности реагировать с флавопротеидом и вызывает значительное снижение скорости суммарной реакции.

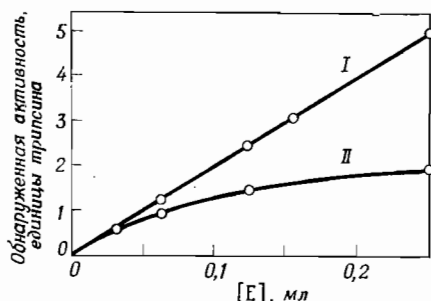
в. Кривая, подобная изображенной на рис. 4.6, может получаться в тех случаях, когда определяют не начальную скорость, а изменения, происходящие в результате реакции за определенный период времени, как показано на рис. 2.2,Б. Подобный результат вызывается исчерпанием субстрата и не указывает на отсутствие пропорциональности между начальной скоростью и концентрацией фермента. Пример такого рода был приведен [1918] для действия альдозазы (КФ 4.1.2.13).

При характеристике действия протеиназ на белки раньше часто пользовались «законом Шютца», согласно которому скорость протеолиза пропорциональна корню квадратному из концентрации фермента. Однако Боданский [474] показал, что это заключение является ошибочным в силу рассмотренного выше обстоятельства, т. е. из-за измерения не начальной скорости, а количества субстрата, гидролизованного за определенный период времени. Он рассчитал, что в действительности результаты самого Шютца указывают на прямую пропорциональность между начальной скоростью и концентрацией фермента, а не корнем квадратным из его концентрации.

г. Если препарат фермента содержит обратимо действующий ингибитор, который, соединяясь с ферментом, образует неактивный комплекс



Рис. 4.9. Влияние добавления ингибитора к препарату фермента на скорость реакции [3473]. Фермент — трипсин (К.Ф. 3.4.21.4). *I* — чистый трипсин; *II* — трипсин + ингибитор.



то доля фермента, находящегося в неактивной форме, будет увеличиваться по мере увеличения концентрации ингибитора в смеси. Так как ингибитор добавляется вместе с ферментом, то концентрации ингибитора и фермента увеличиваются одновременно; в результате активность, наблюдаемая при высоких концентрациях фермента, оказывается ниже той, которую следовало бы ожидать исходя из линейной зависимости. Иначе говоря, так как в реакцию (4.3) вступают две молекулы, а образуется только одна, то увеличение общей концентрации будет благоприятствовать реакции соединения, и, следовательно, при высоких концентрациях в неактивной форме будет находиться большая часть фермента. Этот случай является противоположным приведенному выше, в котором рассматривалось действие обратимо функционирующего активатора (случай 1.6).

Два примера такого рода приведены на рис. 4.8 и 4.9. Кривая *I* на рис. 4.8 показывает зависимость скорости гидролиза *n*-нитрофенилсульфата недиализированным экстрактом печени крысы от концентрации фермента. Кривая *II* получена для того же препарата, подвергнутого тщательному диализу. Нелинейность в случае *I* есть результат подавления фермента следами фосфата, присутствовавшими в исходном экстракте; этот фосфат был удален при диализе, после чего была получена кривая *II* [5011].

Рис. 4.9 изображает данные для модельной системы, в которой ингибитор специально добавляли к препарату фермента [3473]. Кривая *I* была получена в опытах с раствором чистого трипсина (КФ 3.4.21.4), а кривая *II* — с раствором трипсина, к которому добавили ингибитор. Вообще если график зависимости между скоростью реакции и концентрацией фермента имеет вид, аналогичный кривой *II* на рис. 4.9, то можно предполагать присутствие диссоциирующего ингибитора и следует попытаться удалить этот ингибитор диализом или каким-либо другим способом.

Выпуклость кривой зависимости скорости реакции от концентрации фермента может быть обусловлена полимеризацией

фермента, если активной является его диссоциированная форма. В этом случае после диализа препарата фермента причины нелинейности графика сохраняются.

Несмотря на рассмотренные выше исключения, в подавляющем большинстве случаев наблюдается строгая пропорциональность между концентрацией фермента и начальной скоростью реакции. Предположение о подобной строгой пропорциональности является основным постулатом в большинстве опубликованных исследований по кинетике действия ферментов.

Б. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

Ферментативная кинетика односубстратных реакций

В подавляющем большинстве случаев в ферментативных реакциях участвует не один, а большее число субстратов. Это справедливо даже для гидролазных реакций, которые часто рассматривают как односубстратные, поскольку второй субстрат (вода) присутствует в очень высоких концентрациях, и можно считать, что фермент постоянно насыщен водой. Хотя односубстратные реакции встречаются в биохимических системах относительно редко, они, однако, являются весьма полезной простой моделью для построения и обсуждения теорий ферментативной кинетики; при этом большинство получаемых выводов могут быть непосредственно использованы при рассмотрении более сложных ферментативных реакций.

Вначале мы подробно рассмотрим кинетику односубстратных реакций, а затем кинетику реакций, протекающих с участием нескольких субстратов и продуктов.

Теория Михаэлиса

Концентрация субстрата — один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативных реакций. Почти во всех случаях график зависимости между начальной скоростью и концентрацией субстрата представляет собой часть равнобочной гиперболы, как показано на рис. 4.10. Соответствующее уравнение имеет вид

$$(a - v)(b + s) = \text{const.} \quad (4.4)$$

(Иногда скорость может падать при высоких концентрациях субстрата, но это особый случай, который мы рассмотрим ниже.)

Подобный результат получается всякий раз, когда процесс связан с обычной диссоциацией. Если процесс диссоциации $XU \rightleftharpoons X + U$ происходит при постоянной $[U]$, то кривая зависи-

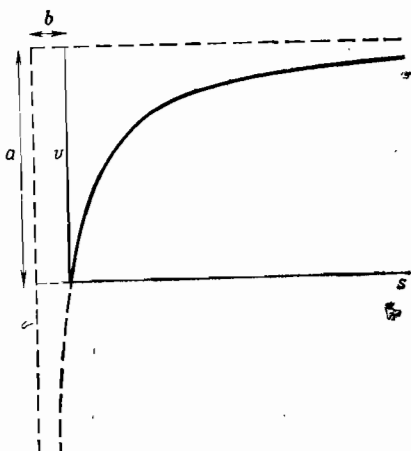
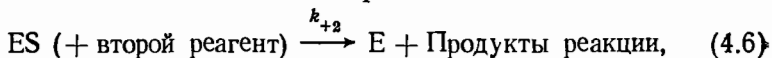


Рис. 4.10. Типичная кривая зависимости между скоростью реакции и концентрацией субстрата, имеющая форму гиперболы.

мости $[XY]$ от $[X]$ бывает подобна кривой, изображенной на рис. 4.10.

Браун [570, 571] и Анри [1905] предположили, что фермент вначале образует комплекс со своим субстратом, а затем этот комплекс распадается с освобождением свободного фермента и продуктов реакции



где k_{+1} , k_{-1} и k_{+2} являются константами скорости индивидуальных реакций. Если в реакции участвует второй субстрат, то его концентрация включается в величину k_{+2} .

Представление о том, что фермент образует сначала комплекс с субстратом, является центральным для всех современных концепций о механизме действия ферментов. Простая теория, основанная на этом представлении, была впервые предложена Михаэлисом и Ментен в 1913 г. [3149]. Эта теория основана на двух важных предпосылках.

1. Реакция между ферментом и субстратом (4.5) находится в состоянии равновесия; предполагается, что реакция (4.6) практически не оказывает влияния на равновесие. Это условие выполняется, если скорость распада комплекса ES на свободный фермент и субстрат значительно больше скорости распада его до свободного фермента и продукта ($k_{-1} \gg k_{+2}$).

2. Концентрация свободного субстрата остается практически постоянной в течение начального периода реакции, так что в уравнениях (4.5) и (4.6) концентрация субстрата (s) может быть принята равной полной концентрации субстрата (s_t). Дан-

ное условие обычно выполняется, если полная концентрация субстрата значительно больше полной концентрации фермента, как это обычно имеет место при кинетических исследованиях.

Другая ситуация, при которой концентрация свободного субстрата может быть постоянной (причем эта концентрация не обязательно должна превосходить концентрацию фермента), возникает в тех случаях, когда скорость поступления субстрата равна скорости его превращения. Подобная ситуация может реализовываться в ходе метаболических процессов в клетке; в связи с этим часто приводимое положение о том, что условия Михаэлиса не соблюдаются, если внутриклеточная концентрация фермента является величиной того же порядка, что и стационарная концентрация его субстрата, следует использовать с осторожностью.

Если обозначить концентрацию свободного субстрата через s (считая ее в соответствии с п. 2 равной полной концентрации субстрата), полную концентрацию фермента через e и концентрацию фермент-субстратного комплекса через x , то концентрация свободного фермента ($e_{св}$) будет равна ($e - x$); поскольку система находится в равновесии, выражение для константы диссоциации (K_s) будет следующим:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{(e - x)s}{x} = \frac{e_{св}s}{x}. \quad (4.7)$$

Это уравнение можно преобразовать и получить выражение для концентрации фермент-субстратного комплекса:

$$x = \frac{es}{K_s + s}, \quad \text{или} \quad x = \frac{e}{1 + \frac{K_s}{s}}. \quad (4.8)$$

Скорость реакции будет определяться скоростью распада фермент-субстратного комплекса согласно уравнению (4.6):

$$v = k_{+2}x. \quad (4.9)$$

Подставляя в уравнение (4.9) выражение для x (4.8), получаем

$$v = \frac{k_{+2}e}{1 + \frac{K_s}{s}}. \quad (4.10)$$

Если s становится большим по сравнению с K_s , то v будет равно $k_{+2}e$; можно обозначить эту максимальную скорость, полученную в условиях насыщения фермента субстратом, через V , так что

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{s}}. \quad (4.11)$$

Это хорошо известное уравнение Михаэлиса. Оно может быть преобразовано в уравнение

$$(V - v)(K_s + s) = VK_s, \quad (4.12)$$

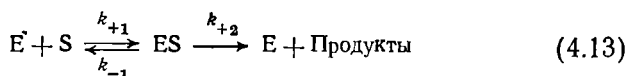
которое имеет такой же вид, как и уравнение (4.4). Можно отметить, что, когда s равно K_s , v равно $V/2$. Величина s , при которой в эксперименте наблюдается скорость, равная половине максимальной (константа Михаэлиса), обычно обозначается через K_M , так что в рассматриваемых условиях $K_M = K_s$. Это равенство оказывается справедливым при условии, если между ES, E и S сохраняется равновесие [предположение, сделанное при выводе уравнения (4.5)], что, однако, не всегда выполняется.

Теория стационарного состояния

Как уже указывалось выше, теория Михаэлиса исходит из допущения, согласно которому равновесие между ферментом и субстратом [реакция (4.5)] достигается гораздо быстрее, чем успевает распасться комплекс ES [реакция (4.6)], так что все время, пока функционировал фермент, комплекс ES находится в равновесии с E и S. Принимая во внимание очень высокую каталитическую активность, свойственную многим ферментам, можно считать весьма вероятным, что сделанное выше допущение не всегда справедливо и что реальное значение x будет отличаться от его значения в условиях равновесия. Анализ кинетики реакции с учетом этого обстоятельства был предложен Бриггсом и Холдейном [557] в 1925 г. Этот анализ основывается на постулате, согласно которому в любой момент реакции скорости образования и распада комплекса ES практически равны, так что концентрация комплекса ES, т. е. x , может считаться постоянной в течение короткого периода времени, необходимого для измерения скорости. В течение более продолжительного периода времени x , конечно, будет изменяться по ходу реакции в связи с падением концентрации субстрата; однако скорость изменения величины x всегда будет существенно меньше, чем скорость ферментативной реакции.

В дополнение к этому постулату в теории стационарного состояния, как и в теории Михаэлиса (с. 93), делается допущение о том, что концентрация свободного субстрата может считаться постоянной.

Для реакции



скорость образования ES будет равна $k_{+1}(e - x)s$, а скорость распада ES будет равна сумме двух скоростей: скорости рас-

пада ES до E и S и скорости распада ES до E и продуктов, т. е. $k_{-1}x$ и $k_{+2}x$ соответственно. Следовательно, результирующая скорость изменения x будет равна

$$\frac{dx}{dt} = k_{+1}(e - x)s - (k_{-1} + k_{+2})x. \quad (4.14)$$

Для стационарного состояния, при котором $dx/dt = 0$, имеем, следовательно,

$$x = \frac{es}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + s}. \quad (4.15)$$

Это новое значение x заменяет значение, полученное на основе простой равновесной теории Михаэлиса [уравнение (4.8)]. Скорость ферментативной реакции, измеряемая по скорости образования продуктов реакции, будет равна

$$v = k_{+2}x = \frac{k_{+2}es}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + s}. \quad (4.16)$$

Максимальная скорость определяется выражением

$$V = k_{+2}e, \quad (4.17)$$

так что уравнение (4.16) может быть записано в виде

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s}}. \quad (4.18)$$

Это уравнение идентично уравнению Михаэлиса (4.11), за исключением того, что вместо K_s стоит K_M , определяемое выражением

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_s + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}. \quad (4.19)$$

Если k_{+2} значительно меньше k_{-1} , последним членом можно пренебречь, и K_M становится равным отношению k_{-1}/k_{+1} , или K_s . Допущение, что $k_{+2} \ll k_{-1}$, было основным в простой равновесной теории Михаэлиса и Ментен, и эта теория может, следовательно, рассматриваться как частный случай более общей теории стационарного состояния.

Отметим, что, приняв $dx/dt = 0$ в уравнении (4.14) и сделав соответствующую подстановку из (4.19), мы получим $K_M = e_{св}s/x$. K_s также обычно принимают равным $e_{св}s/x$ [уравнение (4.7)], но при этом концентрации $e_{св}$, s и x являются равновесными. Отсюда ясно существенное различие между K_s и K_M . Обе величины характеризуют концентрацию активного комплекса

(х), используя e и s , но в первом случае имеются в виду равновесные, а во втором реальные концентрации, имеющие место в ходе катализа.

Очевидно, что в случае обсуждаемой реакции изменения начальной скорости в зависимости от концентрации субстрата будут одинаковыми для стационарного и равновесного режимов. Для двух крайних случаев имеем: если s велико, $v = V$, если же s мало, $v = \frac{V}{K_s} s$, т. е. $v \propto s$.

Хотя допущения, сделанные при выводе уравнения Михаэлиса, приводят к результату, который удовлетворяет экспериментальным данным, это еще не доказывает их правильности, ибо к тем же результатам приводят и многие другие допущения; в частности, можно указать на такие механизмы, как адсорбция в соответствии с изотермой Ленгмюра [2698] и цепные реакции.

Однако, каково бы ни было его теоретическое истолкование, уравнение Михаэлиса — Ментен справедливо в подавляющем большинстве случаев. Во всех этих случаях изменение скорости реакции при изменении концентрации субстрата носит одинаковый характер, а именно — оно зависит от отношения концентрации субстрата к константе Михаэлиса. Если для удобства назвать эту последнюю величину относительной концентрацией субстрата, обозначив ее через σ :

$$\sigma = \frac{s}{K_M}, \quad (4.20)$$

и, кроме того, ввести понятие относительной скорости

$$\varphi = \frac{v}{V}, \quad (4.21)$$

то уравнение Михаэлиса можно записать в виде

$$\varphi = \frac{\sigma}{1 + \sigma}. \quad (4.22)$$

При графическом изображении последнего уравнения получают приведенные на рис. 4.11 нормированные кривые, которые могут быть применены для анализа действия любого фермента.

Из уравнения (4.22) следует, что если концентрация субстрата высока, то $\varphi = 1$, если же она очень мала, то $\varphi = \sigma$.

График зависимости скорости от концентрации субстрата для данного фермента определяется двумя величинами, а именно V и K_M . В простых равновесных условиях K_M (в данном случае она принимается равной K_s) является константой равновесия реакции диссоциации (4.5), а V представляет собой меру константы скорости распада фермент-субстратного комплекса [уравнение (4.6)]. В этих условиях K_M является величиной, об-

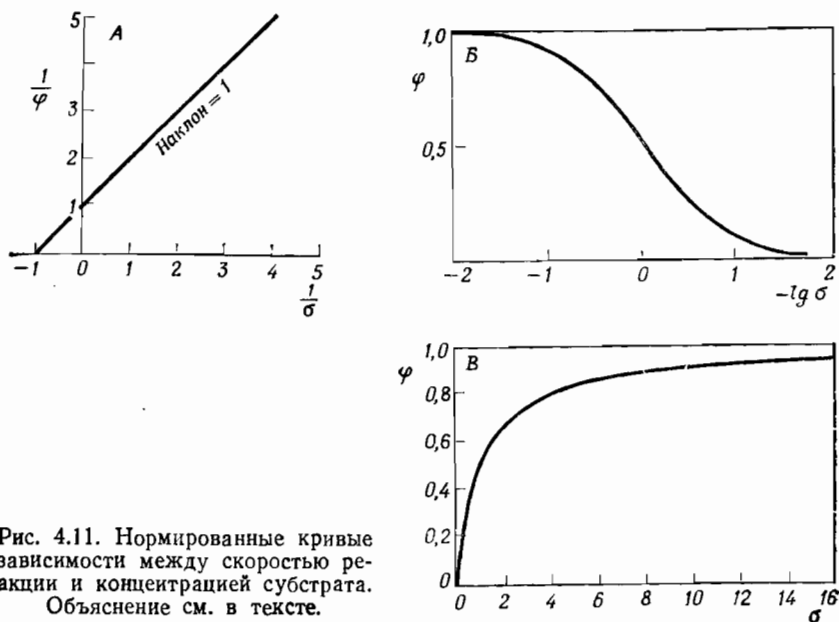


Рис. 4.11. Нормированные кривые зависимости между скоростью реакции и концентрацией субстрата. Объяснение см. в тексте.

ратной сродству фермента к субстрату. Однако это простое соотношение не выполняется, когда система стационарна, поэтому не следует судить о сродстве по величине K_M до тех пор, пока не будет убедительно показано, что выполняются равновесные условия. Отметим, однако, что V является мерой константы скорости распада фермент-субстратного комплекса как в стационарных, так и в равновесных условиях. Те или иные факторы могут изменять начальную скорость, влияя либо на стадию образования фермент-субстратного комплекса, либо на стадию распада этого комплекса, либо на обе эти стадии; изучение влияния таких факторов на K_M и V позволяет в известной мере дифференцировать эти влияния.

Определение V и K_M

Для определения V и K_M по данным ряда измерений скорости при различных концентрациях субстрата график уравнения Михаэлиса (4.11) может быть построен несколькими путями.

1. Если построить график зависимости v от s , как это сделано на рис. 4.12, А, то полученная кривая будет представлять собой отрезок равнобочной гиперболы. При замене v на $V/2$ получаем $s = K_M$, и величина K_M будет равна абсциссе «средней» точки экспериментальной кривой. Разные ферменты характеризуются, естественно, разными кривыми в зависимости от V и K_M .

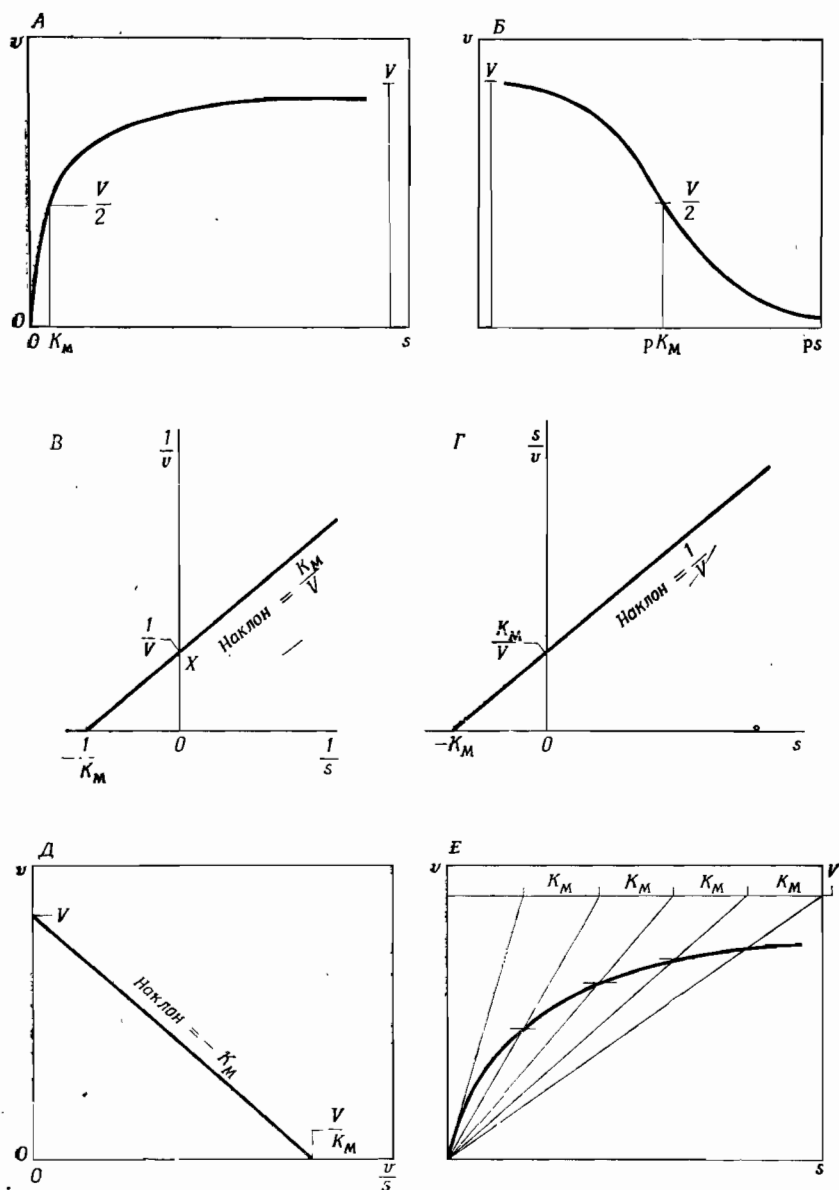


Рис. 4.12. А—Е. Шесть способов графического определения величин K_M и V по влиянию концентрации субстрата на скорость реакции.

2. Второй метод графического изображения представлен на рис. 4.12, Б, на котором приведена зависимость v от pS ($= -\lg s$); кривая имеет такую же форму, какая обычно наблюдается при процессах диссоциации. Этот метод изображения соответствует логарифмической форме уравнения Михаэлиса

$$pS = pK_M + \lg \frac{V - v}{v}. \quad (4.23)$$

В данном случае изменение величины K_M не влияет на форму кривой, которая зависит только от последнего члена уравнения, а просто смещает кривую вдоль горизонтальной оси вследствие изменения pK_M ($= -\lg K_M$). Если принять v равным $V/2$, то последний член становится равным нулю, а величина pS в средней точке кривой — равной pK_M . На практике главная трудность при определении K_M по какой-либо из этих кривых заключается в получении экспериментальных точек при достаточно высокой концентрации субстрата, обеспечивающей достижение максимальной скорости.

3. Третий метод графического изображения, обычно приписываемый Лайнуиверу и Бэрку¹ [2832], обходит упомянутое выше затруднение. Если построить график зависимости $1/v$ от $1/s$, как это представлено на рис. 4.12, В, т. е. воспользоваться методом двойных обратных величин, то он будет представлять собой прямую, описываемую уравнением

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V} \quad \text{или} \quad \frac{V}{v} = 1 + \frac{K_M}{s} \quad (4.24)$$

и пересекающую ось абсцисс в точке $-1/K_M$. Это легко показать, если подставить $1/v = 0$ в уравнение (4.24); в результате получаем

$$\frac{1}{s} = -\frac{1}{K_M}.$$

Прямая пересекает ось ординат в точке $1/V$ и имеет наклон, равный K_M/V .

4. Еще один метод, с помощью которого получают прямую, довольно близкую к той, какую дает предыдущий метод, состоит в построении графика зависимости s/v от s в соответствии с уравнением, полученным в результате умножения обеих частей уравнения (4.24) на s [1765]:

$$\frac{s}{v} = \frac{K_M}{V} + \frac{1}{V} s. \quad (4.25)$$

¹ Этот метод графического изображения был предложен Вульфом [5160] (цит. Холдейном и Стерном в 1932 г., т. е. за 2 года до появления в печати работы Лайнуивера и Бэрка). Вульф также использовал длины отрезков, отсекаемых получаемой прямой от осей координат.

В этом случае наклон прямой равен $1/V$ и она пересекает ось ординат в точке K_M/V , как это показано на рис. 4.12, Г. Величину K_M получают путем продолжения прямой до пересечения с осью абсцисс.

5. Метод, предложенный Вульфом [5160] и усиленно поддержанный Хофсти [1991], иллюстрирует рис. 4.12, Д. В этом случае строят график зависимости v от v/s в соответствии с уравнением

$$v = V - K_M \frac{v}{s}, \quad (4.26)$$

которое представляет собой другую форму записи уравнения (4.11). Величину K_M получают путем деления длины отрезка, отсекаемого на оси ординат, на длину отрезка, отсекаемого на оси абсцисс.

Детальное сравнение линейных графиков трех типов было проведено Даудом и Риггсом [1147]; они исследовали влияние ошибок в определении начальных скоростей на получаемые значения K_M и V и установили, что метод двойных обратных величин (3) является менее надежным. Выбор между двумя другими методами, 4 и 5, в известной степени зависит от характера ошибок при определении v , однако в общем случае последний из них, по-видимому, несколько лучше — он более чувствителен к отклонению от линейности. Эти авторы отмечают, что надежность метода двойных обратных величин можно значительно повысить рациональным планированием экспериментов. Конечно, ни один из этих методов не позволяет получить столь точных результатов, как обсуждаемый ниже статистический метод, в котором анализируется гиперболическая зависимость $v-s$; однако для обычных исследований, когда не требуется максимальная точность, метод двойных обратных величин оказывается вполне подходящим.

Поскольку в большинстве опубликованных работ данные по ферментативной кинетике проанализированы по методу 3, он и используется в основном в данной книге. Конечно, легко представить себе, как будет выглядеть график и для случая 4, поскольку, при этом фактически «меняются местами» наклоны и отсекаемые на осях отрезки.

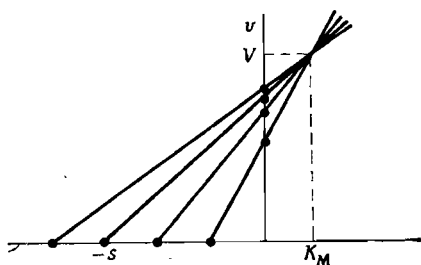
6. Теория, на которой основаны рассмотренные выше методы, включает предположение о том, что концентрация фермента очень мала по сравнению с концентрацией субстрата; по оси откладывают концентрацию *свободного* субстрата s (на практике это полная концентрация добавленного субстрата s_t). Предположение о том, что $s = s_t$, не всегда, однако, выполняется. Метод, который не требует подобного допущения, был предложен М. Диксоном [1114] и представлен на рис. 4.12, Е. Как и в случае А, строят график зависимости скорости от концент-

рации субстрата и проводят горизонтальную прямую, соответствующую V (определенную, как обычно, при насыщающих концентрациях субстрата). На кривой отмечают точки, лежащие ниже уровня V , на расстояниях $V/2$, $V/3$, $V/4$, $V/5$ и т. д. и проводят через них прямые от начала координат до пересечения с V -прямой. Расстояния вдоль этой прямой от одной точки пересечения до другой соответствуют величине K_M , выражаемой в тех же единицах, что и s . Если провести касательную к кривой в начале координат (соответствующую $V/1$ в рассматриваемой серии), то при этом также отсекается отрезок, равный K_M , однако провести такую касательную достаточно точно может оказаться весьма затруднительно. Математическое обоснование метода приведено на с. 181—182.

Построение на рис. 4.12,Е проведено для случая, когда $s=s_i$, однако преимущество данного метода заключается в том, что эта предпосылка не является необходимой; метод остается в равной мере применимым, если по оси отложено s_i , хотя $s \neq s_i$. При этом наблюдается только смещение вправо точек пересечения с V -прямой, расстояния же между ними не изменяются, так что определяемые величины K_M остаются достоверными (см. рис. 4.32). Величина смещения характеризует молярную концентрацию фермента, определяющую отклонение s от s_i . Легко показать, что, когда концентрация фермента мала и $s=s_i$, расстояние первой точки пересечения от оси v равно K_M , однако при достаточно большом количестве фермента оно равно $e_i + K_M$, как показано на рис. 4.32.

Другие преимущества этого метода (наряду с отсутствием ограничений для применения) заключается в том, что в нем используются несколько точек графика, а не одна, как в методе 1, и что подобный подход может быть применен для определения K_i ингибиторов (см. ниже). Метод имеет особенно важное значение при исследовании ферментов с высоким сродством к субстратам или ингибиторам, которые должны использоваться в очень низких концентрациях — часто столь же низких, как концентрация фермента. Более того, как показано на рис. 4.33, оказывается возможным определять концентрации компонентов системы для любой точки кривой. Как ограничение метода можно рассматривать то обстоятельство, что для определения K_M (но не K_i) необходимо найти V , однако какие-либо ошибки в установлении положения V -прямой автоматически выявляются по отсутствию равенства расстояний между точками пересечения.

Другой графический метод, сходный с методом 6 и впервые использованный Шварценбахом и др. [4161] для расчета констант диссоциации, недавно применен Эйзендалем и Корниш-Боуденом [1221], а также де Мигель Мерино [1050] для определения K_M . От других методов он отличается тем, что не пре-

Рис. 4.13. Определение K_M и V .

дусматривает построения графика по экспериментальным точкам. Как показано на рис. 4.13, координаты точек, т. е. величины s и v , откладывают на горизонтальной и вертикальной осях соответственно и через каждую пару точек проводят прямую. Следует подчеркнуть, что эти прямые не являются графиками, как в случаях 3 и 4, — каждая из них проведена для одной экспериментальной точки; они соответствуют секущим в методе 6.

Все прямые должны пересекаться в точке с координатами $\{K_M; V\}$. Это легко объяснить, принимая во внимание, что согласно уравнению (4.18), треугольники, образуемые прямыми и отсекаемыми ими на осях отрезками, подобны треугольникам, образуемым этими прямыми, осью s и пунктирной K_M -прямой. Для первых отношение высоты к основанию равно v/s , а для вторых $V/(K_M + s)$, что удовлетворяет уравнению (4.18). Для каждой отдельной прямой это положение справедливо в любой точке, и правильным является такое значение V , при котором для всех прямых получается одна и та же величина K_M , т. е. это значение соответствует ординате точки пересечения, подобно тому как в методе 6 при правильном значении V получают одну и ту же величину K_M для всех отрезков. Близкое сходство между двумя рассматриваемыми методами можно выявить, совершая параллельный перенос прямых рис. 4.12, *Е* влево до тех пор, пока точки пересечения не совпадут с первой точкой, — тогда мы получим рис. 4.13!

Этот метод достаточно прост и не занимает много времени; если не все прямые пересекаются строго в одной точке, то оптимальное значение K_M получают по среднему значению [886]. Метод, однако, не очень удобен, когда на одном чертеже необходимо представить данные двух или более экспериментов. Поскольку наибольшая точность достигается, когда прямые пересекают оси под углом около 45° , метод в известной мере мало чувствителен к отклонениям от «гиперболичности» (в смысле соответствия графику Михаэлиса) при очень больших или очень малых концентрациях субстрата. Вероятно, главным его недостатком по сравнению с методом 6 является то, что он

применим лишь в случае, если $s = s_i$, поскольку это предположение заложено в уравнении, на котором данный метод основан. Кроме того, неясно, каким образом с помощью этого метода можно определять K_i ингибиторов или концентрации компонентов системы, когда e_i и s_i являются величинами одного порядка. Метод же 6 позволяет это сделать.

Помимо описанных выше графических предложен ряд статистических методов, в которых кинетические данные анализируют либо с помощью уравнения Михаэлиса — Ментен, либо используя обратную форму этого уравнения. Эти методы позволяют анализировать кинетические данные с привлечением ЭВМ и дают возможность оценить достоверность определяемых кинетических констант. Статистические методы оказываются особенно полезными тогда, когда имеется большое число данных [2120] и когда при анализе кинетических данных используют сложные уравнения скорости [801]. Такие методы описаны рядом авторов [800, 2238, 5095], и для них детально разработана соответствующая программа на фортране [801].

В связи с использованием ЭВМ для определения кинетических констант нельзя не подчеркнуть, что прежде чем проводить сложные исследования, кинетические данные следует проанализировать обычными методами. Если разброс данных слишком велик, не удастся достичь успеха и при дальнейшем анализе. Так, если результаты не удовлетворяют простому уравнению Михаэлиса, попытки анализировать их с помощью какого-либо другого основывающегося на нем уравнения приведут к ошибочным результатам; если какой-либо участок графика двойных обратных величин является явно нелинейным (например, вследствие ингибирования высокими концентрациями субстрата), он должен быть исключен из рассмотрения до того, как данные будут использованы для анализа с помощью простого уравнения Михаэлиса. Применение ЭВМ является весьма заманчивым, но может привести к неверным выводам относительно правильности интерпретации. Очевидно, однако, что компьютерный анализ позволяет провести расчеты с необходимой точностью; это особенно важно, если нужно установить, пересекается ли семейство прямых на одной из осей (см. с. 145 и далее). В то же время возможность получения с помощью ЭВМ правильного ответа зависит от точности экспериментальных данных; если необходимо обнаружить тонкое различие — установить, например, тип ингибирования (смешанное или бесконкурентное) — то необходимо располагать данными параллельных определений, с тем чтобы можно было оценить величины стандартных ошибок.

Как указывалось на с. 97, до тех пор, пока $s \ll K_m$, график зависимости начальной скорости от s будет прямой с наклоном V/K_m . Следовательно, при очень малых концентрациях субстра-

га показатель V/K_M можно считать кажущейся константой скорости первого порядка для взаимодействия субстрата с ферментом. Ошибка, допускаемая при таком определении величины V/K_M , будет зависеть от относительной концентрации субстрата; если s составляет 1% K_M , ошибка будет меньше 1%, в то же время, если s составляет 10% K_M , она составит 9%. В случае ферментов, которые характеризуются очень большими величинами K_M , может оказаться затруднительным (из-за ограниченной растворимости субстрата) использовать достаточно большой диапазон s для анализа данных обычным путем. В таких случаях отношение V/K_M можно все же приблизительно определить по участку кривой $v-s$, подчиняющемуся зависимости псевдопервого порядка; такой подход был использован при исследовании ряда протеолитических ферментов [1520, 2877].

Как отмечалось в гл. 2, график хода ферментативной реакции часто является нелинейным. Использование такой кривой для кинетического анализа в общем случае весьма затруднительно, поскольку на скорость реакции могут влиять многочисленные факторы, поэтому до сих пор рассматривались начальные скорости. Однако в частном случае, когда уменьшение скорости реакции обусловлено исключительно уменьшением насыщения фермента вследствие снижения концентрации субстрата, график хода реакции может содержать достаточно информации для определения K_M и V .

Наиболее простой путь анализа такой кривой — это построение нескольких касательных к ней, характеризующих скорость реакции при соответствующих концентрациях (остающегося) субстрата. Такой подход был использован при исследовании кинетики ряда ферментов [2312, 4164], он, конечно, ограничен системами, для которых продукты реакции не являются ингибиторами. Балком и Фитч [256] показали, что кривую для ферментативной реакции, продукт которой является ингибитором, можно описать с помощью уравнения Михаэлиса, если ввести член, который отражает вклад ингибирования данным продуктом. Необходимо, однако, знать тип ингибирования, вызываемого продуктом (см. гл. 8), а это можно достоверно установить только по данным определения начальных скоростей.

Альтернативный подход заключается в анализе графика хода реакции с помощью интегральной формы уравнения Михаэлиса.

Если s_0 — начальная концентрация субстрата, а $s_0 - y$ — концентрация в момент времени t , то скорость в этот момент времени будет определяться выражением

$$\frac{dy}{dt} = \frac{V(s_0 - y)}{K_M + s_0 - y}. \quad (4.27)$$

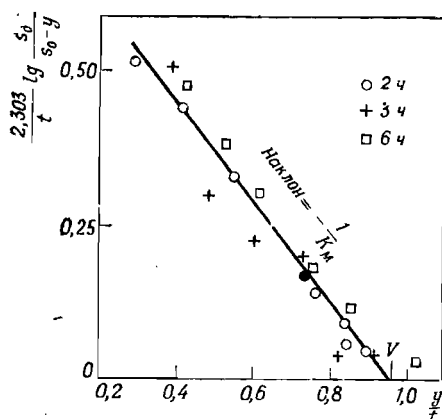


Рис. 4.14. Использование уравнения Михаэлиса в интегральной форме для определения V и K_M [4947]. Фермент — гистидин-аммиак-лиаза (КФ. 4.3.1.3). Ход реакции определяли по образованию NH_3 в течение трех интервалов времени при различных начальных концентрациях субстрата.

Интегрируя, получаем

$$Vt = \int_0^y \frac{s_0 - y + K_M}{s_0 - y} dy = y + K_M \ln \frac{s_0}{s_0 - y}. \quad (4.28)$$

Уравнение такого вида было предложено в 1902 г. Анри [1905]. При условии, что другие неучитываемые факторы не оказывают влияния, это уравнение может быть использовано для определения K_M и V по данным измерений, полученным в ходе реакции, если не удастся определить начальную скорость реакции. Преобразуя (4.28), получаем

$$\frac{2,303}{t} \lg \frac{s_0}{s_0 - y} = \frac{V}{K_M} - \frac{1}{K_M} \cdot \frac{y}{t}. \quad (4.29)$$

Таким образом, если измерить y через определенные промежутки времени и построить график зависимости $\frac{2,303}{t} \lg \frac{s_0}{s_0 - y}$ от y/t , то мы получим прямую с наклоном $-1/K_M$, отсекающую на оси абсцисс отрезок, длина которого соответствует V . Ту же самую прямую можно получить по данным измерений, произведенных через определенный промежуток времени после начала реакции, но при разных s_0 . Поэтому на одном и том же графике могут быть представлены данные измерений для различных t и s_0 . На рис. 4.14 приведены изображенные по этому методу [4947] результаты серии опытов с гистидин-аммиак-лиазой (КФ 4.3.1.3).

Как и исходное уравнение Михаэлиса, уравнение (4.28) существенно упрощается, когда s_0 становится либо очень большим, либо очень малым. Если s_0 очень велико по сравнению с y и с K_M , то мы имеем уравнение $Vt = y$, которое соответствует харак-

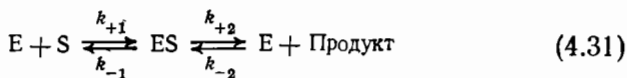
теризуемому постоянной скоростью начальному участку нулевого порядка кривой хода реакции при высокой концентрации субстрата. Если s_0 (а следовательно, и y) очень мало по сравнению с K_M , мы получаем обычное уравнение реакции первого порядка

$$\frac{2,303}{t} \lg \frac{s_0}{s_0 - y} = \frac{V}{K_M}. \quad (4.30)$$

Для каждого данного эксперимента величина V/K_M постоянна. Таким образом, при очень низкой концентрации субстрата реакция описывается уравнением первого порядка с константой скорости V/K_M . Определить V и K_M по отдельности, конечно, не представляется возможным, поэтому специфичность ферментов нельзя выражать через константы скорости реакций первого порядка, полученные в опытах с различными веществами, поскольку этот способ не дает ответа на вопрос о том, какая константа изменяется.

Уравнение (4.30) применимо только при определенных условиях. Чтобы убедиться в том, что измерения проводятся именно в таких условиях, следует построить график зависимости $\lg \frac{s_0}{s_0 - y}$ от t (см. [1231]). Если уравнение применимо, получается прямая и могут быть использованы константы реакции первого порядка; если же наблюдается заметное отклонение от линейности, необходимо использовать уравнение (4.29).

Уравнение (4.29) непосредственно применимо только к необратимым реакциям, поскольку обратимая реакция прекращается не по исчерпанию субстрата, а вследствие достижения равновесия. Олберти [66] показал, что для простой односубстратной реакции



можно использовать интегральное уравнение стационарной кинетики, чтобы найти все четыре константы скорости, если известна концентрация продукта для равновесных условий. Однако сомнительно, чтобы какая-либо реакция соответствовала столь простой схеме. Дарвей и Уильямс [971] развили анализ, проведенный Олберти, и рассмотрели реакцию типа (4.33); они получили также интегральные уравнения для некоторых двухсубстратных реакций в стационарном приближении. Эти вопросы обсуждаются в работе [3551a].

Интегральные уравнения не нашли, однако, широкого применения; во многих случаях графики, характеризующие течение реакции, оказывались слишком сложными для анализа. Использование интегральных уравнений в случае стационарных усло-

вий подверглось критике в работе [4851], и их следует рассматривать скорее как предмет теоретических изысканий, а не как метод анализа экспериментальных данных.

Селвин [4195] отметил, что поскольку V является функцией концентрации фермента e , то

$$et = f(y). \quad (4.32)$$

Следовательно, концентрация продукта y определяется произведением концентрации фермента на время. Если получить серию кривых хода реакций при различных концентрациях фермента и построить графики зависимости y от et , то точки для различных концентраций фермента лягут на одну кривую (рис. 4.15, А). Если, однако, фермент нестабилен и подвергается денатурации в ходе реакции, то уравнение (4.32) оказывается неприменимым, поскольку концентрация активного фермента зависит от времени. В этом случае точки для разных (начальных) концентраций фермента попадут на разные кривые, как показано на рис. 4.15, Б. Такой график, следовательно, является простым тестом для обнаружения возможной денатурации фермента в ходе реакции, хотя подобные отклонения могут быть обусловлены и другими причинами, в том числе несовершенством метода определения (с. 87—88).

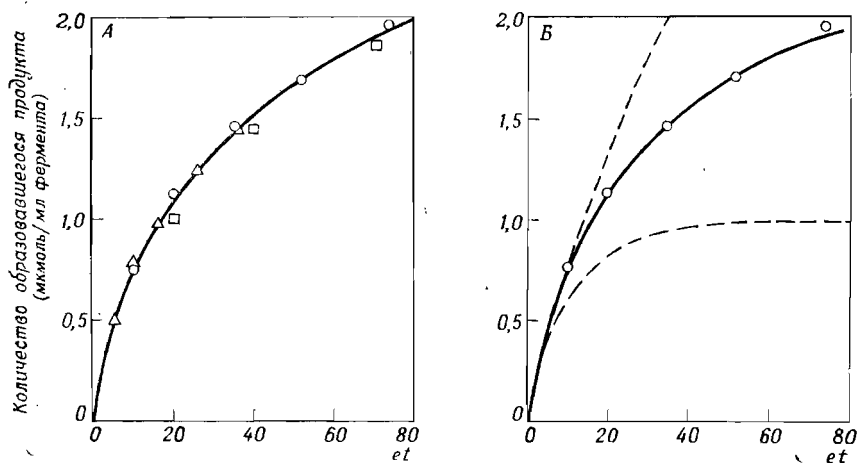


Рис. 4.15. А. Графики хода АТФазной реакции; по оси абсцисс отложено произведение времени на количество фермента. Условия определения: 2,5 мМ АТФ, 2,5 мМ MgSO_4 , 50 мМ Трис- HCl (рН 7,4), общий объем 10 мл, температура 25°. Объем добавленного раствора фермента: Δ — 0,5 мл, $\circ$ — 1,0 мл, $\square$ — 2,0 мл. Б. Графики, построенные в предположении, что уменьшение скорости обусловлено мономолекулярной реакцией денатурации. — график, построенный по экспериментальным точкам рис. А ($\circ$); — — — графики, построенные по предыдущему: нижний — для 0,5 мл добавленного фермента, верхний — для 2,0 мл.

В случае некоторых регуляторных ферментов график хода реакции может быть очень сложным. Ряд таких примеров был проанализирован Фриденом [1422, 1424]; они обсуждаются в гл. 8.

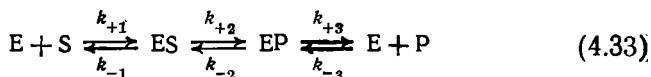
Применимость допущения о стационарности

Гипотеза о том, что концентрация фермент-субстратного комплекса остается практически постоянной во время измерения начальной скорости ферментативной реакции, была подвергнута математическому анализу в ряде работ [1872, 2018, 4974, 4975, 5144]. Как будет показано позже в разделе об измерении скоростей быстрых реакций (с. 260 и далее), говоря о начальной скорости, имеют в виду линейный участок кривой хода реакции, а не обычно очень короткий предстационарный период, в течение которого концентрации фермент-субстратных интермедиатов увеличиваются. При обсуждении техники регистрации быстрых реакций будет также показано, что в условиях, когда концентрация фермента представляет собой величину того же порядка, что и концентрация субстрата, достигаемое стационарное состояние является обычно преходящим. Эти эмпирические наблюдения получили математическое обоснование в работах Уолтера и Моралеса [4975] и Уолтера [4974], которые показали, что предположение о стационарности может привести к относительно большим ошибкам, если бимолекулярная константа скорости для прямой реакции невелика по сравнению с константой скорости обратной реакции, т. е. в ситуации, наиболее вероятной при сравнительно небольшой величине отношения концентраций субстрата и фермента. Однако в условиях, когда $e \ll s$, теоретические ошибки при анализе, предполагающем стационарность, в большинстве случаев незначительны. К аналогичному заключению пришел Уонг [5144]; он показал, что такой анализ может быть применен в условиях, когда имеется линейная зависимость между концентрацией фермента и начальной скоростью.

Системы с несколькими последовательными стадиями

Даже если в реакции участвует только один субстрат, механизм реакции может включать более чем один промежуточный комплекс. При этом уравнение скорости реакции будет содержать больше констант скорости, чем простое уравнение Бриггса — Холдейна, хотя вид его не изменится. Соответствующее уравнение скорости и, следовательно, выражения для V и K_M для реакции с определенным числом промежуточных комплексов могут быть получены либо алгебраическим путем, либо с помощью метода, рассмотренного ниже. Прямое алге-

браическое решение осуществляется следующим образом. Для обратимой системы с двумя интермедиатами



можно записать следующие выражения для изменения концентраций $ES(x)$ и $EP(y)$ во времени, которые для стационарных условий равны нулю:

$$\frac{dx}{dt} = k_{+1}s(e - x - y) + k_{-2}y - (k_{-1} + k_{+2})x = 0, \quad (4.34)$$

$$\frac{dy}{dt} = k_{-3}p(e - x - y) + k_{+2}x - (k_{+3} + k_{-2})y = 0, \quad (4.35)$$

где s и p — концентрации субстрата и продукта соответственно. Если определить начальную скорость прямой реакции в отсутствие продукта, то члены, содержащие p в уравнении (4.35), будут равны нулю.

Выражение для скорости прямой реакции (v_f) можно записать в следующем виде:

$$v_f = k_{+2}x - k_{-2}y. \quad (4.36)$$

Поскольку, однако, стадия освобождения продукта, характеризующаяся константой k_{+3} , необратима (при $p=0$), проще использовать для расчета скорости выражение

$$v_f = k_{+3}y. \quad (4.37)$$

Уравнение (4.35), в котором все члены, содержащие p , опущены, можно преобразовать к виду

$$x = y \frac{k_{+3} + k_{-2}}{k_{+2}} \quad (4.38)$$

и подставить в (4.34), исключив тем самым x . Далее, произведя подстановку в уравнение (4.37), находим

$$v_f = \frac{\frac{k_{+2}k_{+3}}{k_{+2} + k_{-2} + k_{+3}} e}{1 + \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}}{k_{+1}(k_{+2} + k_{-2} + k_{+3})} \cdot \frac{1}{s}}. \quad (4.39)$$

Очевидно, (4.39) можно записать в виде

$$v_f = \frac{V_f}{1 + \frac{K_{M,f}}{s}}, \quad (4.40)$$

что идентично уравнению (4.18). Важно отметить, что анализ, основанный на предположении о стационарности, не позволяет определить индивидуальные константы скорости для более сложных механизмов. Можно лишь объединить константы ско-

рости в сложные константы K_M и V . Очевидно, что константы K_M и V , входящие в (4.40), могут характеризовать систему так же, как и в более простом случае (см. с. 95—97).

Для реакции (4.33), протекающей в обратном направлении в отсутствие s , в (4.40) можно подставить вместо V_f , $K_{M,f}$ и s величины V_b , $K_{M,b}$ и p . Для констант получаем выражения

$$V_b = \frac{k_{-1}k_{-2}e}{k_{+2} + k_{-2} + k_{-1}}, \quad (4.41)$$

$$K_{M,b} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}}{k_{-3}(k_{+2} + k_{-2} + k_{-1})}. \quad (4.42)$$

Уравнение, идентичное (4.40), можно получить для любой одно-субстратной реакции рассматриваемого типа, независимо от того, какое число промежуточных комплексов образуется в ходе реакции, поскольку любая реакция, для которой зависимость v от s характеризуется равнобочной гиперболой, должна описываться уравнением такого вида.

**Константа равновесия, выраженная через V и K_M ;
соотношение Холдейна**

В обратимой односубстратной системе начальная скорость прямой и обратной реакций определяется уравнением Михаэлиса (4.40). Следовательно, система будет характеризоваться четырьмя константами: V_f , V_b , $K_{M,f}$ и $K_{M,b}$. Через некоторое время такая система достигает равновесия, при котором скорости прямой и обратной реакций становятся равными. Константу равновесия с помощью четырех констант можно выразить следующим образом.

Рассмотрим в качестве примера систему, представленную схемой (4.33); отношение $V_f/K_{M,f}$ можно получить из уравнения (4.39):

$$\frac{V_f}{K_{M,f}} = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}e}{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}}. \quad (4.43)$$

Соответствующее выражение для обратной реакции можно найти из уравнений (4.41) и (4.42):

$$\frac{V_b}{K_{M,b}} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3}e}{k_{+2}k_{+3} + k_{-1}k_{+3} + k_{-1}k_{-2}}. \quad (4.44)$$

Разделив одно выражение на другое, получаем

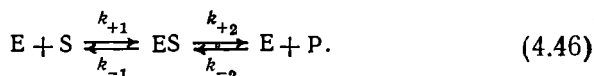
$$\frac{V_f K_{M,b}}{V_b K_{M,f}} = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}}{k_{-1}k_{-2}k_{-3}} = K_1 K_2 K_3 = K, \quad (4.45)$$

где K_1 , K_2 , K_3 — константы равновесия трех стадий реакции (4.33).

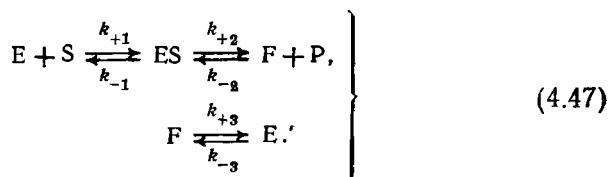
Это важное соотношение впервые выведено Холдейном ([1749], с. 80). Оно применимо ко всем односубстратным системам, если только субстрат не является одновременно активатором или ингибитором. В двухсубстратной системе положение оказывается более сложным, и соотношение Холдейна может указывать на механизм реакции (см. с. 162—163).

Односубстратные реакции, катализируемые ферментом, который может находиться в двух формах

Обычно односубстратные реакции протекают по механизму типа



Имеются, однако, системы, в которых при образовании продукта фермент освобождается в форме F , отличной от формы, связывающей субстрат



Системы такого типа рассматривались рядом авторов [716, 970, 3643]; было показано [4678], что подобная последовательность реакций наблюдается при функционировании фумарат-гидратазы (КФ 4.2.1.2). Хотя обе системы (4.46) и (4.47) подчиняются стандартному уравнению Михаэлиса — Ментен (4.18) и соотношения Холдейна для обоих уравнений идентичны, Пеллер и Олберти [3643] показали, что эти системы описываются кинетическими уравнениями различного вида, если в систему вначале вводится продукт реакции. Анализ системы (4.46) в предположении стационарности с использованием уравнения

$$v_f = k_{+2}x - k_{-1}x, \quad (4.48)$$

где v_f — начальная (полная) скорость прямой реакции, а x — концентрация ES , приводит к следующему выражению:

$$v_f = \frac{\frac{V_f}{K_f} s - \frac{V_b}{K_b} p}{1 + \frac{s}{K_f} + \frac{p}{K_b}}, \quad (4.49)$$

где K_f и K_b , V_f и V_b — константы Михаэлиса и максимальные скорости для прямой и обратной реакций соответственно. По-

добный анализ для системы (4.47) приводит к выражению

$$v_f = \frac{\frac{V_f}{K_f} s - \frac{V_b}{K_b} p}{1 + \frac{s}{K_f} + \frac{p}{K_b} + \frac{sp}{K_{sp}}}, \quad (4.50)$$

которое содержит в знаменателе дополнительный член, включающий s и p . Ценнамо [716] отметил, что при насыщающих концентрациях S уравнение (4.49) упрощается до

$$v_f = V_f, \quad (4.51)$$

а (4.50) — до

$$v_f = \frac{V_f}{1 + \frac{p}{K_{sp}}}. \quad (4.52)$$

Следовательно, эти системы можно различить, построив график зависимости $1/v$ от p при насыщающей концентрации S . Этот график представляет собой прямую с наклоном в случае механизма (4.47) и прямую, параллельную оси p , для механизма (4.46).

Дарвей [970] отметил, что, введя обозначение $\Delta v_f = (v_f \text{ при } p=0) - (v_f \text{ при данном } p)$, уравнение (4.49) можно записать в виде

$$\Delta v_f = \frac{K_f [(V_f + V_b) s + V_b K_f] p}{K_b (K_f + s)^2 + K_f (K_f + s) p}, \quad (4.53)$$

а уравнение (4.50) — как

$$\Delta v_f = \frac{K_f [V_f (K_{sp} + K_b s) + V_b K_{sp} (K_f + s)] p}{K_b K_{sp} (K_f + s)^2 + K_f (K_f + s) (K_{sp} + K_b s) p}. \quad (4.54)$$

Видно, что для обоих уравнений графики зависимости $1/\Delta v_f$ от $1/p$ при фиксированном s являются линейными. Если получить серию графиков для нескольких значений s , то длины отрезков, отсекаемых прямыми на оси $1/p$, будут равны.

$$\text{Длина отрезка} = -K_f/K_b (K_f + s) \quad (4.55)$$

для уравнения (4.53) и

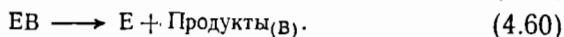
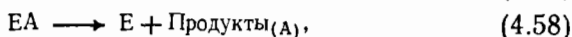
$$\text{Длина отрезка} = -\frac{K_f (K_{sp} + K_b s)}{K_b K_{sp} (K_f + s)} \quad (4.56)$$

для уравнения (4.54).

Из этого следует, что график зависимости $1/(\text{длина отрезка})$ от s будет линейным в случае механизма (4.46) [уравнение (4.53)] и нелинейным в случае механизма (4.47) [уравнение (4.54)].

Ферменты, катализирующие одновременно две реакции

Если фермент не обладает абсолютной специфичностью, т. е. если он действует более чем на один субстрат, то мы можем допустить, что такой фермент способен действовать на два одновременно присутствующих разных субстрата. Этот случай не может рассматриваться как осуществление двух независимых параллельных реакций, так как оба субстрата связываются с одним и тем же активным центром, и поэтому между субстратами будет иметь место конкуренция. Для фермента, действующего на два субстрата, А и В, имеем



Когда рассматривается превращение А, то В ведет себя просто как конкурентный ингибитор, и наоборот. Поэтому скорость превращения А по аналогии с уравнением (8.6) (см. ниже) будет выражаться уравнением

$$v_a = \frac{V_a}{1 + \frac{K_a}{a} \left(1 + \frac{b}{K_b}\right)}, \quad (4.61)$$

а скорость превращения В — уравнением

$$v_b = \frac{V_b}{1 + \frac{K_b}{b} \left(1 + \frac{a}{K_a}\right)}. \quad (4.62)$$

Сумма скоростей реакций (4.61) и (4.62), обозначенная через v_t , будет равна

$$v_t = v_a + v_b = \frac{V_a \frac{a}{K_a} + V_b \frac{b}{K_b}}{1 + \frac{a}{K_a} + \frac{b}{K_b}}. \quad (4.63)$$

Суммарная скорость реакции v_t для смеси, содержащей А и В соответственно в концентрациях a и b , должна быть промежуточной между скоростями, которые наблюдались бы в опытах с такими же концентрациями субстратов А и В, взятых раздельно. Если для удобства рассмотрения сделать допущение, что константа скорости реакции (4.58) больше, чем константа скорости реакции (4.60), то максимальная скорость, достижи-

мая для смеси субстратов А и В, будет V_a . Можно поэтому определить величину относительной скорости φ_t как

$$\varphi_t = \frac{v_t}{V_a}. \quad (4.64)$$

Тогда уравнение (4.63) можно представить в виде

$$\varphi_t = \frac{\alpha + R\beta}{1 + \alpha + \beta}, \quad (4.65)$$

где α и β — относительные концентрации, а R , которое должно быть меньше единицы, введено для обозначения отношения V_b/V_a .

Если оба субстрата присутствуют в одинаковой концентрации, т. е. $a=b$, то возможны два случая, представляющие особый интерес. В первом случае можно измерить скорость каждой из реакций в отдельности, во втором — скорость суммарной реакции (например, при определении количества кислоты, образующейся в результате действия эстеразы).

Отношение скоростей распада А и В в эквимольной смеси находим в первом случае путем деления уравнения (4.61) на уравнение (4.62), что дает

$$\frac{v_a}{v_b} = \frac{V_a K_b}{V_b K_a}. \quad (4.66)$$

Во втором случае [4731, 5082], считая $a=b=s$ и обозначив скорость реакции в эквимольной смеси v_m , по уравнению (4.63) находим

$$v_m = \frac{\frac{V_a}{K_a} + \frac{V_b}{K_b}}{\frac{1}{s} + \frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_b}}. \quad (4.67)$$

Максимальная скорость, достигаемая в эквимольной смеси, равна

$$V_m = \frac{\frac{V_a}{K_a} + \frac{V_b}{K_b}}{\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_b}}, \quad (4.68)$$

откуда после преобразования получаем

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{V_a - V_m}{V_m - V_b}. \quad (4.69)$$

Таким образом, отношение величин сродства фермента к двум субстратам можно найти по данным определений скорости в трех случаях, а именно по величинам максимальных скоростей для каждого из субстратов в отдельности и для их эквимольной смеси. При изучении специфичности действия ферментов не-

обходимо только получить полную кривую зависимости скорости реакции от концентрации одного из субстратов; после того как будет определено значение K_m для этого субстрата, значение K_m для другого субстрата может быть рассчитано на основании уравнения (4.69) по данным измерений скоростей при использовании смеси субстратов. С помощью этого метода [24] была изучена холинэстераза (КФ 3.1.1.8). Данный метод дает точные результаты только в том случае, если V_a значительно отличается от V_b и в то же время K_a не слишком отличается от K_b .

Метод определения скорости в смеси субстратов широко использовался (часто, впрочем, в полуколичественной форме) для решения вопроса о том, катализируются ли две рассматриваемые реакции одним и тем же или разными ферментами. В одном из таких случаев скорость гидролиза бензоилхолина препаратом холинэстеразы из сыворотки лошади [4550] выражалась величиной $440 \text{ мкл} \cdot \text{ч}^{-1}$, скорость гидролиза изоамилацетата — $131 \text{ мкл} \cdot \text{ч}^{-1}$, а смесь этих двух субстратов гидролизвалась со скоростью $314 \text{ мкл} \cdot \text{ч}^{-1}$. Если бы гидролиз осуществлялся двумя разными ферментами, скорость его должна была бы равняться сумме скоростей гидролиза отдельных субстратов, а именно $571 \text{ мкл} \cdot \text{ч}^{-1}$. На основании же приведенных выше данных было сделано заключение, что гидролиз ряда холиновых и других эфиров осуществляется одним и тем же ферментом.

Тот же метод можно использовать и как количественный, если известны относительные концентрации α и β этих субстратов (т. е. если известны константы Михаэлиса) [5012]. Если оба субстрата атакуются одним и тем же ферментом, то из уравнения (4.63)

$$v_i = \frac{V_a \alpha + V_b \beta}{1 + \alpha + \beta}. \quad (4.70)$$

Когда присутствует только один из субстратов, то

$$v_a = \frac{V_a \alpha}{1 + \alpha}, \quad (4.71)$$

$$v_b = \frac{V_b \beta}{1 + \beta}. \quad (4.72)$$

Подставляя (4.71) и (4.72) в (4.70), получаем

$$v_i = \frac{v_a (1 + \alpha) + v_b (1 + \beta)}{1 + \alpha + \beta}. \quad (4.73)$$

Если субстраты присутствуют в равных *относительных* концентрациях, $\alpha = \beta = \sigma$, то

$$v_i = (v_a + v_b) \cdot \frac{1 + \sigma}{1 + 2\sigma}. \quad (4.74)$$

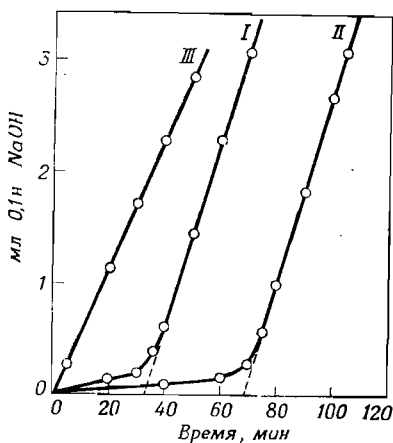


Рис. 4.16. Латентный период, обусловленный наличием примесей в субстрате [5108]. Гидролиз этилового эфира миндальной кислоты карбоксилэстеразой печени. I — 0,008 М редистиллированного субстрата; II — 0,016 М редистиллированного субстрата; III — 0,008 М перекристаллизованного субстрата.

Следовательно, скорость превращения смеси субстратов падает от значения, равного сумме скоростей превращения каждого из субстратов (в отсутствие второго) для случая, когда σ очень мало, до $\frac{3}{4}$ этой суммы при $\sigma = \frac{1}{2}$, до $\frac{2}{3}$ при $\sigma = 1$ и до $\frac{1}{2}$, когда σ очень велико.

Хотя метод смешанных субстратов обычно является весьма эффективным способом обнаружения двух ферментов с разными значениями V , в одном частном случае наличие двух ферментов выявить не удастся. Это происходит тогда, когда субстрат первого фермента одновременно является конкурентным ингибитором второго фермента и при этом K_i для второго фермента близка к K_m для первого фермента (и наоборот). Подобную ситуацию рассматривали Хоуслей и Типтон [2060] при исследовании флавиносодержащей аминоксидазы (КФ 1.4.3.4).

Интересное явление наблюдается в том случае, когда субстрат содержит в виде загрязняющей примеси небольшое количество другого субстрата, обладающего значительно большим сродством к ферменту и в то же время гидролизующегося со значительно меньшей максимальной скоростью, чем испытуемый субстрат. Подобный случай был описан Вильштеттером [5108] при изучении гидролиза редистиллированного этилового эфира миндальной кислоты карбоксилэстеразой печени (КФ 3.1.1.1). Субстрат содержал небольшие количества соответствующего кетоефира, который обладал очень высоким сродством к ферменту, но медленно им расщеплялся. Благодаря высокому сродству кетоефир почти полностью вытеснял основной субстрат из комплекса с ферментом и, действуя как конкурентный ингибитор, снижал наблюдаемую скорость реакции почти до нуля. При этом, однако, кетоефир подвергался медленному, но непрерывному гидролизу, и, когда после завершения его гид-

ролиза основной субстрат получал, наконец, доступ к ферменту, скорость гидролиза основного субстрата резко увеличивалась, как показано на рис. 4.16. Таким образом, в этом случае наблюдался длительный латентный период, продолжительность которого была пропорциональна количеству взятого субстрата (и, следовательно, количеству загрязняющей примеси). После латентного периода начиналась нормальная реакция, при которой количество образовавшейся кислоты линейно зависит от времени. Если же эфир подвергали очистке путем перекристаллизации, латентного периода не наблюдалось.

Два фермента, действующие на один субстрат

Превращение субстрата может катализироваться одновременно двумя или большим числом ферментов.

Рассмотрим действие двух ферментов, которые мы обозначим индексами 1 и 2; полная скорость превращения субстрата будет равна сумме скоростей двух отдельных реакций

$$v_t = \frac{V_1}{1 + \frac{K_1}{s}} + \frac{V_2}{1 + \frac{K_2}{s}}, \quad (4.75)$$

откуда

$$\frac{1}{v_t} = \frac{1 + \frac{K_1 + K_2}{s} + \frac{K_1 K_2}{s^2}}{V_1 + V_2 + \frac{V_1 K_2 + V_2 K_1}{s}}. \quad (4.76)$$

Форма кривой, описываемой этим уравнением, будет зависеть от соотношения величин K_1 и K_2 . Если $K_1 = K_2$, то кривая превращается в прямую, как в случае действия одного фермента (рис. 4.17, А, кривая 1). Длины отрезков, отсекаемых этой прямой на осях координат, равны в этом случае $1/(V_1 + V_2)$ и $-1/K_1 (= -1/K_2)$. Если константы K_1 и K_2 различаются, то зависимость не будет линейной и результаты будет трудно интерпретировать. Ряд теоретических кривых, полученных по уравнению (4.76) и изображенных на рис. 4.17, А, показывает влияние изменения K_2 на форму кривых при $V_1 = V_2 = 1$ и постоянном $K_1 = 10^{-3}$; кривые, изображенные на рис. 4.17, Б, показывают влияние изменений V_1 и V_2 при постоянных K_1 и K_2 , равных соответственно 10^{-3} и 10^{-4} .

Все кривые представляют собой гиперболы с двумя ветвями. У каждой гиперболы часть одной из ее двух ветвей и вся вторая ветвь целиком не описывают никакого реального процесса, так как им соответствуют отрицательные значения концентрации субстрата. Две ветви гиперболы пересекают ось абсцисс соответственно в точках $-1/K_2$ и $-1/K_1$, в чем можно легко убедиться при анализе уравнения (4.76).

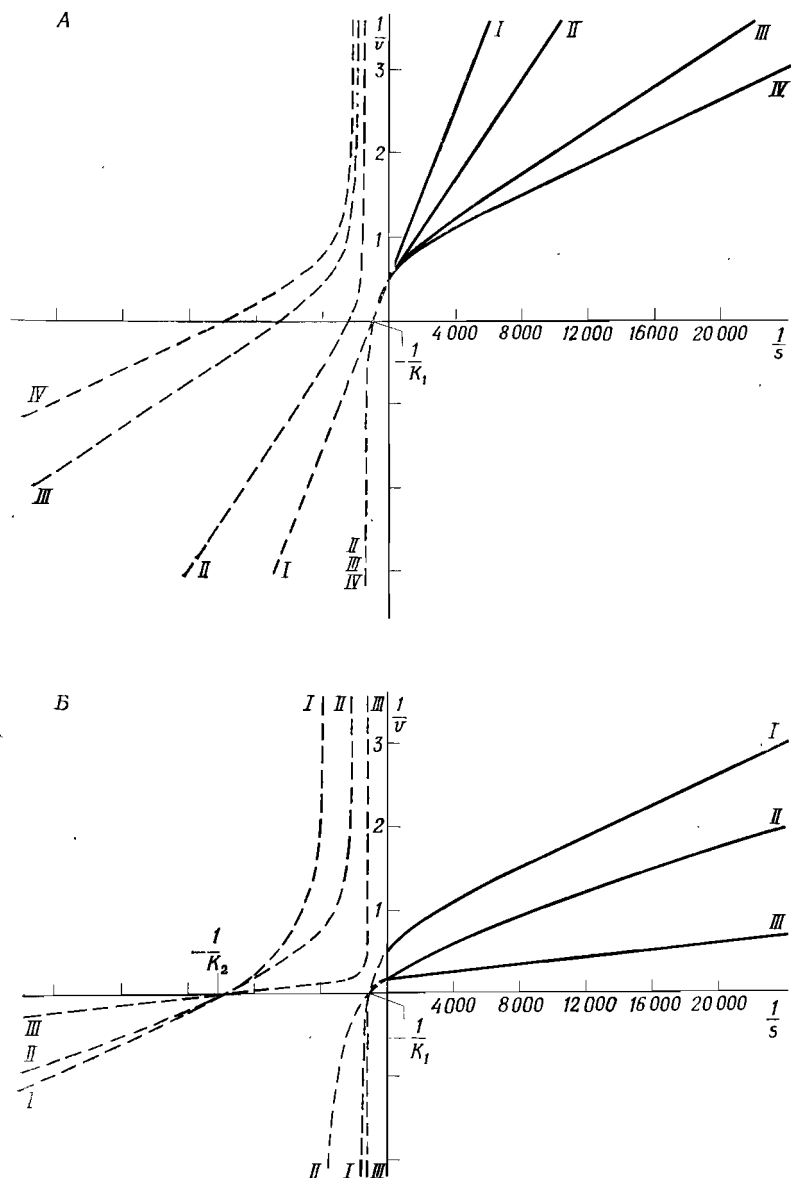


Рис. 4.17. Гидролиз одного субстрата двумя ферментами. Теоретические кривые, построенные по уравнению (4.76). А. $V_1 = V_2 = 1$, $K_1 = 10^{-3}$ М. I — $K_2 = 10^{-3}$; II — $K_2 = 4 \cdot 10^{-4}$; III — $K_2 = 1,5 \cdot 10^{-4}$; IV — $K_2 = 10^{-4}$. Б. $K_1 = 10^{-3}$ М, $K_2 = 10^{-4}$ М. I — $V_1 = 1$, $V_2 = 1$; II — $V_1 = 5$, $V_2 = 1$; III — $V_1 = 1$, $V_2 = 5$.

Если концентрация субстрата достаточно низка, то все рассмотренные выше кривые приближаются к прямым, пересекающим ось абсцисс в точке $-1/K_2$. Этого и следует ожидать, так как при очень низких концентрациях субстрата только фермент с большим сродством к субстрату будет оказывать существенное влияние на скорость реакции.

Для всех представленных кривых предполагается, что $K_1 > K_2$. По мере уменьшения величины $1/s$ кривые изгибаются, потому что, как было указано выше, их воображаемые продолжения должны пересечь ось абсцисс в точке $-1/K_1$. В некоторых случаях, например для условий, соответствующих кривой IV на рис. 4.17, А и кривой III на рис. 4.17, Б, этим изгибом можно на практике пренебречь. Если при этом рассматривать систему как одноферментную и через точки, рассчитанные по уравнению, провести прямую, то будет найдена величина K_M — промежуточная между K_1 и K_2 .

В работах ряда авторов [1105, 3885, 4462] отмечено, что при определении величин K_M и V путем экстраполяции линейных участков графиков двойных обратных величин могут иметь место большие ошибки; отношение градиентов при $1/s=0$ и $1/s=\infty$ является мерой отклонения графика от линейности; это отношение (r) определяется выражением

$$r-1 = \frac{V_1 V_2 (K_1 - K_2)^2}{K_1 K_2 (V_1 + V_2)^2} \quad (4.77)$$

Для линейного графика (кривизна равна нулю) r будет равно единице, а $r-1$ — нулю. Для данных K_1 и K_2 кривизна будет максимальна при $V_1=V_2$. Поскольку выражение (4.77) симметрично по отношению к V_1 и V_2 , уменьшение кривизны в случае, когда один из ферментов является относительно более активным, не зависит от того, какой именно из ферментов более активен. Как отмечалось выше, степень кривизны зависит также от отношения величин K_M , и оно должно быть достаточно велико, чтобы можно было обнаружить двухфазность; так, например, при отношении величин K_1 и K_2 , равном 5, крутизна графика изменяется только в 2 раза.

Как видно из рис. 4.17, очень трудно экстраполировать график в области $1/s \rightarrow 0$, поскольку увеличение кривизны определяется выражением $d^2(1/v)/d(1/s)^2$, которое увеличивается при $1/s \rightarrow 0$. На практике это приводит к тому, что в случае больших K_M их значения, полученные путем экстраполяции, оказываются заниженными. С другой стороны, в случае малых K_M экстраполяция графика в области больших значений $1/s$ приводит лишь к небольшому занижению величины K_M ; при этом, однако, для получения достаточно точных данных необходимо определить скорости при $s \ll K_2$. Кажущиеся значения K_M и V ,

определяемые по точкам пересечения касательных при $1/s=0$ и $1/s=\infty$ с осью $-1/s$, вычисляются с помощью выражений (4.78) — (4.81) [4462]:

$$K_{1,\text{каж}} = \frac{K_1 V_1 + K_2 V_2}{V_1 + V_2}, \quad (4.78)$$

$$K_{2,\text{каж}} = \frac{K_2 V_2 + (K_2^2/K_1) V_1}{V_2 + (K_2^2/K_1^2) V_1}, \quad (4.79)$$

$$V_{2,\text{каж}} = \frac{[V_2 + (K_2/K_1) V_1]^2}{V_2 + (K_2^2/K_1^2) V_1}, \quad (4.80)$$

$$V_{1,\text{каж}} = V_t - V_{2,\text{каж}}, \quad (4.81)$$

где V_t — суммарная максимальная скорость, определяемая по точке пересечения гиперболы с осью $1/v$.

Очевидно, что достаточно точно определить K_1 трудно. Если $K_1 \gg K_2$ и $V_1 = V_2$, то определяемая величина будет приблизительно в два раза меньше истинной, в то же время при $K_1 \gg K_2$ и $V_2 \gg V_1$ график зависимости обратных величин не будет иметь кривизны. Определение K_2 оказывается, очевидно, более точным при $K_1 \gg K_2$ и $V_2 \gg V_1$, но весьма надежные данные получаются также при $K_1/K_2 = 10$ и $V_1 = V_2$. Величина V_2 определяется менее надежно, чем K_2 , поскольку выражение в числителе возводится в квадрат; эта величина более точна при $K_1 \gg K_2$ и $V_2 \gg V_1$. Ошибки в величине V_1 , вероятно, определяются в основном ошибкой в определении V_2 , поскольку V_t можно определить с удовлетворительной точностью. Таким образом, условия для точного определения каждой из констант и для максимального проявления двухфазности не совпадают.

Приведенные выше данные показывают, что путем экстраполяции нельзя получить надежные результаты; Спearс, Снейд и Лотен [4412] предложили подход, основанный на методе последовательных приближений, который позволяет весьма точно охарактеризовать параметры уравнения Михаэлиса.

Нерастворимые субстраты

Обычно ферментативные реакции протекают в растворе. Когда количество добавленного субстрата превышает предел его растворимости, то избыток субстрата не участвует в реакции. Если растворимость субстрата не слишком велика при сопоставлении ее с константой Михаэлиса, то скорость реакции будет определяться уравнением Михаэлиса только до достижения предела растворимости; при дальнейшем добавлении субстрата скорость увеличиваться не будет. Величина V [уравнение (4.11)] никогда не будет достигнута, так как концентрация субстрата, которая насыщает водный раствор, будет недостаточ-

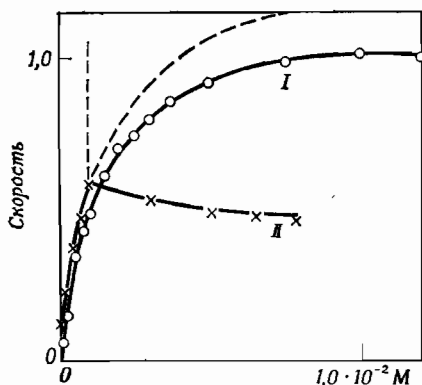


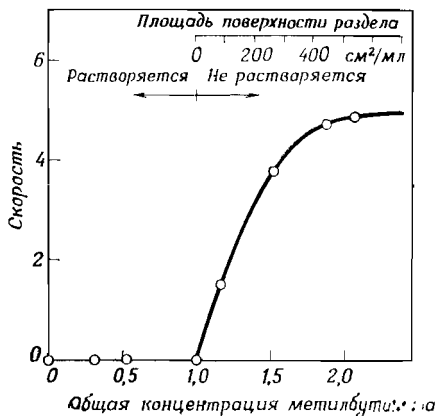
Рис. 4.18. Зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата при действии карбоксилэстеразы [5011]. I — гидролиз этилбутирата; II — гидролиз трибутирина. Вертикальная пунктирная прямая указывает предел растворимости трибутирина.

ной для насыщения фермента. На рис. 4.18 приведены результаты типичного опыта с карбоксилэстеразой печени (КФ 3.1.1.1), гидролизующей этилбутират и трибутирин. Весь добавленный этилбутират находился в растворенном состоянии. Трибутирин, который относительно мало растворим, добавляли в виде эмульсии; достигаемая при этом конечная концентрация показана на графике. В области слева от пунктирной прямой (см. график) трибутирин полностью растворялся и образовывал прозрачный водный раствор; в области справа растворялась только часть эмульсии, и концентрация трибутирина в растворе была предположительно постоянна.

Сарда и Дэсньюэл [4071] показали, что панкреатическая липаза (КФ 3.1.1.3) не действует на растворенные субстраты; она активна только при адсорбции на поверхности раздела фаз гидролизующий эфир — вода (очевидно, вследствие того, что только в этом случае обнажается ее активный центр). При работе с очень малорастворимым субстратом, например триолеином, применяемым в виде эмульсии, получают типичную кривую Михаэлиса, исходящую из начала координат. В то же время с более растворимым субстратом, например метилбутиратом, не обнаруживается активности в области полного его растворения, т. е. слева от пунктирной прямой; кривая Михаэлиса исходит в этом случае из точки, в которой водная фаза оказывается насыщенной эфиром (рис. 4.19). Таким образом, получается картина, полностью противоположная той, которая представлена на рис. 4.18 для карбоксилэстеразы.

Если между свободным и адсорбированным ферментом устанавливается равновесие, то по положению кривой может быть определена «константа Михаэлиса», которая представляет собой константу диссоциации комплекса фермент — поверхность раздела. Вместо концентрации субстрата, как в обычной теории, в выражение для константы входит площадь поверхности разде-

Рис. 4.19. Зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата (метилбутират) при действии панкреатической липазы [4071]. Скорость выражена в процентах от максимальной скорости, определяемой в опытах по гидролизу триолеина; концентрация отнесена к концентрации насыщенного раствора, принятой за 1,0.



ла; она зависит от степени эмульгирования, а также от количества присутствующего субстрата. Сарда и Дэсньюэл выражают свои результаты в форме константы Михаэлиса, определяемой как молярная поверхностная концентрация при скорости реакции, равной половине максимальной. Под молярной поверхностной концентрацией понимается площадь всех поверхностей раздела в одном литре эмульсии, деленная на площадь поверхности, занимаемой одним молекул субстрата. Поскольку число молекул фермента, способных одновременно взаимодействовать с 1 см^2 поверхности раздела, определяется главным образом тем, какую площадь занимает одна молекула фермента, а не площадью, приходящейся на одну молекулу субстрата (ибо эта последняя имеет значительно меньшие размеры), то, вероятно, лучше пользоваться реальной величиной площади поверхности раздела.

Кинетические уравнения для ферментов, действующих на два и большее число субстратов

Общие методы получения уравнений для стационарных условий

Для ферментативной реакции с определенной последовательностью стадий можно составить систему совместных уравнений. Согласно одному из них, сумма концентраций всех форм фермента остается постоянной, согласно другим (одно уравнение для каждого ферментного комплекса) — концентрация соответствующего комплекса остается постоянной в стационарных условиях; в эти последние уравнения входят константы скорости всех тех превращений, в которых участвует рассматриваемый

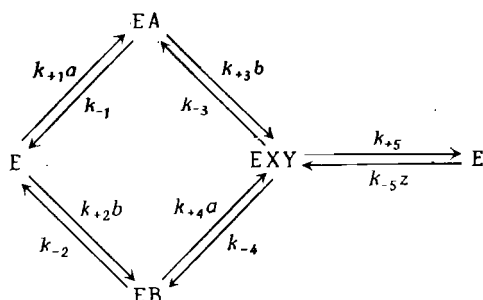


Рис. 4.20. Схема реакций для ферментной системы, рассматриваемой на рис. 4.21. Суммарная реакция: $A+B \rightleftharpoons Z$.

комплекс. В некоторых случаях эту систему уравнений можно решить обычными методами, как это было сделано для простой системы, рассмотренной на с. 110—111, и найти выражение для концентрации интересующего нас промежуточного комплекса, аналогичное уравнению (4.15); умножение полученной величины на константу скорости распада этого комплекса даст значение скорости суммарной реакции.

Для ряда частных случаев путем прямого расчета были получены соответствующие уравнения; две наиболее ранние сводки по этому вопросу составлены Сегалом, Кахмаром и Бойером [4182] в 1952 г. и Ингрехемом и Маковым [2139] в 1954 г.; дальнейшую разработку вопроса провели Дальциль [956], Олберти [64], Келланд [799], Плоумэн [3701], а также Бэкер и Малер [252].

Кинг и Альтман [2458] для решения рассмотренной выше системы уравнений применили метод детерминантов и на основании полученных результатов сформулировали ряд важных правил, которые позволяют найти выражение для скорости реакции без утомительного вычисления значений отдельных детерминантов. Метод лучше всего рассмотреть и проанализировать на конкретном примере. Будет рассмотрен случай, когда фермент катализирует реакцию между двумя субстратами A и B с образованием продукта Z; в ходе реакции в результате последовательного взаимодействия A и B в случайном порядке с ферментом образуется тройной комплекс (который мы обозначим EXY). Схема реакций с константами скорости и промежуточными комплексами приведена на рис. 4.20. Это один из нескольких примеров, рассмотренных Уонгом и Хейнсом [5149] на основе метода Кинга и Альтмана.

Этот метод заключается в составлении комбинаций стрелок, отражающих переходы между различными состояниями фермента; комбинации составляются в соответствии с определенными правилами, и каждая из них отвечает определенному члену в уравнении скорости суммарной реакции. Для получения членов числителя строят все возможные комбинации стрелок, которые удовлетворяют следующим требованиям:

- а) от каждого ферментсодержащего комплекса (включая сам свободный фермент) отходит одна стрелка (не более);
- б) стрелки не должны образовывать замкнутого цикла;
- в) изображается только одно направление данной стадии.

Следует напомнить, что первым и последним элементом схемы на рис. 4.20 является свободный фермент. Для схемы, приведенной на рис. 4.20, имеется восемь возможных комбинаций стрелок (они показаны на рис. 4.21), удовлетворяющих приведенным выше требованиям для членов числителя. Каждой комбинации отвечает произведение соответствующих констант скорости. Половина членов числителя относится к прямой реакции, половина — к обратной. Члены, относящиеся к прямой реакции, положительны, и в них входит концентрация субстрата. Члены, относящиеся к обратной реакции, отрицательны, и в них входит концентрация продукта.

Члены знаменателя получают, составляя по схеме рис. 4.20 все возможные нециклические комбинации стрелок, содержащие на одну стрелку меньше, чем для числителя. При этом должны выполняться те же самые требования, за исключением того, что на схеме всегда имеется одна форма, от которой не отходит стрелка. Комбинации стрелок для знаменателя также приведены на рис. 4.21. Под каждой комбинацией стрелок показан соответствующий член, входящий в уравнение скорости.

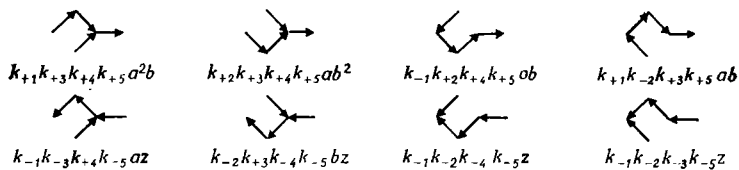
Так получают уравнение скорости реакции для обратимой системы, показанной на рис. 4.20:

$$v = \frac{(c_1ab + c_2a^2b + c_3ab^2 - c_4z - c_5az - c_6bz) e}{c_7 + c_8a + c_9b + c_{10}ab + c_{11}a^2 + c_{12}b^2 + c_{13}a^2b + c_{14}ab^2 + c_{15}z + c_{16}az + c_{17}bz + c_{18}abz}, \quad (4.82)$$

где

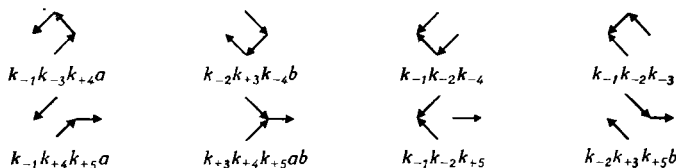
$$\begin{aligned} c_1 &= k_{+1}k_{-2}k_{+3}k_{+5} + k_{-1}k_{+2}k_{+4}k_{+5}, \\ c_2 &= k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{+5}, \\ c_3 &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}, \\ c_4 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5}, \\ c_5 &= k_{-1}k_{-3}k_{+4}k_{-5}, \\ c_6 &= k_{-2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}, \\ c_7 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_{+5}, \\ c_8 &= k_{+1}k_{-2}k_{-3} + k_{+1}k_{-2}k_{-4} + k_{+1}k_{-2}k_{+5} + k_{-1}k_{-3}k_{+4} + k_{-1}k_{+4}k_{+5}, \\ c_9 &= k_{-1}k_{+2}k_{-3} + k_{-1}k_{+2}k_{-4} + k_{-1}k_{+2}k_{+5} + k_{-2}k_{+3}k_{-4} + k_{-2}k_{+3}k_{+5}, \\ c_{10} &= k_{+1}k_{-2}k_{+3} + k_{+1}k_{+2}k_{+4} + k_{+1}k_{+3}k_{-4} + k_{+2}k_{-3}k_{+4} + k_{+3}k_{+4}k_{+5}, \\ c_{11} &= k_{+1}k_{-3}k_{+4} + k_{+1}k_{+4}k_{+5}, \\ c_{12} &= k_{+2}k_{+3}k_{-4} + k_{+2}k_{+3}k_{+5}, \end{aligned}$$

8 членов числителя:

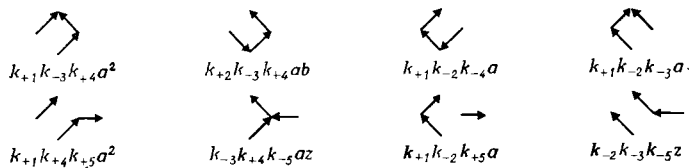


32 члена знаменателя:

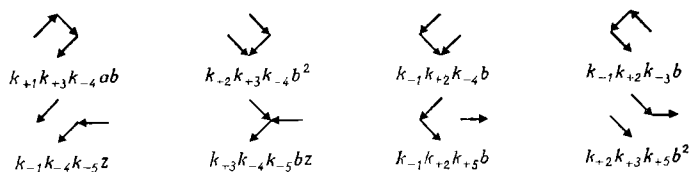
8 членов, оканчивающихся на E:



8 членов, оканчивающихся на EA:



8 членов, оканчивающихся на EB:



8 членов, оканчивающихся на EXY:

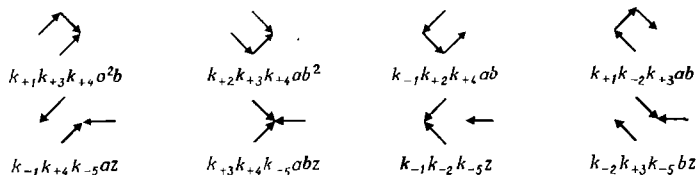


Рис. 4.21. Схема составления членов выражения для скорости реакции по методу Кинга и Альтмана.

$$\begin{aligned}
c_{13} &= k_{+1}k_{+3}k_{+4}, \\
c_{14} &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}, \\
c_{15} &= k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}, \\
c_{16} &= k_{-1}k_{+4}k_{-5} + k_{-3}k_{+4}k_{-5}, \\
c_{17} &= k_{-2}k_{+3}k_{-5} + k_{+3}k_{-4}k_{-5}, \\
c_{18} &= k_{+3}k_{+4}k_{-5}.
\end{aligned}$$

Применение метода Кинга и Альтмана для некоторых других кинетических механизмов описано Плоумэном [3701]. Предложен ряд вариантов метода Кинга и Альтмана (Волькенштейн и Гольдштейн [4922], Фромм [1450]), несколько упрощающих его применение. Райнер [3885] предложил простой путь решения кинетических уравнений с помощью детерминантов; составлен также ряд программ для вывода кинетических уравнений, описывающих поведение ферментных систем, с помощью ЭВМ [49, 1354, 2091, 2137].

Реакции с участием двух субстратов

Рассмотрим трансферазную реакцию



в ходе которой X переносится от А к В. Такая схема характерна для многих катализируемых ферментами реакций, в том числе окислительно-восстановительных и трансферазных. Реакция может идти по одному из нескольких путей; схема, иллюстрирующая большинство обычных путей, приведена на рис. 4.22.

При протекании реакции по механизму, представленному верхней частью схемы, субстраты не встречаются друг с другом на поверхности фермента; в ходе реакции образуются комплекс Х с ферментом и комплексы фермента либо с молекулой субстрата, либо с молекулой продукта. Такие комплексы называют двойными. Другой механизм, представленный остальной частью схемы, помимо двойных комплексов (ЕАХ, ЕВ, ЕВХ, ЕА) включает образование комплексов, в которых с ферментом связаны молекулы обоих субстратов. Такие комплексы называют тройными.

В случае механизма с образованием тройных комплексов субстраты могут связываться в любой последовательности, как показано на рис. 4.22; такой путь называют механизмом с не-

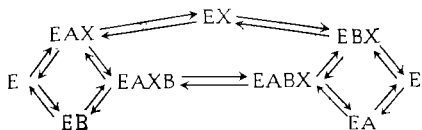
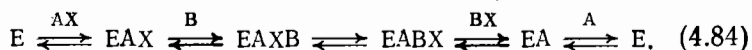


Рис. 4.22. Схема, иллюстрирующая возможные пути трансферазной реакции.

упорядоченным присоединением субстратов или чаще просто неупорядоченным механизмом. В альтернативном случае, напротив, наблюдается упорядоченное присоединение субстратов, например связывание АХ всегда предшествует связыванию В:



Такой путь называют механизмом с упорядоченным присоединением субстратов или просто упорядоченным механизмом.

В рамках этих двух классов кинетических механизмов имеются различные варианты, и установить конкретный механизм часто позволяет исследование кинетики в стационарных условиях. Кинетика двухсубстратных реакций была детально проанализирована рядом авторов (Олберти [64, 465], Бекер и Малер [252], Келланд [799, 803], Уонг и Хейнс [5149], Дальциль [956], Фромм [1449] и Фриден [1417]). К сожалению, в этих работах использовались разные обозначения кинетических констант, что затрудняет сопоставление результатов (см. с. 173). В данной книге используются обозначения, рекомендованные Международным биохимическим союзом, а кинетические уравнения представлены в той форме, в которой они даны Олберти [64]. Для реагентов, участвующих в полисубстратных реакциях, применена та же номенклатура, что и в работе Келланда [799]. Так, в реакции $A + B + C + \dots = P + Q + R + \dots$ Р — продукт, образующийся из А, Q — продукт, образующийся из В, и т. д., хотя, конечно, не всегда можно точно установить происхождение продукта. Кинетический анализ в этой и других главах проведен по методу Типтона [4750].

Уравнение скорости в стационарных условиях для двухсубстратных систем с неупорядоченным присоединением субстрата было выведено по методу Кинга и Альтмана. Для этого кажущегося простым механизма получаются более сложные кинетические уравнения, чем для других двухсубстратных систем; более подробно эта система будет рассмотрена позже.

Обычные кинетические механизмы двухсубстратных реакций типа



(за исключением случаев с неупорядоченным присоединением субстратов) приводят к уравнению скорости, имеющему вид (4.86). Константы, входящие в это уравнение, могут быть выражены через соответствующие константы скорости (в зависимости от конкретного кинетического механизма) (см. табл. 4.3).

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab}}. \quad (4.86)$$

Это уравнение сходно с уравнением для односубстратной системы; отличие состоит в том, что оно содержит константы для каждого из субстратов (K_M^A и K_M^B), а также член, включающий произведение констант Михаэлиса ($K_s^A \cdot K_M^B$). При фиксированной концентрации одного из субстратов, например В, зависимость скорости реакции от концентрации А представляется равнобочной гиперболой михаэлисова типа.

$$v = \frac{\frac{V_b}{K_M^B + b}}{1 + \frac{1}{a} \cdot \frac{K_s^A K_M^B + K_M^A b}{K_M^B + b}} \quad (4.87)$$

В этом уравнении кажущаяся K_M для А зависит от концентрации В.

При очень больших концентрациях В или А выражение упрощается и принимает вид

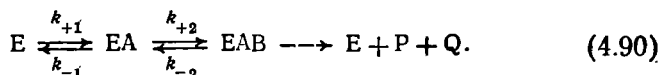
$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a}} \quad (4.88)$$

или

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^B}{b}} \quad (4.89)$$

Эти уравнения, очевидно, идентичны уравнению Михаэлиса — Ментен для односубстратных реакций, и, следовательно, K_M^A можно определить как концентрацию А, при которой в условиях насыщающей концентрации В наблюдается скорость, равная половине максимальной; аналогичным образом можно определить и K_M^B . Другими словами, эти константы являются истинными константами Михаэлиса.

Можно показать, что константа $K_s^A \cdot K_M^B$ является произведением константы Михаэлиса и кажущейся константы диссоциации комплекса фермента с субстратом, который первым связывается с ферментом. Рассмотрим, например, реакцию с упорядоченным присоединением субстратов типа



Скорость стадии, характеризующейся константой k_{+2} , зависит от концентрации В, т. е. скорость реакции $EA \rightarrow EAB$ определяется величиной $k_{+2}b$. При $b \rightarrow 0$ взаимодействие фермента с А будет стремиться к равновесному, следовательно, в этих условиях K_M , каж для А будет стремиться к константе диссоциации комплекса ЕА (K_s^A). Видно также, что при $b \rightarrow 0$ уравнение (4.87)

упрощается до

$$v = \frac{\frac{V_b}{K_M^B}}{1 + \frac{K_s^A}{a}}, \quad (4.91)$$

и, следовательно, кажущаяся константа Михаэлиса для А будет стремиться к постоянной величине K_s^A , входящей в произведение $K_s^A \cdot K_M^B$. Анализ показывает, что подобные соотношения справедливы и для неупорядоченного механизма в равновесных условиях.

Индивидуальные константы для систем, подчиняющихся уравнению (4.86), могут быть получены с помощью простой графической процедуры [1378]. Используя выражение, обратное (4.86), и проводя некоторые преобразования, получаем

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M^A + \frac{K_s^A K_M^B}{b}}{V} \cdot \frac{1}{a} + \frac{1 + \frac{K_M^B}{b}}{V}. \quad (4.92)$$

Графики зависимости $1/v$ от $1/a$ при ряде фиксированных концентраций В (их иногда называют первичными графиками) образуют серию прямых, которые пересекаются либо выше оси $-1/a$, либо на ней, либо ниже, как показано на рис. 4.23. Алгебраические выражения для наклонов этих прямых и длин отрезков, отсекаемых ими на оси, приведены в табл. 4.1; из этих данных видно, что прямые, построенные в координатах $\{1/a; 1/v\}$, пересекают ось $1/v$ в точках $(1 + K_M^B/b)/V$. Эти величины обратны максимальным скоростям $(1/V_b)$ при фиксированных концентрациях второго субстрата. Таким образом можно получить ряд величин $1/V_b$, и отложив их в зависимости от $1/b$ (вторичный график), построить прямую, соответствующую обратному уравнению (4.89), которая отсекает на горизонтальной оси отрезок $-1/K_M^B$. С помощью аналогичной процедуры, строя графики зависимости $1/v$ от $1/b$ при разных a и получив вторичные графики для зависимости отсекаемых отрезков от $1/a$, находят $-1/K_M^A$.

Наклон первичного графика $1/v - 1/a$ равен $(K_M^A + K_s^A K_M^B/b)/V$; вторичные графики зависимости этих наклонов, полученных при ряде концентраций В, от $1/b$ являются прямыми с наклоном $K_s^A K_M^B/V$. В результате можно найти K_s^A .

Фриден [1417] показал, что для систем, подчиняющихся уравнению (4.86), первичные графики пересекаются в точке, которая соответствует концентрации $K_M^B/K_s^A K_s^B$, если по оси абсцисс отложена величина $1/a$, и $K_M^A/K_s^A K_M^B$, если по ней отложена величина $1/b$; точка пересечения может лежать выше оси абсцисс, на ней или ниже этой оси. Для субстрата А, который

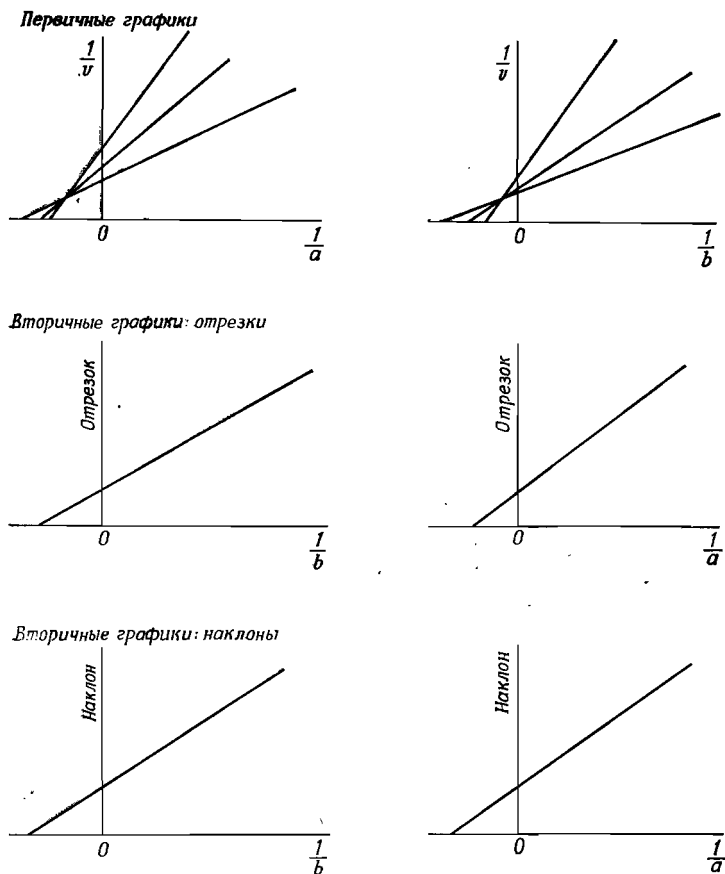


Рис. 4.23. Первичные и вторичные графики для двухсубстратной системы.

первым взаимодействует с ферментом (имеется в виду механизм с упорядоченным присоединением субстратов), т. е. для субстрата, который связывается со свободным ферментом, точка пересечения соответствует $1/K_s A$. Это позволяет определить истинную величину сродства фермента к А, однако при этом необходимо знать, какой из двух субстратов первым взаимодействует с ферментом; другими словами, нужно иметь независимый метод обнаружения взаимодействия одного из субстратов со свободным ферментом. На рис. 4.24 представлены данные, полученные для трех дегидрогеназ, о которых известно, что они связываются с NADH в отсутствие других субстратов. Величины K_s для NADH, полученные из этих графиков, достаточно хорошо согласуются со значениями констант диссоциации, определенными физическими методами.

Таблица 4.1

Графики двойных обратных величин для двухсубстратных систем, описываемых уравнением (4.86)

График	Наклон	Отрезок, отсекаемый от оси $1/v$	Отрезок, отсекаемый от оси $1/s$	Точка пересечения
Первичный график: зависимость $1/v$ от $1/a$	$\frac{K_M^A + \frac{K_s^A \cdot K_M^B}{b}}{V}$	$1 + \frac{K_M^B}{b} \cdot \frac{1}{V}$	$1 + \frac{K_M^B}{b} \cdot \frac{K_s^A \cdot K_M^B}{K_M^A + \frac{K_s^A \cdot K_M^B}{b}}$	$-\frac{1}{a} = -\frac{1}{K_s^A}$
Вторичные графики: зависимость длины отрезка, отсекаемого от оси $1/v$, от $1/b$	$\frac{K_M^B}{V}$	$\frac{1}{V}$	$-\frac{1}{K_M^B}$	—
зависимость наклона от $1/b$	$\frac{K_s^A K_M^B}{V}$	$\frac{K_M^A}{V}$	$-\frac{K_M^A}{K_s^A K_M^B}$	—
Первичный график: зависимость $1/v$ от $1/b$	$\frac{K_M^B + \frac{K_s^A K_M^B}{a}}{V}$	$1 + \frac{K_M^A}{a} \cdot \frac{1}{V}$	$1 + \frac{K_M^A}{a} \cdot \frac{K_s^A K_M^B}{K_M^B + \frac{K_s^A K_M^B}{a}}$	$-\frac{1}{b} = -\frac{K_M^A}{K_s^A K_M^B}$
Вторичные графики: зависимость длины отрезка, отсекаемого от оси $1/v$, от $1/a$	$\frac{K_M^A}{V}$	$\frac{1}{V}$	$-\frac{1}{K_M^A}$	—
зависимость наклона от $1/a$	$\frac{K_s^A K_M^B}{V}$	$\frac{K_M^B}{V}$	$-\frac{1}{K_s^A}$	—

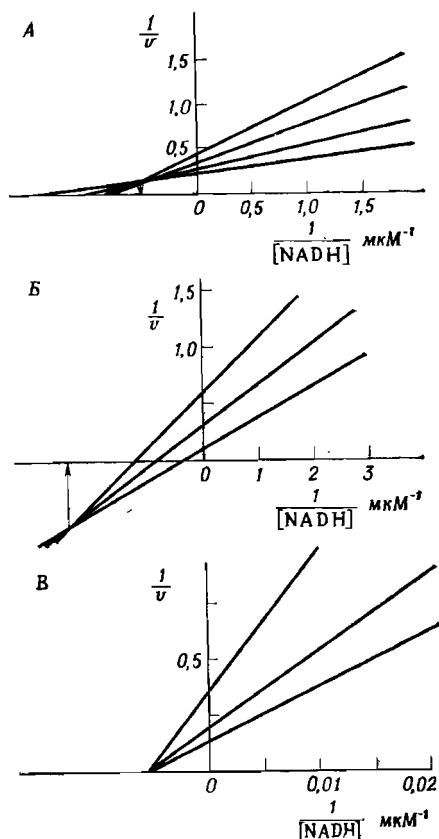
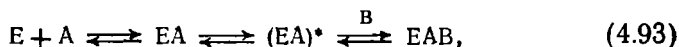


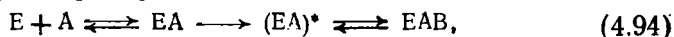
Рис. 4.24. Метод Фридена для определения сродства фермента к первому присоединяющемуся субстрату [1417]. А. Лактатдегидрогеназа. Б. Алкогольдегидрогеназа печени. В. Дрожжевая алкогольдегидрогеназа.

Следует отметить, что получаемая величина K_s не обязательно является истинной константой связывания для реакции $E + A \rightleftharpoons EA$, поскольку в том случае, когда комплекс EA подвергается какой-либо трансформации до связывания В, например



все стадии, происходящие до связывания В, вносят вклад в кажущуюся константу диссоциации.

Константы в уравнении общего вида (4.86) зависят от природы доминирующего пути реакции. Так, если после взаимодействия с А может происходить необратимое превращение (до связывания В), например



то величина кажущейся константы диссоциации для А будет равна нулю. Следовательно, член $K_s^A K_M^B / ab$ будет отсутствовать

и общее уравнение упростится до

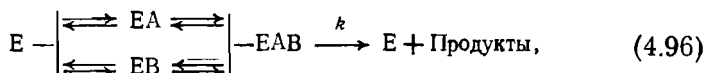
$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b}}. \quad (4.95)$$

Это упрощение важно для определенных кинетических механизмов.

Рассмотрим возможные механизмы двухсубстратных реакций.

1а. Неупорядоченный равновесный механизм

Этот механизм может быть представлен следующей схемой:



где стадия, характеризующаяся константой k , является лимитирующей. Такие системы были первоначально проанализированы Холдейном [1749]; см. также [4372].

Для четырех равновесных реакций



получаем четыре уравнения:

$$(e - x_a - x_b - x) a = K_s^A x_a, \quad (4.101)$$

$$(e - x_a - x_b - x) b = K_s^B x_b, \quad (4.102)$$

$$x_a b = K_M^B x, \quad (4.103)$$

$$x_b a = K_M^A x, \quad (4.104)$$

где a , b , x , x_a , x_b — концентрации соответственно А, В, ЕАВ, ЕА и ЕВ; K_s^A , K_s^B , K_M^A , K_M^B — константы диссоциации четырех равновесных реакций. Скорость суммарной реакции пропорциональна концентрации ЕАВ. Таким образом,

$$v = kx. \quad (4.105)$$

Исключая x из приведенных выше уравнений, получаем

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab}}. \quad (4.106)$$

Это уравнение, идентичное (4.86), содержит только три из четырех констант равновесия. Четвертая оказывается «излишней», так как она связана с остальными тремя константами соотношением

$$K_s^A K_M^B = K_M^A K_s^B. \quad (4.107)$$

Исходя из соображений, приведенных на с. 96—97, можно показать, что член ke равен максимальной скорости. При выводе уравнения (4.106) не было сделано допущения о влиянии, которое может оказывать взаимодействие фермента с одним из субстратов на взаимодействие с другим. Кинетические константы, входящие в это уравнение, могут быть получены таким же путем, как это было сделано выше на с. 129—131.

Если каждый субстрат взаимодействует только со своим собственным участком связывания и не оказывает влияния на родство фермента к другому субстрату, то $K_s^A = K_M^A$ и $K_s^B = K_M^B$; уравнение (4.106) при этом упрощается до

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s^A}{a} + \frac{K_s^B}{b} + \frac{K_s^A K_s^B}{ab}} = \frac{ke}{\left(1 + \frac{K_s^A}{a}\right) \left(1 + \frac{K_s^B}{b}\right)}. \quad (4.108)$$

В этом случае первичные графики, полученные для одного из субстратов (при ряде фиксированных концентраций другого), образуют семейство прямых, точка пересечения которых лежит на оси абсцисс $1/s$. Таким образом, обе константы Михаэлиса можно определить просто путем изменения концентрации одного из субстратов при постоянной концентрации другого.

Многие ферменты переноса, например креатинкиназа (КФ 2.7.3.2) [2620, 3262] и карнитин-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.7) [749], функционируют по неупорядоченному равновесному механизму.

16. Неупорядоченный стационарный механизм

Уравнение (4.82), выведенное для рассматриваемой системы в предположении стационарности, значительно сложнее, чем уравнение (4.86). Оно сходно с уравнением для стационарной системы с неконкурентным ингибированием и ингибированием смешанного типа (гл. 8).

Уравнение (4.82) содержит члены, зависящие от концентрации обоих субстратов и продукта. v — скорость, считающаяся положительной для реакции в прямом направлении (ведущей к образованию Z ; см. рис. 4.20). Для начальных скоростей пря-

мой или обратной реакции это выражение можно упростить путем подстановки либо $z=0$, либо $a=b=0$. В первом случае

$$v_f = \frac{(c_1ab + c_2a^2b + c_3ab^2)e}{c_7 + c_8a + c_9b + c_{10}ab + c_{11}a^2 + c_{12}b^2 + c_{13}a^2b + c_{14}ab^2}, \quad (4.109)$$

а во втором

$$v_b = \frac{c_4ze}{c_7 + c_{15}z}. \quad (4.110)$$

Последнее уравнение имеет такой же вид, как и уравнение Бриггса — Холдейна (4.16), но выражения для V и K_M более сложные, а именно:

$$V = \frac{c_4e}{c_{15}} = \frac{(k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5})e}{k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}}, \quad (4.111)$$

$$K_M = \frac{c_7}{c_{15}} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_{-5}}{k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}}. \quad (4.112)$$

С другой стороны, уравнение (4.109) для скорости прямой реакции не может быть сведено к виду (4.16) (для любого из субстратов), так как даже если a или b является постоянным, в уравнении остаются члены, содержащие b^2 или a^2 .

Если b постоянно, получаем

$$v_f = \frac{(ia^2 + ja)e}{k + la^2 + ma}, \quad (4.113)$$

где

$$\begin{aligned} i &= c_2b, \\ j &= c_1b + c_3b^2, \\ k &= c_7 + c_9b + c_{12}b^2, \\ l &= c_{11} + c_{13}b, \\ m &= c_8 + c_{10}b + c_{14}b^2. \end{aligned}$$

Эта система названа Уонгом и Хейнсом системой второй степени относительно a , поскольку субстрат A взаимодействует с двумя разными формами фермента. В таком случае система не может анализироваться с использованием «константы Михаэлиса» и график обратных величин не является линейным. Такое anomальное поведение может быть обусловлено рядом причин. Первая, как в данном случае, — это наличие параллельных путей превращения субстрата, связанное с образованием фермент-субстратного комплекса в неупорядоченном механизме двумя путями; например, в данном случае субстрат A связывается как с E , так и с EB . Если один из этих путей исключается, например если $k_{+4}=0$, коэффициенты при членах, содержащих a^2 , становятся равными нулю и получается уравнение Михаэлиса обыч-

ного вида. Вторая причина состоит в том, что фермент катализирует реакцию, в которой участвуют две идентичные молекулы субстрата, причем обе они входят в состав тройного комплекса (см. с. 171). И наконец, еще одна возможная причина отклонения от линейности — кооперативные свойства фермента (гл. 8).

Степень отклонения графика двойных обратных величин от линейности для неупорядоченных стационарных систем зависит от соотношения между константами скоростей и концентрациями обоих субстратов. Петтерсон [3666, 3667] провел детальное теоретическое исследование неупорядоченных стационарных систем и показал, что в области относительно низких концентраций субстрата график Лайнуивера — Бэрка линейен. Уравнения, описывающие эти линейные участки, подобны тем, которые были приведены в предыдущем разделе для равновесной системы; в рассматриваемых условиях стационарную систему можно анализировать таким же образом, как равновесную. Гулбинский и Клееланд [1707] показали, что фермент галактокиназа (КФ 2.7.1.6) из *E. coli* функционирует по неупорядоченному стационарному механизму, при этом, однако, график двойных обратных величин и характер ингибирования продуктом такие же, как если бы имели место равновесные условия. Используя для анализа неупорядоченного двухсубстратного механизма ЭВМ, эти исследователи показали также, что иногда графики двойных обратных величин (для начальных скоростей) не сильно отклоняются от линейности, даже если равновесное приближение неприменимо.

2а. Упорядоченные системы, в которых образуется тройной комплекс

Последовательность стадий в этом случае можно представить в виде



Анализ этой системы в предположении стационарности приводит к уравнению, идентичному (4.86), однако в данном случае K^A_M и K^B_M являются не константами равновесия, а сложными величинами, зависящими от нескольких констант скоростей. Было показано, что по упорядоченному механизму функционирует ряд ферментов, в том числе несколько дегидрогеназ; при этом коферменты связываются с ферментом раньше, чем субстраты [3835, 4650].

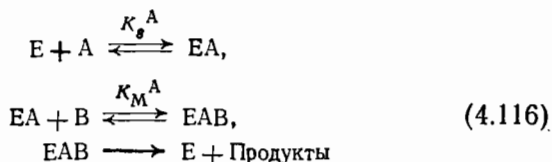
Связывание одного или обоих субстратов в ходе реакции (4.114) может быть равновесным процессом. Если это условие будет выполняться, например, в отношении субстрата А, т. е. скорость стадии $EA + B \rightarrow EAB$ будет меньше, чем скорость рас-

пада ЕА на свободный фермент и А, то комплекс ЕА будет находиться в равновесии со свободными Е и А. В этом случае в отличие от неупорядоченного механизма в равновесных условиях связывание субстрата происходит на медленной стадии и скорость этой стадии, следовательно, зависит от концентрации В. Таким образом, может существовать система, в которой связывание А при низкой концентрации В происходит в равновесных условиях, а при более высоких концентрациях эта стадия становится стационарной. Теоретически при бесконечном увеличении b система переходит в стационарные условия, однако практически в рабочем интервале концентраций субстрата нередко оказывается возможным анализировать упорядоченные системы в рамках равновесного приближения.

В этих условиях кажущаяся константа K_M^A может становиться пренебрежимо малой, поскольку при насыщающих концентрациях В равновесие $E + A \rightleftharpoons EA$ полностью сместится в сторону образования ЕА при условии, что содержание А не меньше, чем фермента. Величина K_M^A будет стремиться к $e/2$ (если использовать при расчетах суммарную концентрацию А, а не концентрацию свободной формы этого субстрата); если концентрация фермента очень мала, как это обычно имеет место, член K_M^A/a будет пренебрежимо малым и уравнение (4.86) упростится до

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab}}. \quad (4.115)$$

В предположении о равновесном связывании обоих субстратов аналогичные рассуждения приводят для последовательности реакций



к уравнению, идентичному (4.115) (см. с. 134—135).

Обратную форму уравнения (4.115) можно преобразовать к виду

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s^A K_M^B}{b} \frac{1}{a} \frac{1}{V} + \left(1 + \frac{K_M^B}{b}\right) \frac{1}{V}. \quad (4.117)$$

Следовательно, графики зависимости $1/v$ от $1/a$ при различных концентрациях В образуют семейство пересекающихся прямых, подобно тому, как это было для других рассмотренных выше

систем, однако в данном случае точка пересечения будет всегда лежать выше оси $1/a$. Наклоны прямых равны $K_s^A K_M^B / Vb$. Таким образом, вторичный график зависимости наклонов этих прямых от $1/b$ будет прямой с наклоном $K_s^A K_M^B / V$, проходящей через начало координат (длина отсекаемого отрезка равна нулю).

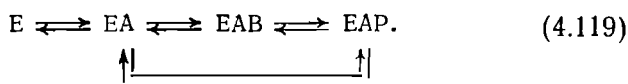
Преобразуя уравнение (4.115) для построения первичных графиков зависимости $1/v$ от $1/b$, получаем

$$\frac{1}{v} = \left(K_M^B + \frac{K_s^A K_M^B}{a} \right) \frac{1}{V} \frac{1}{b} + \frac{1}{V}. \quad (4.118)$$

В данном случае первичные графики при различных концентрациях A образуют семейство прямых, которые пересекаются в точке, лежащей на оси $1/v$. Эти результаты не следует рассматривать как свидетельство в пользу того, что при насыщающей концентрации B реакция может достичь максимальной скорости в отсутствие A ; они показывают только, что необходимая для этого концентрация A мала.

Первичные графики рассмотренного типа и вторичный график, проходящий через начало координат, характерны для упорядоченного механизма, в котором стадия связывания первого субстрата является равновесной; при этом можно установить, какой субстрат связывается первым.

Подобные соотношения часто встречаются в системах, в которых компонент, связывающийся первым, является не субстратом, а активатором, причем активатор все время остается связанным с ферментом:

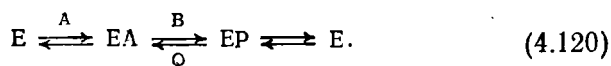


Анализ такой системы показывает, что активатор A может связываться равновесным образом, при этом в отличие от упорядоченных равновесных систем равновесие сохраняется при b , стремящемся к бесконечности. Иногда подобным образом функционируют металлы-активаторы [пируваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1), лактозосинтаза (КФ 2.4.1.22)] [3259].

26. Упорядоченные системы с пренебрежимо малыми стационарными концентрациями тройных комплексов (механизмы Теорелла — Чанса)

Механизмы такого типа были впервые рассмотрены Теореллом и Чансом [4709] для объяснения кинетики действия печеночной алкогольдегидрогеназы, поэтому их часто называют

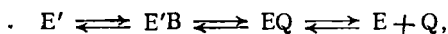
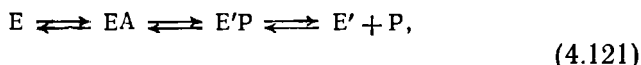
механизмами Теорелла — Чанса. Процесс может быть представлен в виде следующей схемы:



Предполагается, что скорость образования тройного комплекса ЕАВ столь мала, а скорость распада столь велика, что его концентрация для кинетики процесса не существенна. Анализ такой системы в предположении стационарности снова приводит к уравнению, идентичному уравнению (4.86). К числу ферментов, функционирующих по механизму Теорелла — Чанса, относятся лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) [5302] и альдегид-дегидрогеназа (КФ 1.2.1.3) [1172] из мышц кролика.

2в. Упорядоченные системы без образования тройных комплексов

В таких системах реакция протекает путем образования ряда двойных комплексов, причем в одном из промежуточных состояний фермент связан не с субстратом, а с переносимой группой, как показано на рис. 4.22, верхняя цепь реакций. Система может быть представлена как две реакционные последовательности



связанные между собой через E' (фермент, ковалентно связанный с группой, удаляемой от А в ходе первой стадии и присоединяющейся к В на второй).

Если рассматривать начальные скорости, когда концентрации продуктов равны нулю, то стадия $E'P \rightarrow E' + P$ является необратимой, и система, следовательно, сводится к случаю, представленному на с. 134, когда кажущаяся константа диссоциации для связывания А с ферментом (K_s^A) равна нулю. Поэтому общее уравнение (4.86) упрощается до (4.95).

Уравнение, обратное (4.95), имеет вид

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M^A}{a} \frac{1}{V} + \left(1 + \frac{K_M^B}{b}\right) \frac{1}{V}, \quad (4.122)$$

и, следовательно, графики двойных обратных величин для каждого из субстратов (при ряде фиксированных концентраций другого субстрата) образуют семейство параллельных прямых. Константы можно определить с помощью вторичных графиков зависимости длин отсекаемых от оси $1/v$ отрезков от $1/a$ или $1/b$, как показано в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Графики двойных обратных величин для систем, подчиняющихся уравнению 4.95

График	Наклон	Отрезок, отсе- каемый от оси $1/v$	Отрезок, отсе- каемый от оси $1/s$
Первичный график: зависимость $1/v$ от $1/a$	$\frac{K_M^A}{V}$	$1 + \frac{K_M^B}{b}$ $\frac{1}{V}$	$1 + \frac{K_M^B}{b}$ $-\frac{K_M^A}{K_M^A}$
Вторичный график: зависимость длины отрез- ка, отсекаемого от оси $1/v$, от $1/b$	$\frac{K_M^B}{V}$	$\frac{1}{V}$	$-\frac{1}{K_M^B}$
Первичный график: зависимость $1/v$ от $1/b$	$\frac{K_M^B}{V}$	$1 + \frac{K_M^A}{a}$ $\frac{1}{V}$	$1 + \frac{K_M^A}{a}$ $-\frac{K_M^B}{K_M^B}$
Вторичный график: зависимость длины отрез- ка, отсекаемого от оси $1/v$, от $1/a$	$\frac{K_M^A}{V}$	$\frac{1}{V}$	$-\frac{1}{K_M^A}$

Слейтер [4319] отметил, что для систем, подчиняющихся уравнению (4.95), график зависимости найденных величин K_M от V является для каждого из субстратов прямой, проходящей через начало координат.

Если реакция исследуется при ряде фиксированных концентраций продукта, кажущаяся константа диссоциации для взаимодействия фермента с А не будет равна нулю, система будет описываться уравнением (4.86), и графики двойных обратных величин для каждого из субстратов образуют семейства пересекающихся прямых.

Системы, представленные схемой (4.121), характерны для ряда ферментов, в том числе для аминоксидазы (флавиносодержащей) (КФ 1.4.3.4), у которой свободная модифицированная форма фермента содержит связанный восстановленный флаavin [2061, 2062, 4748], и для гидроксиметилглутарил-СоА — синтазы из дрожжей (КФ 4.1.3.5) [3151]. Эти системы называют системами с двухстадийным переносом, механизмом двойного замещения или пинг-понг-механизмом.

Установление кинетического механизма

а. Использование первичных графиков

Большинству рассмотренных двухсубстратных систем, для которых графики двойных обратных величин линейны, отвечают близкие по виду семейства первичных графиков (при ряде фиксированных концентраций одного из субстратов); исключения составляют реакции двухстадийного переноса и упорядоченные равновесные системы, у которых первичные графики образуют семейство параллельных прямых. Если, однако, первичные графики параллельны, это еще не означает, что фермент функционирует по механизму двухстадийного переноса. Иногда истинный механизм двухстадийного переноса трудно отличить экспериментально от случая, для которого $K_s^A K_M^B / ab$ [см. (4.86)] очень мало. Так, хотя первичные графики для ферментов 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) [2083] и оксидазы D-аминокислот [2575] образуют семейство параллельных прямых, по данным, полученным другими методами, эти ферменты функционируют не по механизму двухстадийного переноса. Один из путей для решения вопроса о том, какой из механизмов имеет место — истинный двухстадийный перенос или же механизм, отвечающий уравнению (4.86), — состоит во введении в систему, конкурентного ингибитора субстрата А. Если первичные графики двойных обратных величин параллельны вследствие того, что K_s^A очень мало, то кажущееся значение этой константы может увеличиться при проведении кинетических определений в условиях фиксированной концентрации конкурентного ингибитора. Если в этих условиях прямые пересекаются, это означает, что реакция протекает не по механизму двухстадийного переноса. В этом случае для установления механизма нельзя, однако, использовать продукт реакции, поскольку, как отмечалось выше, в случае двухстадийного переноса в присутствии продукта графики обратных величин пересекаются.

Другой путь выявления механизма двухстадийного переноса состоит в проведении измерений при постоянном отношении концентраций субстратов, так что $b = za$. В этом случае для механизма двухстадийного переноса уравнение, обратное (4.122), имеет вид

$$\frac{1}{v} = (K_M^A + K_M^B/z) \frac{1}{a} \frac{1}{V} + \frac{1}{V} \quad (4.123)$$

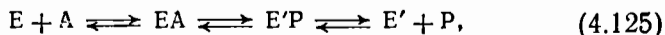
и, следовательно, график зависимости величины, обратной начальной скорости, от $1/a$ будет линейным. Для систем же, опи-

сыаемых уравнением (4.86), выражение для зависимости обратных величин имеет вид

$$\frac{1}{v} = \left(K_M^A + \frac{K_M^B}{z} + \frac{K_s^A K_M^B}{za} \right) \frac{1}{a} \frac{1}{V} + \frac{1}{V}; \quad (4.124)$$

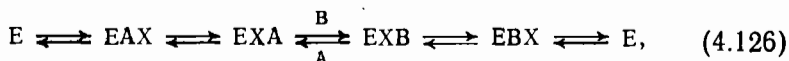
ему отвечает график, отклоняющийся от прямой вверх (парабола).

Для реакции, протекающей по механизму двухстадийного переноса, можно выделить два этапа; так, в случае схемы (4.121) при наличии первого субстрата (А), но в отсутствие второго (В) осуществляется реакция

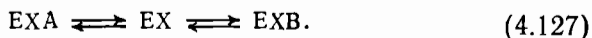


при этом на один активный центр фермента освобождается максимум одна молекула А; обнаружение такой реакции является убедительным свидетельством в пользу функционирования фермента по рассматриваемому механизму. Если реакция (4.125) идет до конца, то по количеству образовавшегося продукта можно рассчитать молекулярную массу, приходящуюся на активный центр фермента, что и было сделано в случае аминоксидазы (флавинсодержащей) (КФ 1.4.3.4) [4748].

Однако данные рассмотренного типа сами по себе еще не доказывают, что имеет место механизм двухстадийного переноса, так как в случае другого механизма может происходить «утечка» интермедиата в отсутствие второго субстрата. Например, в реакции переноса, протекающей по механизму Теорелла — Чанса



освобождение А может происходить до связывания В, т. е. возможен второстепенный путь



Если, однако, освобождение А происходит значительно медленнее, чем превращение



то при всех обычных концентрациях В концентрация EX будет пренебрежимо малой. В таком случае можно обнаружить образование А в отсутствие В, даже если процесс двухстадийного переноса не протекает в сколько-нибудь значительной степени; именно такая ситуация обсуждалась в связи с механизмом действия 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) [2083]. Следовательно, для того, чтобы использовать в качестве доказательства на-

Кинетические константы двухсубстратных систем, выраженные через константы скорости.

Все приведенные ниже системы подчиняются общему уравнению (4.86)¹⁾

Кинетический механизм	K_M^A	K_S^A	K_M^B	V
Неупорядоченный механизм, равновесные условия [схема (4.96) и рис. 4.20]	$\frac{k_{-4}}{k_{+4}}$	$\frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$\frac{k_{-3}}{k_{+3}}$	ke
Упорядоченный механизм, равновесные условия [схема (4.116)]	0	$\frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$\frac{k_{-2}}{k_{+2}}$	$k_{+3}e$
Упорядоченный механизм, стационарные условия, образование двух тройных комплексов [схема (4.114)]	$\frac{k_{-6}k_{+4}k_{+3}}{k_{+1}T}$	$\frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$\frac{k_{+5}(k_{-2}k_{-3} + k_{-2}k_{+4} + k_{+3}k_{+4})}{k_{+2}T}$	$\frac{k_{+5}k_{+3}e}{T}$
Упорядоченный механизм, стационарные условия, образование одного тройного комплекса [схема (4.116)]	$\frac{k_{+3}k_{+4}}{k_{+1}(k_{+4} + k_{+3})}$	$\frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$\frac{k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})}{k_{+2}(k_{+4} + k_{+3})}$	$\frac{k_{+4}k_{+3}e}{k_{+3} + k_{+4}}$
Упорядоченный механизм, стационарные условия; А действует как активатор, оставаясь связанным с ферментом [схема (4.119)]	0	$\frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$\frac{k_{-2}k_{-3} + k_{-2}k_{+4} + k_{+3}k_{+4}}{k_{+2}(k_{-3} + k_{+4} + k_{+3})}$	$\frac{k_{+4}k_{+3}e}{k_{-3} + k_{+4} + k_{+3}}$
Механизм Теорелла — Чанса [схема (4.120)]	$\frac{k_{+3}}{k_{+1}}$	$\frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$\frac{k_{+3}}{k_{+2}}$	$k_{+3}e$
Двухстадийный перенос [схема (4.121)]	$\frac{k_{+5}k_{+6}(k_{+2}k_{+3} + k_{-1}k_{+3} + k_{-1}k_{-2})}{k_{+1}U}$	0	$\frac{k_{+2}k_{+3}(k_{-4}k_{-5} + k_{+5}k_{+6} + k_{-4}k_{+6})}{k_{+4}U}$	$\frac{k_{+2}k_{+3}k_{+5}k_{+6}}{U}$

$$T = k_{+5}k_{-3} + k_{+5}k_{+4} + k_{+5}k_{+3} + k_{+4}k_{+3}.$$

$$U = k_{+3}k_{+5}k_{+4} + k_{+5}k_{+3}k_{-2} + k_{+5}k_{+6} + k_{+2}k_{+3}k_{-5} + k_{+2}k_{+3}k_{+6} + k_{+5}k_{+3}k_{+6}$$

¹⁾ Во всех линейных последовательностях константы скорости пронумерованы по очередности стадий; положительные номера относятся к прямому направлению реакции, а отрицательные — к обратному [см., например, уравнения (4.33) и (4.90)].

личия двухстадийного переноса тот факт, что можно обнаружить образование продукта в отсутствие одного из субстратов, необходимо в идеальном варианте показать, что освобождение продукта происходит достаточно быстро, чтобы оно могло быть обязательной стадией полной реакции.

6. Исследование ингибирования продуктом

Нередко удается сделать выбор между возможными кинетическими механизмами двухсубстратных реакций путем определения типа ингибирования, вызываемого продуктом реакции (см., например, [803, 1452, 4750]). Различные типы обратимого ингибирования и соответствующие механизмы обсуждаются подробно в гл. 8. Здесь же достаточно отметить, что они классифицируются по характеру графиков двойных обратных величин (в присутствии ингибиторов), а не по какому-либо специфическому механизму, лежащему в основе эффекта. Так, графики зависимости $1/v$ от $1/s$ при ряде фиксированных концентраций ингибитора характеризуются определенными признаками, перечисленными в табл. 4.4.

Для того чтобы понять, как с помощью данных о характере ингибирования продуктом можно установить кинетический механизм, необходимо рассмотреть влияние изменения отдельных кинетических констант, входящих в уравнение (4.86), на вид графиков двойных обратных величин. Рассмотрим два возможных случая:

а) концентрация фиксированного субстрата является величиной того же порядка, что и K_m для этого субстрата (ненасыщающая концентрация); б) эта концентрация столь высока, что соответствующие члены уравнения становятся несущественными (например, в случае фиксированного субстрата В членами

Таблица 4.4

Особенности графиков зависимости двойных обратных величин при наличии ингибирования различного типа

Ингибирование	Особенности графиков зависимости двойных обратных величин при нескольких концентрациях ингибитора
Конкурентное	Прямые пересекаются в точке, лежащей на оси $1/v$
Неконкурентное	Прямые пересекаются в точке, лежащей на оси $-1/s$
Бесконкурентное	Прямые параллельны
Смешанное	Прямые пересекаются либо выше, либо ниже оси $-1/s$

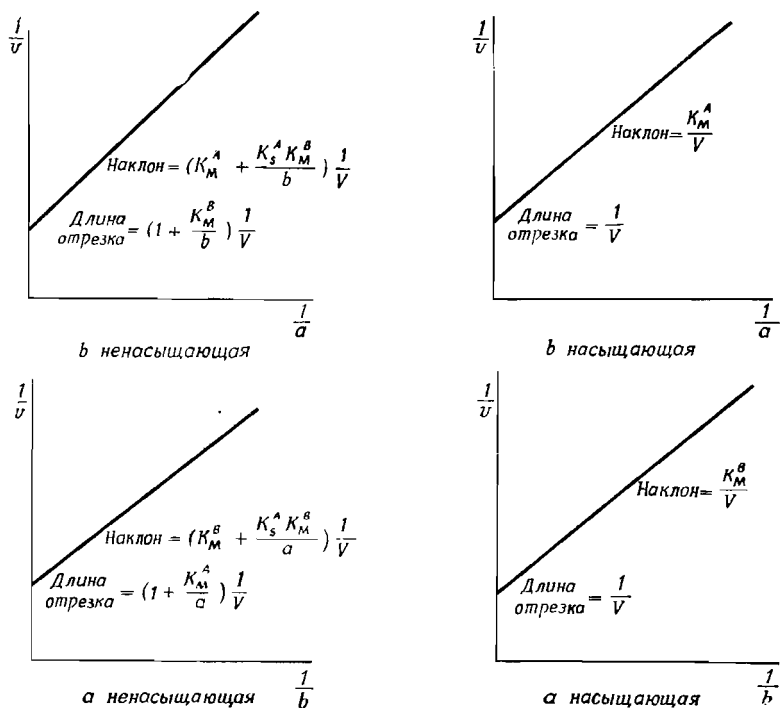


Рис. 4.25. Графики зависимости двойных обратных величин, соответствующие уравнению (4.86), при насыщающих и ненасыщающих концентрациях фиксированного субстрата.

$K_s^A K_M^B / ab$ и K_M^B / b можно пренебречь); в этих условиях концентрация субстрата В считается насыщающей.

Вид уравнения двойных обратных величин для этих двух частных случаев обсуждался на с. 129 [уравнения (4.87) — (4.89)], а соответствующие графики приведены на рис. 4.25. Тип ингибирования, вызываемого продуктом, можно предсказать, рассмотрев характер изменения констант, входящих в уравнение (4.86). Если влияние ингибитора проявляется в увеличении одной или нескольких констант, которые входят в состав члена, определяющего наклон прямой (рис. 4.25), а константы, от которых зависит длина отрезка, отсекаемого от оси $1/v$, при этом не изменяются, то имеет место конкурентное ингибирование. В случае когда ингибитор «изменяет» оба типа констант, ингибирование является смешанным или неконкурентным. Наконец, если в присутствии ингибитора изменяются константы, определяющие длину отрезка, который отсекается от оси $1/v$, и остаются неизменными константы, от которых зависит наклон,

наблюдается бесконкурентное ингибирование. Эти выводы суммированы в табл. 4.5 с использованием констант, входящих в уравнение (4.86).

В табл. 4.5 рассмотрены не все возможные случаи, а лишь те, которые обычно встречаются при анализе функционирования ферментных систем; другие варианты ингибирования (например, увеличение K_s^A , K_M^A и K_M^B) легко получить из данных рис. 4.25 и уравнения (4.86).

Остановимся теперь на возможных путях влияния ингибитора на кинетические константы (см. табл. 4.5).

а. Если ингибитор связывается с тем же ферментным интермедиатом и в том же участке, что и субстрат А, не препятствуя связыванию субстрата В, то в присутствии ингибитора увеличивается концентрация А, необходимая для полунасыщения фермента, и, следовательно, обычно увеличиваются K_M^A и K_s^A (см. также гл. 8). Это соответствует варианту ингибирования (а) в табл. 4.5.

б. Этот случай будет подробно рассмотрен в разделе о равновесных неупорядоченных системах (с. 150—152).

в. В случае, противоположном (а), когда ингибитор влияет на связывание В, но не на связывание А, член K_M^B увеличивается; это соответствует варианту ингибирования (в) в табл. 4.5.

г. В двух предыдущих случаях ингибирование было обусловлено увеличением константы Михаэлиса, однако оно может быть связано также с уменьшением V . В гл. 8 рассматривается ситуация, когда ингибитор связывается с ферментом после образования фермент-субстратного комплекса (см. с. 493—494); при этом в случае односубстратной реакции в результате уменьшения количества фермент-субстратного комплекса, способного распадаться с образованием продукта, снижается также скорость распада этого комплекса до свободного фермента и свободного субстрата и, следовательно, уменьшается кажущаяся величина K_M . Уравнение, полученное для этого типа ингибирования в гл. 8, имеет вид

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)} = \frac{V}{\left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + \frac{K_M}{s}}. \quad (4.129)$$

В случае двухсубстратных реакций ингибитор, который связывается с тройным (ЕАВ или ЕРQ) комплексом или с двойным комплексом фермент—продукт, будет оказывать такое же действие, т. е. уменьшать V и K_M . Поскольку, однако, K_s^A (кажу-

Таблица 4.5

Действие ингибиторов в системах, подчиняющихся уравнению (4.86)

Действие ингибитора	Ингибирование				
	в отношении А		в отношении В		
	концентрация В ненасыщающая	концентрация В насыщающая	концентрация А ненасыщающая	концентрация А насыщающая	
а) Увеличение K^A_m и K^A_s	Конкурентное	Конкурентное	Смешанное	Отсутствует	Отсутствует
б) Увеличение только K^A_s	»	Отсутствует	Конкурентное	»	»
в) Увеличение только K^B_m	Смешанное	»	»	Конкурентное	Конкурентное
г) Одинаковое уменьшение V , K^A_m и K^B_m (K^A_s не изменяется)	Бесконкурентное	Бесконкурентное	Бесконкурентное	Бесконкурентное	Бесконкурентное
д) Одинаковое уменьшение V , K^A_m и K^B_m ; иногда увеличение K^B_m (см. текст)	Смешанное	»	Смешанное	Смешанное	Смешанное

щаяся константа диссоциации комплекса ЕА) является предельным значением для K_M^A при В, стремящемся к нулю (см. с. 129), эта константа не изменяется в присутствии ингибитора, который связывается с ферментом только после связывания В. Кинетическое уравнение для такого вида ингибирования следующее:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{i}{K_i} + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab}} \quad (4.130)$$

Это уравнение соответствует типу ингибирования (г) в табл. 4.5.

д. В предыдущем случае рассмотрено действие ингибитора, который может связываться с ферментом после присоединения к нему обоих субстратов; если, однако, такой ингибитор является продуктом реакции, можно ожидать, что он будет также частично обращать реакцию. Рассмотрим упорядоченную систему с образованием тройного комплекса:



Продукт Р, как и субстрат А, может связываться со свободным ферментом; поскольку Р образуется из А, то весьма вероятно, что он будет связываться с тем же участком фермента, что и А. Следовательно, можно ожидать, что характер ингибирования, вызываемого Р, будет соответствовать варианту (а) табл. 4.5.

Продукт Q не может связываться со свободным ферментом, он связывается только с комплексом EP, образуя тройной комплекс; можно, следовательно, полагать, что он будет функционировать как бесконкурентный ингибитор [вариант (г)]. Поскольку, однако, Q является продуктом (т. е. субстратом для обратной реакции), есть основания ожидать, что в его присутствии вследствие увеличения концентрации комплекса EPQ будет происходить частичное обращение реакции и вытеснение В из комплекса с ферментом. Это, конечно, приведет к увеличению K_M^B . Кинетическое уравнение будет иметь следующий вид:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{q}{K_i'q} + \frac{K_M^A}{a} + \left(\frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \right) \left(1 + \frac{q}{K_i'} \right)}, \quad (4.132)$$

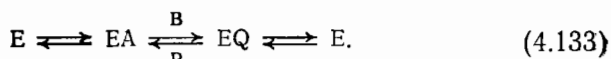
где q — концентрация продукта Q, а K_i' есть величина, отличная от простой константы диссоциации. Этому типу ингибирования соответствует случай (д) в табл. 4.5.

Из таблицы видно, что в том случае, когда ингибитор конкурирует с одним из субстратов (например, А), ингибирование в отношении второго субстрата при насыщающей концентрации

А не наблюдается. Этого следовало ожидать, поскольку конкурентный ингибитор вытесняется из комплекса с ферментом при высокой концентрации субстрата, с которым он конкурирует.

Таким образом, характер ингибирования продуктом в каждом конкретном случае можно предсказать, исходя из анализа кинетического уравнения и пути реакции. Такой подход иллюстрирует табл. 4.6, где суммированы данные о возможных типах ингибирования продуктом в случае двухсубстратных систем в стационарных условиях.

Тип ингибирования, ожидаемый для простого упорядоченного механизма, уже рассматривался выше. В случае механизма Теорелла — Чанса тип ингибирования продуктом Q определяется тем, что продукт может вытеснять субстрат В из комплекса с ферментом. Следует отметить, что продукт Р (т. е. продукт, образующийся из А) может освобождаться раньше, чем Q:

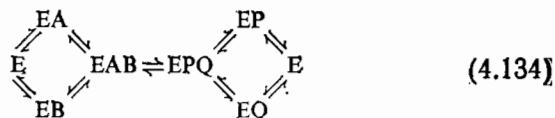


В таком случае тип ингибирования продуктом будет «обратным» тому, который приведен в табл. 4.6.

В случае двухстадийного переноса может иметь место ситуация, когда продукт, образующийся из субстрата А (т. е. Р), связывается с той же формой фермента, что и субстрат В (т. е. E'), в то время как Q связывается с той же формой фермента, что и А. Кроме того, как отмечалось выше (с. 141), в присутствии продукта кажущаяся константа диссоциации комплекса А с ферментом не является пренебрежимо малой, следовательно, эта система подчиняется уравнению (4.86), а не (4.95).

Таким образом, анализ первичных графиков $1/v$ — $1/s$ и данных по ингибированию продуктом позволяет (теоретически) сделать выбор между рассмотренными выше двухсубстратными реакциями в стационарных условиях.

Анализ данных по ингибированию продуктом в случае неупорядоченных систем в равновесных условиях осложняется тем, что имеются несколько возможных путей взаимодействия продуктов с ферментом. В системе



оба продукта (Р и Q) могут связываться со свободным ферментом. Если при связывании с ферментом одного из продуктов (например, Р) происходит вытеснение какого-либо субстрата из комплекса с ферментом, будет наблюдаться увеличение K_s^A и K_s^B . Поскольку, однако, при насыщающих концентрациях как А, так и В ингибитор вытесняется из комплекса с ферментом, кон-

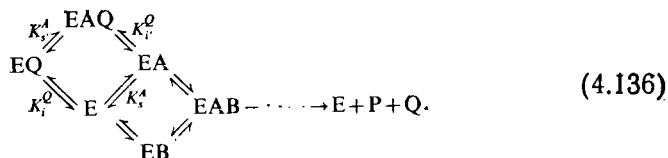
Типы ингибирования для стационарных систем

Кинетический механизм	Тип ингибирования продуктом				
	в отношении А		в отношении В		
	концентрация <i>b</i> ненасыщающая	концентрация <i>b</i> насыщающая	концентрация <i>a</i> ненасыщающая	концентрация <i>a</i> насыщающая	
(1) $E \rightleftharpoons EA \rightleftharpoons EAB \rightleftharpoons ERQ \rightleftharpoons ER \rightleftharpoons E$ Простой упорядоченный механизм	Конкурентное	Конкурентное	Смешанное	Отсутствует	Отсутствует
Q	Смешанное	Бесконкурентное	»	Смешанное	Смешанное
(2) $E \rightleftharpoons EA \rightleftharpoons \overset{B}{Q} ER \rightleftharpoons E$ Механизм Теорелла — Чанса	Конкурентное	Конкурентное	»	Отсутствует	Отсутствует
Q	Смешанное	Отсутствует	Конкурентное	Конкурентное	Конкурентное
(3) $E \rightleftharpoons EA \rightleftharpoons E'P \rightleftharpoons E' + P$ $E' \rightleftharpoons E'B \rightleftharpoons EQ \rightleftharpoons E + Q$ Двухстадийный перенос	»	»	»	»	»
Q	Конкурентное	Конкурентное	Смешанное	Отсутствует	Отсутствует

станты K_M^A и K_M^B , которые определяются при насыщающих концентрациях фиксированного субстрата (с. 129), не изменяются, и, следовательно, кинетическое уравнение, описывающее систему этого типа [уравнение (4.86)], примет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{p}{K_i}\right)}, \quad (4.135)$$

где K_i является константой диссоциации комплекса ЕР. В этом случае наблюдается ингибирование типа (б) из числа перечисленных в табл. 4.5. Представляется маловероятным, чтобы оба продукта могли вести себя подобным образом; например, в трансферазной реакции типа (4.83) продукт ВХ способен вытеснить из комплекса с ферментом как АХ, так и В, в то время как продукт А вытесняет только АХ. Для большинства достаточно детально исследованных систем оказалось, что обычно продукты способны вытеснять только свои «родительские субстраты» из комплекса с ферментом. Тип ингибирования, наблюдаемый в таких случаях, зависит от влияния ингибитора на связывание другого («неродительского») субстрата. Эту ситуацию можно представить схемой



Q является конкурентным ингибитором по отношению к В, поскольку он может вытеснять его из комплекса с ферментом. Однако тип ингибирования в отношении А будет зависеть от относительных значений констант диссоциации. Кинетическое уравнение, описывающее систему (4.136) при равновесном связывании всех субстратов, имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^B}{b} \left(1 + \frac{q}{K_i^Q}\right) + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{q}{K_i^Q}\right)}. \quad (4.137)$$

В простом случае [аналогичном тому, который описывается уравнением (4.108)], когда присутствие Q не оказывает влияния на связывание А ($K_s^A = K_{s'}^A$), $K_i^Q = K_{i'}^Q$, (поскольку $K_s^A K_{i'}^Q = K_{s'}^A K_i^Q$; см. с. 135), и уравнение (4.137) упрощается до

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \left(1 + \frac{K_s^A}{a}\right) \left(1 + \frac{q}{K_i^Q}\right) \frac{K_M^B}{b}}. \quad (4.138)$$

Из этого уравнения следует, что, как и ожидалось, Q является конкурентным ингибитором по отношению к B ; в то же время наклон прямых, построенных в координатах $\{1/a; 1/v\}$, и длины отсекаемых ими отрезков при ненасыщающих концентрациях B увеличиваются в одно и то же число раз. Таким образом, эти прямые пересекаются с осью $-1/s$ в точке $-1/K_s^A$ (см. с. 130—133) и ингибирование является неконкурентным.

Если связывание Q влияет на связывание A ($K_s^A \neq K_s^A$, и $K_i^Q \neq K_i^Q$), применимо уравнение (4.137); наклоны прямых, построенных в указанных выше координатах, и длины отсекаемых отрезков увеличиваются по-разному, и, следовательно, будет наблюдаться смешанное ингибирование. Эта ситуация неотличима от механизма Теорелла—Чанса в случае ингибирования продуктом (см. табл. 4.6). Различить их можно с помощью другого подхода к использованию данных по ингибированию продуктом. Если справедлив механизм Теорелла—Чанса (4.133), величина K_i для Q , действующего как конкурентный ингибитор по отношению к A , является константой диссоциации комплекса EQ и, следовательно, не зависит от концентрации A . Однако в случае неупорядоченной системы (4.136) кажущаяся величина K_i для Q , действующего как конкурентный ингибитор по отношению к B , зависит от констант диссоциации Q из комплексов EQ и EAQ ; если эти константы (K_i^Q и K_i^Q) не равны, кажущаяся константа K_i будет зависеть от концентрации A , стремясь к K_i^Q при очень малых a и к K_i^Q при очень больших a . Этот подход был использован для того, чтобы показать, что креатинкиназа (КФ 2.7.3.2) функционирует по неупорядоченному механизму в равновесных условиях [3262].

Таким образом, результаты опытов по ингибированию продуктом вместе с данными первичных графиков теоретически позволяют сделать выбор между рассмотренными выше видами двухсубстратных реакций. Встречаются, однако, более сложные случаи. Если в рассматриваемых условиях реакция практически необратима или если один из продуктов нестабилен, не всегда удастся провести исследование ингибирования продуктом. Кроме того, продукт может вести себя нетипично, связываясь не только с постулируемым компонентом, но и с другим интермедиатом реакционной последовательности. Феномен связывания с ферментом двух молекул ингибитора обсуждается в гл. 8. Преодолеть эти трудности установления кинетического механизма часто помогают другие методы.

в. «Тупиковое» ингибирование

Чтобы установить, какой из возможных кинетических механизмов имеет место, в ряде случаев можно использовать ингибиторы фермента, которые не являются ни субстратами, ни про-

дуктами рассматриваемой реакции. Такие соединения взаимодействуют с ферментом, образуя абортный или «тупиковый» комплекс (т. е. такой комплекс, который не находится на обычном пути реакции); этот комплекс в отличие от комплексов, образуемых ферментом с субстратами или продуктами, не способен к дальнейшим превращениям. Тип ингибирования, осуществляемого нереакционноспособными аналогами продуктов, во многих случаях подобен тому, который наблюдается под действием самого продукта, за исключением случаев, когда продукт вызывает обращение реакции. Так, для упорядоченной системы (4.114) аналог Q (Q') может быть неконкурентным ингибитором в отношении обоих субстратов, вызывая ингибирование типа (г) из числа рассмотренных в табл. 4.5.

Особый интерес представляет характер ингибирования, наблюдаемого в системах с двухстадийным переносом в присутствии аналогов продуктов; хотя аналоги не способны обратить стадию освобождения продукта, величина K_s^A все же оказывается равной нулю (с. 140). Так, для случая, когда нереакционноспособный аналог Р (Р'') связывается с модифицированной формой фермента (Е') согласно схеме (4.121), уравнение (4.95) принимает вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} \left(1 + \frac{p''}{K_i}\right)}, \quad (4.139)$$

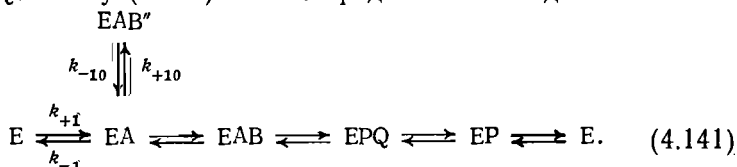
где K_i — константа диссоциации комплекса ЕР''. Для обратных величин имеем

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{K_M^A}{a}\right) \frac{1}{V} + \frac{K_M^B}{V} \left(1 + \frac{p''}{K_i}\right) \frac{1}{b}, \quad (4.140)$$

и, следовательно, Р'' будет конкурентным ингибитором по отношению к В и бесконкурентным по отношению к А (т. е. длины отрезков, отсекаемых прямыми, построенными в обратных координатах, увеличатся при наличии в системе Р'', в то время как наклоны не изменятся). Аналог Q, напротив, окажется, скорее всего, конкурентным ингибитором по отношению к А и бесконкурентным по отношению к В.

Использование аналогов субстратов, которые связываются с ферментом, но не способны к дальнейшим превращениям, позволяет получить некоторые интересные типы ингибирования. Так, можно ожидать, что в упорядоченной системе (4.114) аналог А (А'') будет связываться со свободным ферментом и вызывать ингибирование того же типа, что и Р — продукт, освобождающийся из комплекса с ферментом последним [табл. 4.5, случай (а)]. Аналог же В (В'') будет вызывать ингибирование

совершенно другого типа по сравнению с тем, которое вызывает продукт Q. Схему (4.114) можно представить в виде



Действие В'' проявляется в понижении концентрации комплекса ЕА и, следовательно, в уменьшении скорости превращения ЕА обратно в свободный фермент. При этом кажущаяся константа диссоциации ЕА при $b=0$ (K_s^A) уменьшится в $(1+b''/K_i)$ раз, где K_i — константа диссоциации, равная k_{-10}/k_{+10} (см. гл. 8). Кроме того, если В'' связывается с той же самой формой фермента и с тем же участком, что и В, он будет конкурентным по отношению к этому субстрату, увеличивая K_M^B в $(1+b''/K_i)$ раз; таким образом, ингибирующее действие В'' при очень высоких b становится пренебрежимо малым, так как В вытесняет его из комплекса с ферментом. Поскольку K_M^A является по определению концентрацией А, при которой скорость равна половине максимальной в условиях насыщающей концентрации В, то эта константа не изменяется в присутствии В''. Таким образом, уравнение (4.86) принимает вид

$$\begin{aligned} v &= \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} \left(1 + \frac{b''}{K_i}\right) + \frac{K_s^A K_M^B \left(1 + \frac{b''}{K_i}\right)}{ab \left(1 + \frac{b''}{K_i}\right)}} = \\ &= \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} \left(1 + \frac{b''}{K_i}\right) + \frac{K_s^A K_M^B}{ab}} \end{aligned} \quad (4.142)$$

и, как можно заметить, В'' выступает в роли конкурентного ингибитора по отношению к В и бесконкурентного — по отношению к А, если только концентрация В не является насыщающей; в этом случае, конечно, ингибирования не наблюдается.

Если с ферментом, функционирующим по упорядоченному механизму, связывается аналог первого субстрата (А''), то он может и не препятствовать связыванию второго субстрата; в результате возможно образование тройного туликового комплекса:

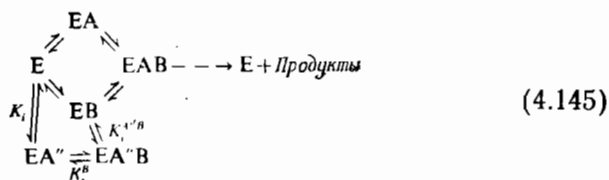


Здесь В будет не только выступать в роли субстрата, но и усиливать ингибирование, вызываемое А". Уравнение скорости для этой системы имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} \left(1 + \frac{ba''}{K_i K_i^B} + \frac{a''}{K_i''} \right) + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{a''}{K_i} \right)}, \quad (4.144)$$

где K_i и K_i^B — константы диссоциации А" из комплекса ЕА" и В из комплекса ЕА"В соответственно, а K_i'' — более сложная константа. Из этого уравнения следует, что график двойных обратных величин в координатах $\{1/b; 1/v\}$ становится нелинейным в присутствии А", в то время как в координатах $\{1/a; 1/v\}$ остается линейным.

То же самое наблюдается и для системы Теорелла — Чанса [уравнение (4.120)], если связывание аналога А" не исключает образования тупикового комплекса ЕА"В. Однако при образовании тупикового комплекса в неупорядоченной равновесной системе



возникает ситуация, совершенно аналогичная той, которая описывается схемой (4.136); соответствующее уравнение имеет такой же вид, как (4.137):

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} \left(1 + \frac{a''}{K_i^{A''B}} \right) + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{a''}{K_i} \right)}, \quad (4.146)$$

график двойных обратных величин является линейным, а влияние ингибитора рассмотрено на с. 152. Таким образом, при образовании тупиковых тройных комплексов нелинейность графика двойных обратных величин позволяет различать неупорядоченные и упорядоченные системы; к последним относятся, в частности, системы Теорелла — Чанса. При этом можно также установить, какой субстрат связывается с ферментом первым.

Как и в случае ингибирования аналогами продуктов, возможен ряд других путей взаимодействия аналогов субстратов с ферментом, приводящих к ингибированию; следовательно, хотя

использование таких аналогов может способствовать подтверждению данного кинетического механизма, получаемые результаты следует трактовать с известной осторожностью.

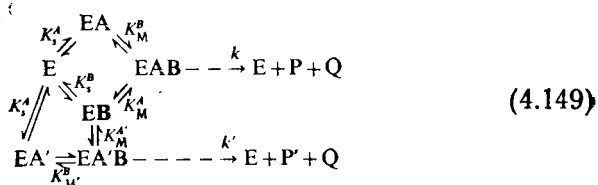
г. Альтернативные субстраты

Как показал Фромм [1448, 4022, 5303], информацию о доминирующем кинетическом пути могут дать опыты по использованию альтернативного субстрата. В этом случае в систему с ферментом, катализирующим двухсубстратную реакцию, вводят два разных первых (или вторых) субстрата наряду со вторым субстратом, так что одновременно могут протекать две реакции:



Эту систему можно исследовать двумя путями.

1. *Определение скорости образования одного из альтернативных продуктов* [4022]. При определении образования P в системе (4.147) альтернативный субстрат A' будет выступать в роли ингибитора этой реакции. В случае неупорядоченного механизма в равновесных условиях возможны следующие пути реакции:



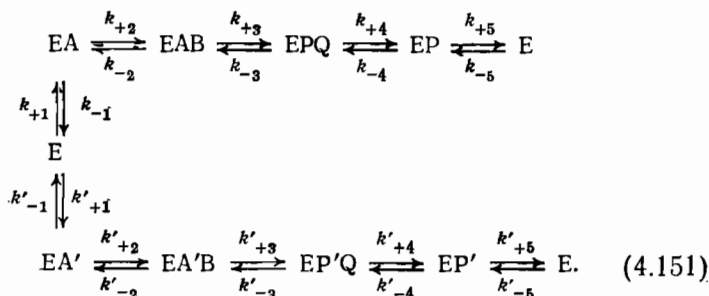
Начальная скорость образования P в равновесном приближении равна

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_M^A}{a} \left(1 + \frac{a'}{K_M^{A'}} \right) + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{a'}{K_s^{A'}} \right)}. \quad (4.150)$$

Из этого следует, что если за ходом реакции следить по образованию P , то A' будет конкурентным ингибитором по отношению к A и ингибитором смешанного типа по отношению к B . Если в систему вводится аналог B , наблюдается обратная ситуация.

Для фермента, который функционирует по упорядоченному механизму с образованием тройного комплекса (4.114), в при-

существовании альтернативного субстрата получаем следующую схему:



Эта ситуация аналогична рассмотренной выше, когда второй субстрат В усиливает ингибирующее действие А'. Уравнение начальной скорости образования Р в стационарном приближении имеет вид

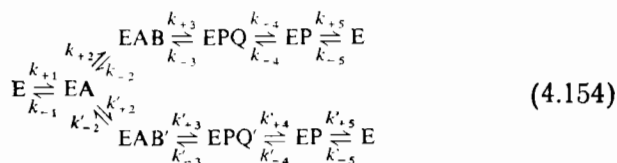
$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} (1 + C) + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} (1 + C)}, \quad (4.152)$$

где

$$C = \left(\frac{k'_{+1}a'}{k'_{-1}} + \frac{k'_{+1}(k'_{-2} + k'_{+3})a'}{k'_{+2}k'_{+3}b} \right) \left(1 + \frac{k'_{+2}b}{k'_{-2}k'_{+3}} + \frac{k'_{+2}k'_{+3}b}{k'_{+4}(k'_{-2} + k'_{+3})} \right). \quad (4.153)$$

Таким образом, при постоянной концентрации В альтернативный субстрат А' будет проявлять себя как конкурентный ингибитор в отношении А, однако при наличии в системе А' график двойных обратных величин в координатах $\{1/b; 1/v\}$ при постоянной концентрации А не будет линейным.

Если в качестве альтернативного субстрата используется аналог В (В'), то систему можно представить в виде следующей схемы:



В данном случае А не может усиливать ингибирующее действие В', поскольку связывается с ферментом раньше, чем В'.

Уравнение скорости образования Q в стационарном приближении имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} \left(1 + \frac{b'}{K_i}\right) + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{b'}{K_i'}\right)}, \quad (4.155)$$

где

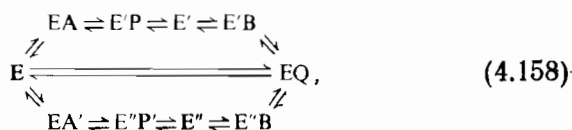
$$K_i = \frac{k'_{-2} + k'_{+3}}{k'_{+2}} \left(1 + \frac{k'_{+3}}{k'_{+4}}\right), \quad (4.156)$$

$$K_i' = \frac{k'_{-1}(k'_{-2} + k'_{+3})}{k'_{+2}k'_{+3}}. \quad (4.157)$$

Следовательно, В' действует просто как конкурентный ингибитор по отношению к В и как ингибитор смешанного типа по отношению к А [см. табл. 4.5 (в)]. Необходимо отметить следующее обстоятельство: поскольку ингибитор В' является также и субстратом, то рассматриваемые константы ингибирования не являются истинными константами диссоциации, они представляют собой стационарные константы.

Если фермент функционирует по механизму Теорелла — Чанса, то в присутствии альтернативных субстратов применимы уравнения, справедливые для упорядоченного механизма; они имеют такую же форму, как (4.152) и (4.155).

В случае реакции двухстадийного переноса (4.121) при наличии субстрата, альтернативного А, имеем систему



где E' и E'' могут быть не идентичны. Поскольку в этом случае стадии освобождения продуктов (P, P' и Q) в условиях определения начальной скорости являются необратимыми, связывание В не будет оказывать прямого влияния на ингибирование, вызываемое А', в то же время А' будет выступать как конкурентный ингибитор по отношению к А и ингибитор смешанного типа по отношению к В. Если в качестве альтернативного субстрата будет взят аналог В, ситуация изменится на обратную.

Таким образом, использование альтернативных субстратов не позволяет различить неупорядоченный механизм в равновесных условиях и механизм двухстадийного переноса.

Этот подход дает, однако, возможность сделать выбор между неупорядоченным механизмом в равновесных условиях, с одной стороны, и упорядоченным механизмом Теорелла — Чанса — с другой. Кроме того, при этом можно установить, какой из субстратов связывается первым, если имеет место упорядо-

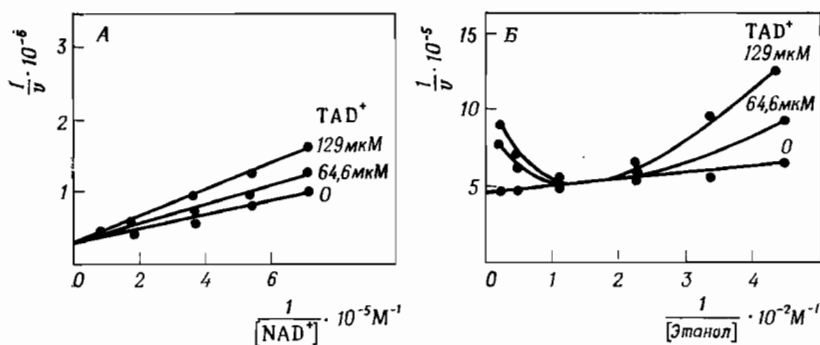


Рис. 4.26. Использование альтернативных субстратов для установления механизма реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой печени [4022]. За ходом реакции следили по восстановлению NAD^+ . А. 3 мкМ этанол. Б. $2,48 \times 10^{-5}$ М NAD^+ .

ченный механизм. На рис. 4.26 приведены графики двойных обратных величин, полученные для алкогольдегидрогеназы печени (КФ 1.1.1.1); в качестве альтернативных субстратов использовались NAD^+ и тионикотинамидадениндинуклеотид (TAD^+); за ходом реакции следили по образованию NADH . Приведенные данные говорят о том, что реакция протекает по упорядоченному механизму, в котором NAD (или его аналог) связывается с ферментом раньше, чем спирт [4022].

2. *Определение суммарной скорости образования продуктов* [1448]. Различить неупорядоченный и упорядоченный механизмы удастся и в том случае, если регистрировать образование обоих альтернативных продуктов. Для системы, подобной (4.147) и (4.148), суммарная скорость образования обоих альтернативных продуктов (P плюс P') может быть определена также по скорости образования другого продукта (Q).

Для неупорядоченного механизма в равновесных условиях при наличии альтернативного субстрата (4.149) начальная суммарная скорость образования P и P' определяется уравнением

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_M^A}{a} \left(1 + \frac{a'}{K_i^{A'}} \right) + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{a'}{K_s^{A'}} \right)} + \frac{k'e}{1 + \frac{K_M^{A'}}{a'} \left(1 + \frac{a}{K_M^{A'}} \right) + \frac{K_{M'}^B}{b} + \frac{K_s^{A'} K_{M'}^B}{a'b} \left(1 + \frac{a}{K_s^A} \right)} \quad (4.159)$$

Из этого уравнения следует, что в случае определения суммарной скорости образования продуктов (в присутствии альтер-

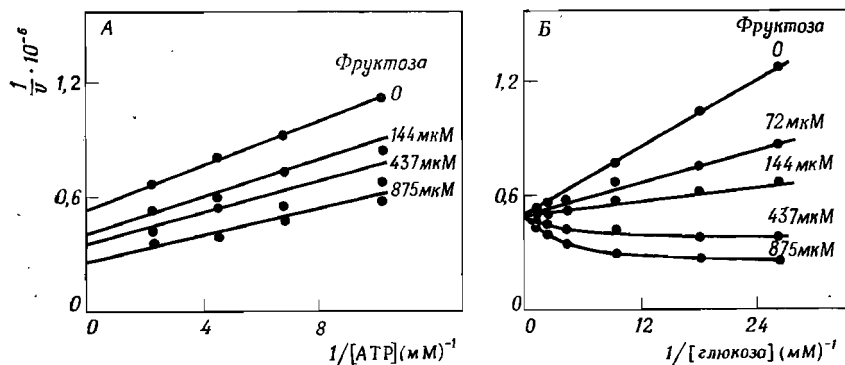
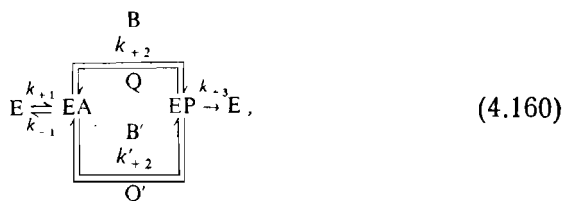


Рис. 4.27. Использование альтернативных субстратов для установления механизма реакции, катализируемой дрожжевой гексокиназой [5303]. За ходом реакции следили по фосфорилированию смеси глюкоза+фруктоза. А. 219 μM глюкоза. Б. 444 μM АТР.

нативного субстрата) график двойных обратных величин будет нелинейным в координатах $\{1/a; 1/v\}$ (если альтернативный субстрат является аналогом А) и линейным в координатах $\{1/b; 1/v\}$. Если же в качестве альтернативного субстрата используется аналог В (В'), то имеет место обратная ситуация. На рис. 4.27 приведены результаты, полученные в опытах с дрожжевой гексокиназой (КФ 2.7.1.1); они согласуются со схемой, при которой субстраты — АТР и глюкоза — связываются с ферментом неупорядоченно. В качестве альтернативного субстрата для глюкозы была использована фруктоза; концентрация иона-активатора Mn^{2+} была насыщающей.

Если в случае упорядоченного механизма альтернативный субстрат связывается с ферментом вторым, например, в случае механизма Теорелла — Чанса



уравнение скорости образования Р (или Q плюс Q') в стационарном приближении имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K'_M{}^B}{b + b'} \left(1 + \frac{K_s^A}{a} \right)}, \quad (4.161)$$

где K'^B_M — истинная константа Михаэлиса для В плюс В'. Следовательно, графики двойных обратных величин в координатах

$\{1/a; 1/v\}$ и $\{1/b; 1/v\}$ будут линейными. Если используется аналог субстрата, связывающегося первым, то получается уравнение, аналогичное (4.159); график двойных обратных величин в координатах $\{1/a, 1/v\}$ будет нелинейным. Подобная ситуация характерна и для упорядоченного механизма с образованием тройного комплекса [схемы (4.151) и (4.154)].

д. Соотношения Холдейна

Соотношение Холдейна между константой равновесия и параметрами Михаэлиса для односубстратной реакции обсуждалось на с. 111—112. Олберти [62] показал, что для некоторых двухсубстратных реакций можно получить более одного соотношения Холдейна и что эти соотношения в определенных случаях являются специфическими для данного кинетического пути. Дальциль [956] суммировал соотношения Холдейна для

Таблица 4.7

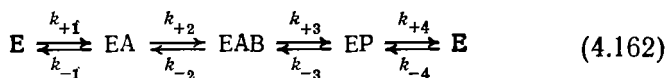
Некоторые соотношения Холдейна для двухсубстратных реакций. Константа равновесия реакции обозначена через K ; константы Михаэлиса (K_M) и кажущиеся константы диссоциации (K_s) для субстратов (А и В) и продуктов (Р и Q) имеют соответствующие индексы

Кинетический механизм	Соотношение Холдейна
Упорядоченный механизм с образованием тройного комплекса [уравнение (4.114)]	$K = \frac{V_f K_s^P K_M^Q}{V_b K_s^A K_M^B}$
Механизм Теорелла — Чанса [уравнение (4.120)]	$K = \frac{V_f K_s^P K_M^Q}{V_b K_s^A K_M^B} = \left(\frac{V_f}{V_b} \right)^3 \frac{K_M^P K_M^Q}{K_M^A K_M^B}$
Механизм двухстадийного переноса [уравнение (4.121)]	$K = \left(\frac{V_f}{V_b} \right)^2 \frac{K_M^P K_M^Q}{K_M^A K_M^B}$
Неупорядоченный механизм в равновесных условиях [уравнение (4.134)]	$K = \frac{V_f K_s^P K_M^Q}{V_b K_s^A K_M^B}$
Неупорядоченный механизм в равновесных условиях при $K_M^A = K_s^A$ и $K_M^B = K_s^B$ (с. 135)	$K = \frac{V_f K_s^P K_s^Q}{V_b K_s^A K_s^B}$

обычных двухсубстратных реакций, а сравнительно недавно эти соотношения были получены для систем с числом субстратов больше двух [799, 962].

В табл. 4.7 представлены соотношения Холдейна для двухсубстратных реакций, рассмотренных в данной главе. Этот ряд соотношений безусловно не является исчерпывающим; более полная сводка приведена в работе Клееланда [799]. Соотношения Холдейна в ряде случаев помогли установить характер доминирующего кинетического пути. Например, Найгоорд и Теорелл [3495] на основе соотношений Холдейна показали, что алкогольдегидрогеназа печени (КФ 1.1.1.1) в отличие от соответствующего фермента из дрожжей функционирует по механизму Теорелла — Чанса.

Использование соотношений Холдейна для выбора между упорядоченными механизмами с образованием тройных комплексов и механизмом Теорелла — Чанса требует, однако, определенной осторожности. Так, Дальциль указал, что в случае упорядоченного механизма с образованием одного тройного комплекса



при $k_{-2} \ll k_{-1}$ и $k_{+3} \ll k_{+4}$, анализ системы с помощью соотношений Холдейна приводит к таким же соотношениям, как и в случае механизма Теорелла — Чанса, поскольку диссоциация тройного комплекса не является лимитирующей стадией.

е. Соотношения Дальциля

Как отмечал Дальциль [956], указание на механизм двухсубстратной реакции нередко могут дать соотношения между кинетическими константами. В табл. 4.8 приведены некоторые из соотношений, рассмотренных этим автором; заметим, что номенклатура Дальциля отлична от принятой нами (см. с. 173). Такие соотношения, использованные во многих исследованиях по кинетике действия ферментов, могут служить важным дополнительным источником информации при установлении характера доминирующего кинетического процесса. Однако, как и в случае соотношений Холдейна, прийти к однозначному выводу не всегда удастся; так, соотношение, получаемое для упорядоченного механизма с образованием одного тройного комплекса, в условиях, обсуждавшихся в связи с уравнением (4.162), идентично соотношениям, характерным для механизма Теорелла — Чанса. Соотношения для трехсубстратных реакций приведены в работе [962].

Таблица 4.8

Соотношение Дальциля для двухсубстратных реакций

Кинетический механизм	Соотношение между кинетическими константами
Упорядоченный механизм с образованием тройного комплекса [уравнение (4.114)]	$\frac{K_M^A}{K_s^A} < \frac{e}{V_b}$
Механизм Теорелла — Чанса [уравнение (4.120)]	$\frac{K_M^A}{K_s^A} = \frac{e}{V_b}$
Механизм двухстадийного переноса [уравнение (4.121)]	$K_s^A = 0$
Неупорядоченный механизм в равновесных условиях при $K_M^A = K_s^A$ и $K_M^B = K_s^B$ (с. 135)	$\frac{K_M^A}{K_s^A} = \frac{e}{V_f}$

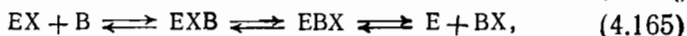
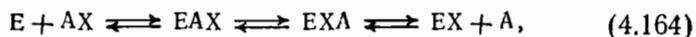
ж. Изотопный обмен

Важную информацию о кинетическом механизме реакции может дать исследование изотопного обмена. В ходе трансферной реакции типа



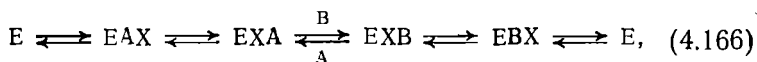
находящейся в равновесии, при наличии в системе радиоактивно меченого субстрата (или продукта) будет происходить включение радиоактивной метки в продукт (или субстрат) в результате многократного обращения реакции (см. гл. 8). Можно исследовать реакции обмена между AX^* и BX , A^*X и A , а также B^*X и B , но не между A^* и B (звездочкой обозначено меченое соединение).

В наиболее простом случае метод изотопного обмена может использоваться для выяснения вопроса о том, какие компоненты необходимы для осуществления обменной реакции. Например, если фермент катализирует процесс двухстадийного переноса



то будет наблюдаться обмен между A^*X и A в отсутствие B и BX [уравнение (4.164)] и между B^*X и B в отсутствие A и AX [уравнение (4.165)]. Если, однако, фермент функционирует по

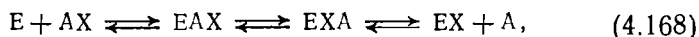
механизму, в котором для протекания реакции необходимо наличие обоих субстратов (например, в случае механизма Теорелла — Чанса или же механизма с образованием тройного комплекса), то реакции обмена будут осуществляться только в присутствии обоих субстратов. Использование обменных реакций этого типа с целью получения результатов качественного характера обсуждается более детально в гл. 8. Хотя такие исследования дают очень ценную информацию, следует соблюдать известную осторожность при интерпретации результатов, поскольку весьма возможно, что реакции, кинетически несущественные для протекания суммарной реакции, могут вносить большой вклад в обменную реакцию в конкретных условиях. Например, в случае механизма Теорелла — Чанса, обсуждавшегося на с. 143:



при условии, что комплекс EXA нестабилен, идет реакция



Если скорость этой реакции невелика, то на кинетику суммарной реакции она существенно влиять не будет. При этом, однако, может происходить достаточно интенсивный обмен между A^*X и A :



если фермент инкубировать с этими реагентами в отсутствие B и BX . Необходимо, следовательно, убедиться в том, что наблюдаемый обмен характеризует основной, а не второстепенный кинетический путь, т. е. скорость наблюдаемого обмена должна быть достаточно велика, чтобы соответствующая стадия могла являться частью суммарной реакции.

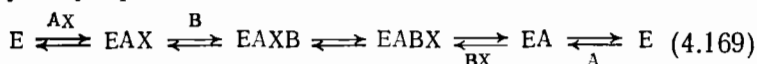
Более детальные сведения о кинетическом механизме дает количественное исследование кинетики реакций изотопного обмена. Хотя эти реакции можно исследовать, определяя начальные скорости [563, 564], обычно их изучают в условиях, когда суммарная реакция находится в состоянии равновесия. Именно такой подход был впервые разработан Бойером [510, 515], и кинетика реакций изотопного обмена весьма детально проанализирована в ряде работ. Бойер [510], Олберти и др. [69], Моралес и др. [3233] и Флоссдорф и Кула [1380] вывели уравнение изотопного обмена для ряда двухсубстратных систем в стационарном приближении; Уонг и Хейнс [5150], а также Клеланд [802] показали, что для получения соответствующих уравнений может быть использован метод Кинга и Альтмана.

В обычно применяемом методе исследования кинетики обмена изменяют концентрации одного (немеченого) субстрата и

одного (немеченого) продукта [например, АХ и А в уравнении (4.163)] так, чтобы их отношение оставалось постоянным (и равновесие суммарной химической реакции не нарушалось), и определяют влияние этого изменения на начальную скорость изотопного обмена между другим субстратом и другим продуктом. При увеличении концентрации пары субстрат — продукт могут наблюдаться два случая: скорость обмена либо непрерывно увеличивается, приближаясь асимптотически к максимуму, либо увеличивается только вначале, а затем при более высоких концентрациях снижается (рис. 4.28).

Уонг и Хейнс [5150] показали, что в общем случае можно предсказать ожидаемый результат для данного кинетического пути, не выводя полных кинетических уравнений. Они отмечают, что, если насыщение парой субстрат — продукт (концентрация которых изменяется) приводит к уменьшению концентрации двух «соседних» интермедиатов на пути обмена практически до нуля, будет наблюдаться ингибирование обмена. Например, изотопный обмен $A^*X \rightleftharpoons A$ будет подавлен, если концентрация двух соседних интермедиатов, находящихся между «точками» включения АХ и А в реакционную последовательность, уменьшится практически до нуля, поскольку прервется путь, по которому может осуществляться обмен. Если, однако, насыщение парой субстрат — продукт приводит к значительному снижению концентрации только одного интермедиата, а концентрация одного из соседних интермедиатов остается конечной, обмен не прекращается, поскольку в этом случае (согласно принципу микроскопической обратимости) он может протекать при участии «соседнего» интермедиата.

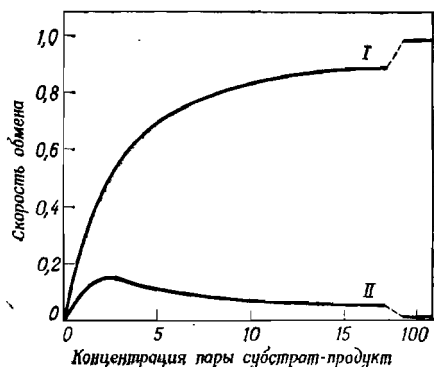
В случае упорядоченной системы



при увеличении концентраций В и ВХ концентрации ЕАХ, Е и ЕА уменьшаются, и фермент будет находиться преимущественно в составе комплексов ЕАХВ и ЕАВХ. При достаточно высоких концентрациях В и ВХ концентрации ЕАХ, Е и ЕА станут пренебрежимо малыми, и поскольку изотопный обмен между A^*X и А может осуществляться только при участии этих трех интермедиатов, он будет подавлен, как показывает кривая II на рис. 4.28. На самом деле для подавления обмена достаточно увеличения концентрации только В (или ВХ), приводящего к уменьшению концентрации двух соседних интермедиатов до нуля; поэтому обмен будет подавляться и при увеличении концентрации других пар субстрат — продукт, содержащих В или ВХ.

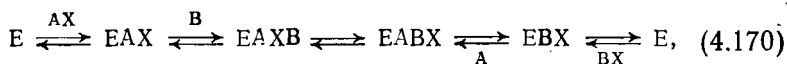
С другой стороны, обмен между B^*X и В в рассматриваемой системе не подавляется при повышении концентрации АХ и А,

Рис. 4.28. Гипотетические кривые, показывающие влияние увеличения концентрации пары субстрат — продукт на начальную скорость изотопного обмена в системе, подчиняющейся уравнению (4.169). Кривая I, обмен $B^*X \rightarrow BX$, изменяется концентрация $AX + A$. Кривая II, обмен $A^*X \rightarrow A$, изменяется концентрация $BX + B$.



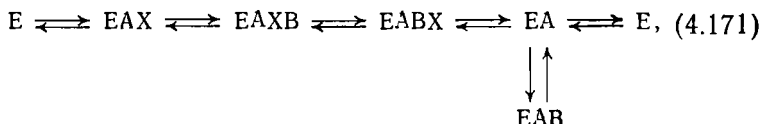
приводящем к уменьшению до нуля концентрации только одного интермедиата (E), но не EAX или EA (см. кривую I на рис. 4.28). По тем же причинам другие пары, включающие AX или A , также не способны подавлять обмен; концентрации некоторых интермедиатов могут при этом снижаться, однако они не находятся на прямом пути реакции обмена.

Если же продукты освобождаются в другой очередности, а именно:



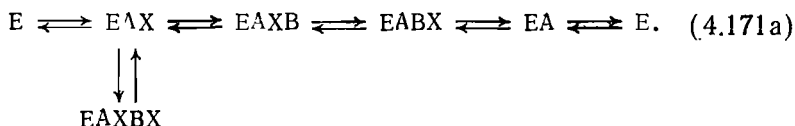
то насыщение компонентами AX и A будет подавлять обмен между B^*X и B , поскольку концентрации двух соседних интермедиатов (EBX и E) уменьшатся практически до нуля. Как и раньше, пара B и BX подавляет обмен $A^*X \rightarrow A$. Таким образом, по данным изотопного обмена теоретически удастся различить очередность связывания субстратов и освобождения продуктов.

Простые схемы ингибирования, характерные для упорядоченного механизма, могут усложняться при образовании тупиковых ингибиторных комплексов. Так, можно предполагать, что обмен между B^*X и B в ходе реакции (4.169) не будет подавляться ни одной из пар реагентов. Если, однако, образуется тупиковый комплекс EAB :

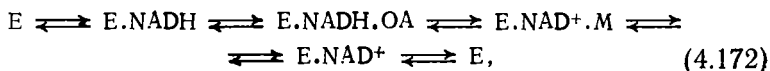


то насыщение парой $A+B$ может привести к подавлению обмена $B^*X \rightarrow B$ в результате смещения равновесия в сторону образования тупикового комплекса и уменьшения концентрации соседних интермедиатов.

Можно представить систему, в которой тупиковый комплекс образуется в результате одновременного связывания с ферментом АХ и ВХ:

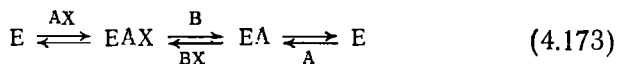


Если, однако, Х не очень мал по размеру, то он, возможно, будет связываться со специфическим участком на ферменте, и АХ и ВХ не смогут одновременно связываться с этим участком. Если же Х — это, скажем, один или два атома водорода, то такое ограничение отпадает. Например, в случае функционирования дегидрогеназы NADH (=AX) и NAD⁺ (=A) могут связываться с одним участком, а восстановленная и окисленная формы субстрата — с другим, соседним участком, при этом атом Н, принадлежащий NADH, и атом Н восстановленного субстрата могут связываться одновременно, поскольку размеры их достаточно малы. Такая ситуация наблюдается при функционировании малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37). Кинетическая последовательность для этого фермента сходна с (4.169):



где ОА и М — оксалоацетат и малат соответственно. В работе [4289] было показано, что, как и следовало ожидать для такой системы, при высоких концентрациях NAD⁺ + ОА наблюдается подавление обмена между NAD⁺ и NADH, но не между М и ОА. Однако при высоких концентрациях М + NADH наблюдается подавление обеих реакций. Эти данные проще всего объяснить образованием тупикового комплекса E.NADH.M. Возможность таких осложнений показывает, что для получения убедительных данных желательно исследовать влияние на обменные реакции всех возможных пар субстрат — продукт.

В случае механизма Теорелла — Чанса характер ингибирования можно предсказать подобным же образом. Так, для механизма



можно ожидать, например, что обмен между А*Х и А будет подавляться при насыщающих концентрациях А + В или АХ + ВХ, но не В + ВХ.

О реакциях обмена в системах с двухстадийным переносом говорилось выше. Клеланд [803] получил уравнение начальной

скорости реакции обмена между A^*X и A для системы (4.164) — (4.165). Оно имеет вид

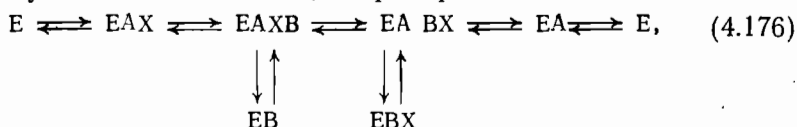
$$v = \frac{V \cdot \frac{K_s^{AX}}{K_M^{AX}}}{1 + \frac{K_s^{AX}}{ax} + \frac{K_s^A}{a}}, \quad (4.174)$$

где ax — концентрация AX ; аналогичное уравнение можно получить также для обмена $B^* \rightarrow BX$. Следовательно, графики зависимости величины, обратной скорости обмена, от $1/ax$ образуют семейство параллельных прямых (для серии концентраций A); из вторичных графиков для длин отсекаемых отрезков можно далее определить кажущиеся константы диссоциации K_s^{AX} и K_s^A .

В случае обратимой неупорядоченной системы



наличие альтернативных путей для связывания каждой пары субстратов приводит к тому, что обменные реакции не подавляются ни одной из субстратных пар. Бойер [510, 515] предположил, что отсутствие ингибирования может быть использовано для отличия системы этого типа от упорядоченной. Однако этот критерий следует использовать с известной осторожностью; так, Уонг и Хейнс [5150] отметили, что упорядоченные системы, в которых тройные комплексы могут диссоциировать с образованием тупиковых комплексов, например

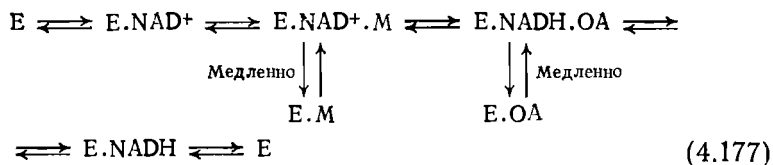


ведут себя как системы, в которых реакции обмена не подавляются при увеличении концентрации любой субстратной пары. Следует отметить, что при образовании тупиковых комплексов в неупорядоченных равновесных системах может наблюдаться подавление обмена высокими концентрациями пар субстрат — продукт, как это было показано для галактокиназы (КФ 2.7.1.6) [1707]. Однако в таком случае возможность связывания каждого из реактантов с альтернативными формами (комплексами) фермента приводит к симметричной ситуации, при которой какая-либо пара реактантов, тормозящая одну из реакций обмена, будет тормозить также и все остальные обменные реакции.

Особый случай использования реакции изотопного обмена — привлечение этого метода для выяснения вопроса о том, дейст-

вительно ли неупорядоченная равновесная система находится в состоянии полного равновесия. В системе (4.175) стадии, на которых происходит связывание субстратов, будут равновесными в том случае, когда лимитирующими являются стадии взаимопревращения тройных комплексов (с. 134). Следовательно, если суммарная реакция для неупорядоченной системы является равновесной, все изотопные обменные реакции этой системы должны протекать с одинаковой скоростью, в то время как в случае упорядоченных систем это положение не является обязательным. Сопоставление скоростей обмена различных пар реактантов показало, что креатинкиназа (КФ 2.7.3.2) функционирует по неупорядоченному механизму и что система действительно находится в состоянии равновесия; в то же время было установлено, что в случае галактокиназы (КФ 2.7.1.6) из *E. coli* и гексокиназы из дрожжей (КФ 2.7.1.1), функционирующих, как полагают, по неупорядоченному равновесному механизму, скорости изотопных обменных реакций соответствующих пар реактантов в ряде случаев различаются; это свидетельствует о том, что равновесные условия строго не соблюдаются.

Исследование обменных реакций позволяет также обнаружить второстепенные пути катализируемых ферментами реакций, поскольку происходящее при насыщении парой субстрат — продукт ингибирование может быть частично предотвращено, если есть возможность «обойти» блок. В таких случаях при увеличении концентрации пары субстрат — продукт скорость обмена будет снижаться до конечной величины. Частичное ингибирование наблюдали в случае алькогольдегидрогеназ дрожжей и печени (КФ 1.1.1.1) [4288] и лактат- и малатдегидрогеназ (КФ 1.1.1.27 и 1.1.1.37) при высоких значениях pH [4288, 4289]. В случае малатдегидрогеназы отсутствие полного ингибирования обмена $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$ при насыщающих концентрациях пары оксалоацетат + малат связывают с (относительно медленной) диссоциацией тройных комплексов, приводящей к образованию комплексов E.OA и E.M , которые далее могут взаимодействовать с NADH и NAD^+ соответственно; при этом образуются комплексы, находящиеся на пути реакций обмена



Реакции между двумя молекулами субстрата

Фермент может катализировать реакцию между двумя идентичными субстратными молекулами; например, аденилаткиназа

(КФ 2.7.4.3) катализирует реакцию



В этом случае общее кинетическое уравнение для двухсубстратной реакции (4.86) имеет вид

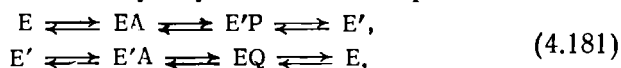
$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_{M'}^A}{a} + \frac{K_s^A K_{M'}^A}{a^2}}, \quad (4.179)$$

где K_M^A и $K_{M'}^A$ — константы Михаэлиса для первой и второй связывающихся с ферментом молекул субстрата. Для системы, подчиняющейся этому уравнению, график Михаэлиса является не равнобочной гиперболой, а сигмовидной кривой, график же двойных обратных величин представляет собой вогнутую кривую (см. гл. 8). Касательная к графику двойных обратных величин в точке пересечения с вертикальной осью отсекает на горизонтальной оси отрезок, равный $-1/K_M^A K_{M'}^A$.

Единственный случай, когда для такой системы график двойных обратных величин является линейным, — это наличие необратимой стадии между стадиями связывания первой и второй молекул субстрата (с. 133 и 140). В этом случае величина K_s^A оказывается равной нулю и уравнение (4.179) упрощается до

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_{M'}^A}{a}}. \quad (4.180)$$

Подобную ситуацию можно ожидать в том случае, если реакция протекает по механизму двухстадийного переноса:

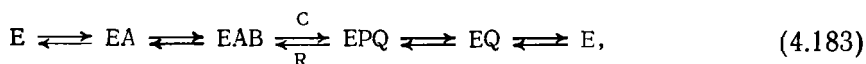
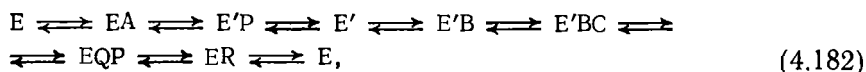


В случае систем типа (4.181) график двойных обратных величин не будет, однако, линейным, если реакция протекает при фиксированной концентрации продукта.

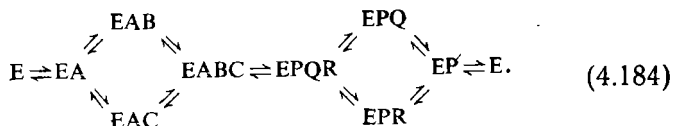
Реакции с участием трех и большего числа субстратов

Кинетика трехсубстратных реакций изучалась рядом исследователей; систематический анализ возможных путей реакций провел Дальциль [962]. Четырехсубстратные реакции встречаются редко, однако несколько случаев систем такого рода известно; их детальное исследование проведено Эллиоттом и Типтоном [1235]. Мы не имеем возможности подробно рассматривать в этой книге столь сложные системы и ограничимся изложением только ряда общих вопросов.

Механизмы реакций с участием трех и большего числа субстратов аналогичны механизмам, характерным для двухсубстратных реакций; однако иногда встречаются системы, в которых сочетаются несколько механизмов (гибридные механизмы). Трехсубстратные системы могут функционировать по полностью неупорядоченному или полностью упорядоченному механизму; кроме того, два субстрата могут взаимодействовать по типу двухстадийного переноса или в соответствии с механизмом Теорелла — Чанса, в то время как третий субстрат функционирует на участке реакционного пути с упорядоченной последовательностью, образуя тройной комплекс, например



где А, В и С — субстраты, а Р, Q и R — продукты. Встречаются также «гибридные» неупорядочно-упорядоченные системы, например



Ясно, что приведенные здесь случаи далеко не исчерпывают всех возможных механизмов реакций с участием трех и более субстратов. Эти реакции можно, однако, исследовать таким же путем, что и двухсубстратные реакции. Как и для последних, последовательности, в которых два (или более) субстрата связываются с ферментом неупорядочно, характеризуются в стационарных условиях нелинейными графиками двойных обратных величин; для равновесных условий эти графики линейны. Конечно, в системах с участием двух и более субстратов связывание одних субстратов может происходить равновесным образом, в то время как связывание других — стационарным. Общий метод вывода уравнений начальной скорости для систем, включающих как равновесные, так и стационарные стадии, был предложен Ча [720].

Общее кинетическое уравнение для трехсубстратной реакции, которой отвечает линейный график двойных обратных величин, имеет следующий вид:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_M^C}{c} + \frac{K^{AB}}{ab} + \frac{K^{AC}}{ac} + \frac{K^{BC}}{bc} + \frac{K^{ABC}}{abc}}. \quad (4.185)$$

Здесь K_M^A , K_M^B и K_M^C — истинные константы Михаэлиса для субстратов А, В и С соответственно, т. е. каждая константа характеризует концентрацию субстрата, при которой наблюдается скорость, равная половине максимальной (при насыщающих концентрациях двух других субстратов). Константы K^{AB} , K^{AC} , K^{BC} и K^{ABC} являются комбинацией констант Михаэлиса и кажущихся констант диссоциации, их смысл зависит от характера превалирующего механизма¹. Если, например, концентрации В и С становятся достаточно высокими, то уравнение (4.185) упрощается:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a}}. \quad (4.186)$$

Если же существенно увеличивается концентрация только одного из субстратов (например, С), то уравнение (4.185) переходит в

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K^{AB}}{ab}}, \quad (4.187)$$

которое фактически идентично (4.86); таким образом, если концентрация одного из субстратов является насыщающей, трехсубстратные реакции могут анализироваться таким же образом, как двухсубстратные.

Константы для систем, подчиняющихся уравнению (4.185), можно определить графически. Для этого строят серию графиков двойных обратных величин для каждого из субстратов при ряде концентраций одного из двух других субстратов (поочередно), определяют наклоны соответствующих прямых и длины отсекаемых ими отрезков и строят вторичные графики таким же образом, как для двухсубстратных реакций; поскольку, однако, в процессе участвуют три субстрата, можно затем построить еще одну серию вторичных графиков — каждую при разных концентрациях третьего субстрата; далее наклоны и отрезки этих вторичных графиков можно отложить в зависимости от

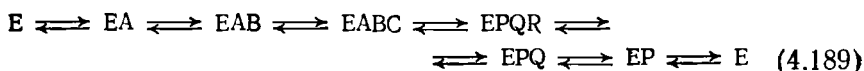
¹ О кинетической номенклатуре. К сожалению, общепринятая номенклатура для кинетических констант, входящих в уравнения начальной скорости, отсутствует; в настоящее время используется несколько вариантов обозначений. В этой книге принята система, рекомендованная Международным биохимическим союзом. Уравнение (4.86), Дальдиль записывает в виде

$$\frac{e}{V} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{[A]} + \frac{\phi_2}{[B]} + \frac{\phi_{12}}{[AB]}. \quad (4.188)$$

Другие авторы используют уравнение (4.86) с другими символами для обозначения кинетических констант. Перечень различных констант приведен, например, в работах [802, 4750].

обратной концентрации третьего субстрата (третичные графики). В табл. 4.9 показано, как определить по этим графикам константы, входящие в уравнение (4.185). В работе [962] приведены соотношения Дальциля между различными константами, весьма полезные для определения кинетического механизма реакции.

Как и в случае двухсубстратных систем, некоторые константы, входящие в уравнение (4.185), для отдельных механизмов становятся равными нулю. Особенно интересны упорядоченные системы (в том числе такие, в которых два субстрата участвуют в процессе Теорелла — Чанса или в двухстадийном переносе), поскольку в этом случае в уравнении скорости отсутствует комбинированная константа для субстратов, которые присоединяются не друг за другом. Так, для анализа последовательности



применимо уравнение (4.185), не содержащее константу K_{AC} ; при достаточно большой концентрации «среднего» субстрата (B) это уравнение упрощается до

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^C}{c}} \quad (4.190)$$

Графики двойных обратных величин для этого уравнения образуют семейство параллельных прямых при переменной концентрации одного из субстратов и фиксированной концентрации другого. Следует отметить, что система (4.189) при насыщающих концентрациях любого из двух других субстратов (кроме «среднего») характеризуется уравнением такого же вида, как и (4.187); следовательно, если при построении одной из серии графиков двойных обратных величин образуется семейство параллельных прямых, это означает, что соответствующий субстрат является «средним» [1418].

Для установления кинетического механизма в случае фермента, взаимодействующего с тремя или большим числом субстратов, можно исследовать характер ингибирования реакций продуктом [803, 1235, 3701, 4023]; имеются данные и по применению для этой цели «тупиковых» ингибиторов [1449, 2090].

Исследование связывания субстрата

Во многих случаях удается прямо исследовать связывание субстрата с ферментом. Так, для системы



Таблица 4.9

Выражения, определяющие наклоны графиков двойных обратных величин и длины отсекаемых ими отрезков (по отношению к субстрату А), для систем, подчиняющихся уравнению (4.185)

График	Наклон	Длина отрезка, отсекаемого от оси $1/v$
<i>Первичный график:</i>		
$1/v - 1/a$	$K_M^A + \frac{K^{AB}}{b} + \frac{K^{AC}}{c} + \frac{K^{ABC}}{bc}$	$1 + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_M^C}{c} + \frac{K^{BC}}{bc}$
	V	V
<i>Вторичные графики:</i>		
(1) Длина отрезка — $1/b$	$\frac{K_M^B + \frac{K^{BC}}{c}}{V}$	$\frac{1 + \frac{K_M^C}{c}}{V}$
(2) Длина отрезка — $1/c$	$\frac{K_M^C + \frac{K^{BC}}{b}}{V}$	$\frac{1 + \frac{K_M^B}{b}}{V}$
(3) Наклон — $1/b$	$\frac{K^{AB} + \frac{K^{ABC}}{c}}{V}$	$\frac{K_M^A + \frac{K^{AC}}{c}}{V}$
(4) Наклон — $1/c$	$\frac{K^{AC} + \frac{K^{ABC}}{b}}{V}$	$\frac{K_M^A + \frac{K^{AB}}{b}}{V}$
<i>Третичные графики:</i>		
Длина отрезка (1) — $1/c$	$\frac{K_M^C}{V}$	$\frac{1}{V}$
Наклон (1) — $1/c$	$\frac{K^{BC}}{V}$	$\frac{K_M^B}{V}$
Длина отрезка (2) — $1/b$	$\frac{K_M^B}{V}$	$\frac{1}{V}$
Наклон (2) — $1/b$	$\frac{K^{BC}}{V}$	$\frac{K_M^C}{V}$
Длина отрезка (3) — $1/c$	$\frac{K^{AC}}{V}$	$\frac{K_M^A}{V}$
Наклон (3) — $1/c$	$\frac{K^{ABC}}{V}$	$\frac{K^{AB}}{V}$
Длина отрезка (4) — $1/b$	$\frac{K^{AB}}{V}$	$\frac{K_M^A}{V}$
Наклон (4) — $1/b$	$\frac{K^{ABC}}{V}$	$\frac{K^{AC}}{V}$

можно следить за образованием комплекса ES при различных концентрациях S, если имеется способ определения концентрации комплекса.

Определять концентрацию ES можно различными физическими методами либо непосредственно, либо следя за уменьшением концентрации свободного S, обусловленным связыванием части его с ферментом. Клотц и др. [2490] применяли для этой цели равновесный диализ. В обычном варианте раствор фермента известного объема и концентрации помещают в диализный мешочек и диализуют до равновесия против раствора субстрата известного объема и концентрации. В выбранных условиях субстрат не должен претерпевать никаких превращений. После достижения равновесия определяют концентрацию субстрата в растворе, против которого производился анализ, и считают, что такова же концентрация свободного субстрата в растворе с ферментом (если можно пренебречь эффектом Доннана). Зная общее количество введенного в систему субстрата и внося, если это необходимо, поправки на изменение объема, можно рассчитать количество субстрата, связанного с ферментом, а также число молекул субстрата, связанных одной молекулой фермента. Затем процедуру повторяют при ряде концентраций субстрата. При интерпретации результатов таких экспериментов следует соблюдать осторожность, так как известно, что некоторые соединения связываются со стенками диализного мешочка; в таком случае, чтобы получить достоверные результаты, необходимо внести поправку на связывание.

Процедура равновесного диализа занимает довольно много времени, что связано с медленным установлением равновесия между свободным субстратом по обе стороны мембраны. В связи с этим применяют два других, более быстрых метода. Метод ультрафильтрации отличается от метода равновесного диализа тем, что фермент и субстрат растворяют в одном растворе, и с помощью ультрамембраны отделяют от белоксодержащей фазы небольшое количество безбелковой фазы. Определяют концентрацию субстрата в ультрафильтрате и полагают, что она равна концентрации несвязанного субстрата в присутствии фермента. Альтернативный метод заключается в том, что весь раствор субстрата продавливают через ультрамембрану, а затем определяют количество субстрата, связанного с ферментом, который задержан на мембране. Во всех этих методах можно использовать устройства, позволяющие проводить одновременно несколько опытов.

Коловик и Вомак [848] предложили метод равновесного диализа, который позволяет не дожидаться установления равновесия; он основан на том, что стационарная скорость прохождения через мембрану диффундирующего субстрата пропорциональна разности концентраций свободного субстрата по обе

стороны мембраны. При этом определяют стационарную концентрацию субстрата в буферном растворе, проходящем через диализную мембрану. Измерения занимают значительно меньше времени, чем при обычном методе равновесного диализа.

Хуммель и Дрейер [2085] разработали способ определения количества связанного субстрата методом гель-фильтрации. Метод основан на том, что низкомолекулярный субстрат движется через колонку с соответствующим гелем — молекулярным ситом — медленнее, чем высокомолекулярный фермент. Если колонка уравновешена раствором субстрата, фермент будет выходить из нее вместе со связанным субстратом (пик на рис. 4.29), а далее на хроматограмме будет наблюдаться впадина из-за связывания соответствующего количества субстрата проходящим ферментом. Если при прохождении фермента через колонку достигается равновесие, то площадь пика, отвечающего связанному субстрату, будет равна площади впадины; следовательно, в том случае, когда трудно определить количество связанного субстрата, его можно установить по площади впадины. Был также предложен аналогичный метод определения количества связанного субстрата с помощью ультрацентрифугирования [1869a].

Наряду с прямыми методами для исследования связывания субстрата в ряде случаев можно использовать методы, основанные на регистрации изменения свойств либо субстрата, либо фермента (при связывании субстрата). Так, было показано, что

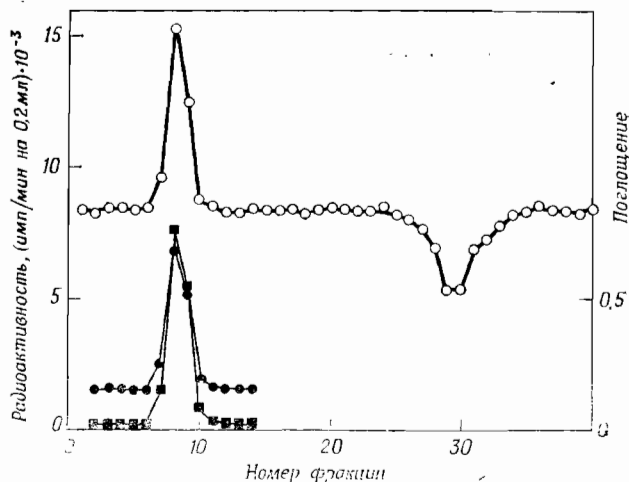


Рис. 4.29. Определение связывания радиоактивного АМР с фруктозобисфосфатазой (КФ 3.1.3.11) с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 [3248]. Колонка уравновешена при 30 °C 10 мкМ АТР [4000 имп/(мин · нмоль)] при рН 7,2. Через колонку пропускали 0,5 мл раствора фермента (2,9 мг/мл). ○ радиоактивность, ● поглощение при 260 нм, ■ поглощение при 280 нм,

спектр поглощения NAD изменяется при связывании с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой (КФ 1.2.1.12) [3797]; при связывании с некоторыми дегидрогеназами изменяется флуоресценция NADH (см., например, [516]). Аналогичным образом за связыванием субстрата можно следить по изменению таких свойств фермента, как флуоресценция [4836] или дисперсия оптического вращения [4751]. В случае ферментов, имеющих два или больше субстратсвязывающих участков, необходимо быть уверенным, что изменение данного показателя пропорционально степени насыщения в расчете на все связывающие участки, поскольку такое соотношение может не всегда выполняться [1994].

При использовании для определения связывания прямых методов необходимо остановить реакцию на стадии образования фермент-субстратного комплекса. Следовательно, одностратную реакцию типа (4.13) таким простым способом изучать нельзя; в этом случае, однако, можно использовать нереакционноспособный конкурентный ингибитор. Для двухсубстратных же реакций можно изучать связывание того или иного субстрата в зависимости от механизма реакции. Так, если фермент функционирует по неупорядоченному механизму (рис. 4.20), можно изучать связывание любого из субстратов в отсутствие другого, в то время как в случае упорядоченного механизма, например типа (4.114) или (4.120), связывание А можно исследовать в отсутствие В, однако В не будет связываться в отсутствие А, если только не образуется тупиковый комплекс. Ферменты, катализирующие двухстадийный перенос, нельзя исследовать этим простым методом, поскольку фермент способен реагировать с одним субстратом в отсутствие другого.

Для системы типа (4.191) в предположении, что концентрация фермента значительно меньше s , можно записать

$$K_s = \frac{(e - x)s}{x}, \quad (4.192)$$

где x — концентрация комплекса ES, а s и e — концентрации свободных фермента и субстрата соответственно. После преобразования получим

$$x = \frac{e}{1 + \frac{K_s}{s}}. \quad (4.193)$$

Это уравнение имеет такой же вид, как и обычное уравнение Михаэлиса (4.18), и указывает на гиперболическую зависимость x от s . Проведя определения связывания S при ряде концент-

раций, можно, следовательно, рассчитать K_s , используя обратную форму этого уравнения:

$$\frac{1}{x} = \frac{K_s}{e} \frac{1}{s} + \frac{1}{e}. \quad (4.194)$$

Некоторые ферменты имеют более чем один участок связывания; разработаны графические методы определения числа участков связывания, а также K_s . Удобно определить число молекул субстрата, связываемых одной молекулой фермента, как

$$r = \frac{x}{e}. \quad (4.195)$$

Если молекула фермента имеет более чем один участок связывания (например, n), необходимо оперировать концентрацией таких участков (ne), а не концентрацией фермента (e); подставляя ne вместо e и er вместо x в уравнение (4.192), получаем

$$r = n - r \frac{K_s}{s}. \quad (4.196)$$

Следовательно, график зависимости r от r/s будет прямой с наклоном $-K_s$, которая пересекает оси ординат и абсцисс в точках n и n/K_s соответственно. Можно использовать также график зависимости $1/r$ от $1/s$:

$$\frac{1}{r} = \frac{K_s}{n} \frac{1}{s} + \frac{1}{n}. \quad (4.197)$$

График этой функции является прямой с наклоном K_s/n , пересекающей ось ординат в точке $1/n$, а ось абсцисс — в точке $1/K_s$.

Уравнение (4.196) используется чаще других; соответствующий график часто называют графиком Скэтчарда (см. [4010]). На рис. 4.30 приведен такой график для связывания α -нафтилпропионата (конкурентный ингибитор) химотрипсином.

Для фермента, содержащего участки связывания с разным сродством, уравнение (4.193) несколько усложняется. Например, для фермента, содержащего два вида участков, 1 и 2, различающихся сродством к субстрату, имеем

$$r = r_1 + r_2 = \frac{n_1}{1 + \frac{K_{s1}}{s}} + \frac{n_2}{1 + \frac{K_{s2}}{s}}. \quad (4.198)$$

Это уравнение нельзя упростить так, чтобы оно имело вид простой линейной функции; график Скэтчарда для этой системы не будет линейным (см. рис. 4.31). Аналогичное уравнение получается и для системы двух ферментов с различным сродством к субстрату. Как обсуждалось на с. 118—121, экстраполяция ли-

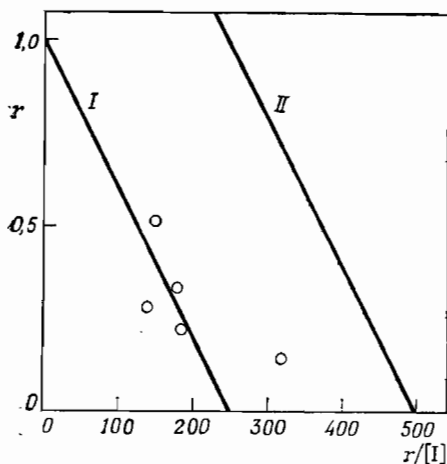


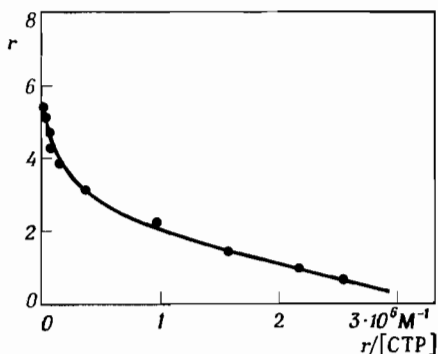
Рис. 4.30. Связывание α -нафтилпропионата с α -химотрипсином [2855]. [I] — концентрация свободного α -нафтилпропионата: I и II — теоретические прямые для $n=1$ и $n=2$ соответственно, $K_i = 4 \cdot 10^{-3}$ М.

нейных участков графиков, аналогичных приведенному на рис. 4.31, в общем случае не позволяет достаточно надежно определить константы диссоциации и число участков связывания.

Следует помнить, что при всех методах определения констант связывания путем измерения концентрации ES, независимо от того, какой подход при этом используется — определение скоростей реакций, спектроскопические или какие-либо другие физические методы — получаемые константы будут равны K_M , если они определяются для реально протекающей реакции, и K_s , если реакция не протекает. Как отмечалось выше, K_s является константой равновесия, позволяющей связать равновесное значение x с e и s , в то время как K_M — это «псевдоравновесная константа», связывающая реальное значение x с e и s в условиях протекания реакции. Чтобы определить K_s одним из рассмотренных выше методов, необходимо, следовательно, создать условия, при которых реакция не идет. Для этого, например, можно ввести в реакционную смесь только один из двух субстратов в случае двухсубстратной реакции, не вводить необходимый для протекания реакции активатор, создать условия, при которых активность фермента мала (например, при pH, далеком от оптимума), использовать вместо субстрата конкурентный ингибитор, который не подвергается превращению (в этом случае определяемая константа будет равна K_i), или воспользоваться каким-либо другим методом.

При исследовании связывания, как нередко и в кинетических исследованиях, не всегда можно считать, что молярная концентрация фермента мала по сравнению с концентрацией субстрата. Так, при изучении очень медленных реакций может оказаться необходимым использовать относительно большие

Рис. 4.31. Связывание СТР с аспартат — карбоамилтрансферазой (КФ 2.1.3.2) [5120]. Эти данные согласуются с предположением о наличии у фермента примерно трех высокоаффинных связывающих участков для СТР ($K_s=1$ мкМ) и примерно трех участков с меньшим сродством ($K_s=210$ мкМ).



концентрации фермента, и если при этом сродство фермента к субстрату очень велико, то придется вводить субстрат в очень малой концентрации. В таких условиях значительная часть субстрата может оказаться связанной с ферментом и концентрация свободного субстрата (s) будет существенно отличаться от суммарной концентрации субстрата (s_t). Вместо уравнения (4.192) в таком случае необходимо использовать следующее:

$$K_s = \frac{(e_t - x)(s_t - x)}{x} = \left(\frac{s_t}{x} - 1 \right) (e_t - x), \quad (4.199)$$

где s_t — суммарная концентрация связанного и свободного субстрата, а e_t — суммарная концентрация фермента. Удобный графический метод, которым можно воспользоваться в подобном случае (а также и в «обычных» условиях), был предложен М. Диксоном [1114]; о нем уже упоминалось на с. 101—102. Метод основан на построении графика зависимости x (или v , которая является мерой x) от s_t (или s в обычных условиях), как показано на рис. 4.12, Е и более детально на рис. 4.32. Следует отметить, что при $s_t = s$ график является равнобочной гиперболой, если же $s_t \neq s$, он будет неравнобочной гиперболой.

На рис. 4.32 приведен график зависимости скорости от концентрации субстрата для случая, когда концентрацией фермента нельзя пренебречь по сравнению с концентрацией субстрата в отличие от рис. 4.12, Е, где величина e_t пренебрежимо мала. Сначала проводят горизонтальную прямую, отвечающую максимальной скорости V , определенной при насыщающей концентрации субстрата. Затем на кривой отмечают точки, лежащие на уровне V/n , где $n=2, 3, 4 \dots$, и проводят через эти точки прямые, проходящие через начало координат, которые пересекают V -прямую в точках $s_2, s_3, s_4 \dots$. (Легко показать, что прямая при $n=1$ является касательной к кривой в начале координат, однако ее трудно провести с достаточной точностью.)

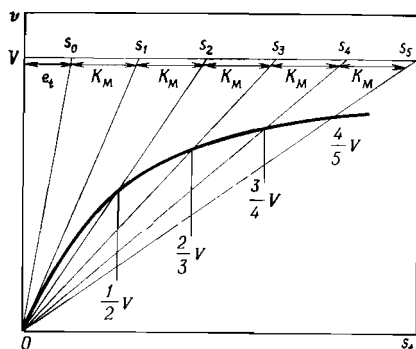


Рис. 4.32. Графический метод Диксона: определение молярной концентрации фермента [1114].

Обозначив через v' и x' координаты точки V/n на кривой, получаем

$$v' = V \frac{n-1}{n}, \quad (4.200)$$

и поскольку $v' = kx'$ и $V = ke_t$, то

$$kx' = ke_t \frac{n-1}{n} \quad \text{или} \quad e_t - x' = \frac{e_t}{n}. \quad (4.201)$$

Подставляя в (4.199), получаем

$$K_M = \left(\frac{s'_t}{e_t} \cdot \frac{n}{n-1} - 1 \right) \frac{e_t}{n} = \frac{s'_t}{n-1} - \frac{e_t}{n}, \quad (4.202)$$

где s'_t — величина s_t в точке V/n кривой. Если через s_n обозначить величину s_t в точке пересечения n -прямой с V -прямой (опустив штрих), то из (4.200), используя свойства подобных треугольников, находим

$$s_n = \frac{n}{n-1} s'_t. \quad (4.203)$$

Подставляя в (4.202), получаем

$$K_M = \frac{s_n}{n} - \frac{e_t}{n}, \quad (4.204)$$

$$s_n = nK_M + e_t. \quad (4.205)$$

Расстояние между двумя соседними точками пересечения будет равно

$$s_n - s_{n-1} = K_M. \quad (4.206)$$

Следовательно, все расстояния между точками пересечения с V -прямой равны и соответствуют значению K_M в единицах, отложенных по оси абсцисс.

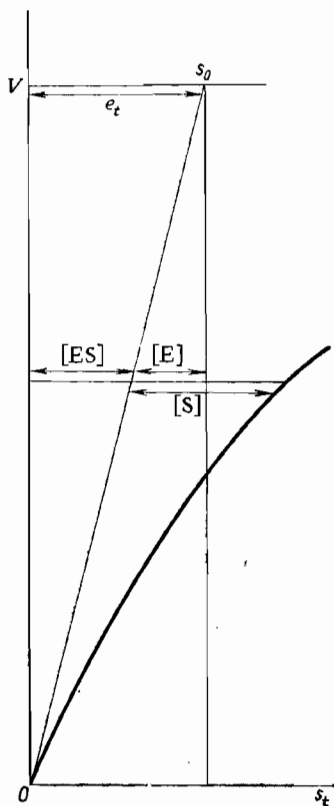


Рис. 4.33. Метод определения концентраций компонентов для любой точки графика зависимости скорости от концентрации [1114].

Точность метода зависит главным образом от того, на правильном ли уровне проведена V -прямая. Хорошим контролем при этом является постоянство расстояний между соседними точками пересечения: если прямая проведена выше, чем следует, интервалы будут увеличиваться в направлении слева направо, если же она проведена ниже, то интервалы будут уменьшаться в этом направлении.

Отложив расстояние, равное K_m , влево от s_1 , мы получим точку s_0 ; уравнение (4.205) показывает, что эта точка соответствует полной концентрации фермента в соответствующих единицах. Если концентрация фермента пренебрежимо мала по сравнению с концентрацией субстрата (обычная предпосылка при выведении кинетических уравнений), то s_0 -прямая совпадает с осью ординат, как на рис. 4.12, E . С другой стороны, если e_t достаточно велика, можно довольно просто определить концентрации различных компонентов системы (полную концентрацию фермента, концентрацию свободного фермента, полную концентрацию субстрата, концентрацию свободного субстрата,

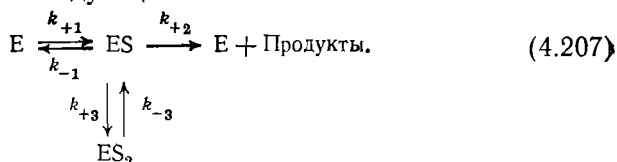
концентрацию фермент-субстратного комплекса) для любой точки кривой; для этого достаточно провести горизонтальную прямую влево от соответствующей точки. Эта процедура проиллюстрирована на рис. 4.33, где приведена начальная часть графика рис. 4.32 в увеличенном масштабе. Принцип расчета становится ясным, если учесть, что v пропорциональна концентрации ES . Длины всех приведенных отрезков отвечают концентрациям соответствующих компонентов.

Ингибирование высокими концентрациями субстрата

а. Односубстратные реакции

Довольно часто ферментативные реакции, подчиняясь закону Михаэлиса при низких концентрациях субстрата, замедляются при высоких его концентрациях. Подобное явление может быть обусловлено разными причинами.

1. Исследование специфичности ферментов дает основание предполагать, что многие ферменты имеют несколько химических групп, каждая из которых взаимодействует с определенной частью молекулы субстрата (рис. 10.23). В эффективном фермент-субстратном комплексе молекула субстрата контактирует со всеми этими группами; однако можно представить себе образование неэффективного комплекса, в котором одни связывающие группы взаимодействуют с данной молекулой субстрата, а другие — со следующей молекулой. При высоких концентрациях субстрата, когда большое число молекул последнего окружает фермент, шансы на образование неэффективного комплекса (в котором к активному центру фермента присоединены две или несколько молекул субстрата) увеличиваются. Такая возможность представлена следующей системой:



Впервые эта система была проанализирована Холдейном [1749, с. 83] в предположении, что субстрат связывается в равновесных условиях. Анализ системы (4.207) как для стационарных, так и для равновесных условий приводит к одному и тому же уравнению, а именно:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s} + \frac{s}{K_I s}}, \quad (4.208)$$

где константа K_M , как обычно, равна k_{-1}/k_{+1} в равновесии и

$(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ в стационарных условиях; K_i^s в обоих случаях равна k_{-3}/k_{+3} .

Используя относительную концентрацию $\varphi = v/V$ и введя для удобства «относительную константу ингибирования» r , определяемую как

$$r = \frac{K_i^s}{K_M}, \quad (4.209)$$

получаем

$$\varphi = \frac{1}{1 + \frac{1}{\sigma} + \frac{\sigma}{r}}. \quad (4.210)$$

На рис. 4.34 это стандартное уравнение представлено графически различными способами, причем величина r произвольно принята равной 100, что согласуется, однако, с экспериментально полученным значением r для реакции, в ходе которой карбоксилэстераза печени (КФ 3.1.1.1) катализирует превращение этилового эфира миндальной кислоты [269]. Необходимо отметить, что, хотя величины K существенно отличаются друг от друга, определяемая максимальное значение φ значительно меньше 1; другими словами, v начинает уменьшаться, так и не достигнув V . Следовательно, попытки рассчитать K_M по графику рис. 4.34, А или 4.34, Б дали бы ошибочные результаты, если принять экспериментально определяемую максимальную скорость за V . График, в котором по обеим осям отложены обратные величины (рис. 4.34, В), позволяет избежать этой ошибки, так как здесь удачно используются данные для низких концентраций субстрата, и в результате большая часть кривой лежит в области, в которой выполняется уравнение Михаэлиса. Истинное значение $1/V$ можно найти по экспериментальным данным с помощью графика, построенного в обратных координатах, так как этот график пересекает вертикальную ось при $1/\varphi = 1$. Используя это значение V , можно определить r по графику А или Б, как это показано на рис. 4.34. Наибольшая относительная скорость $\sqrt{r}/(2 + \sqrt{r})$ достигается при концентрации субстрата, равной $\sqrt{K_M K_i^s}$, что соответствует относительной концентрации, равной $\sqrt{r}$. Кривая, построенная в полулогарифмическом масштабе (рис. 4.34, Б), симметрична относительно этой величины. r можно найти непосредственно из графика зависимости $1/\varphi$ от σ (как это показано на рис. 4.34, Г) путем продолжения прямой, полученной при высоких значениях σ , до пересечения с осью абсцисс. Основанием для этого служит то, что при высокой концентрации субстрата величина K_M/s в уравнении (4.208) становится пренебрежимо малой и основное значение приобре-

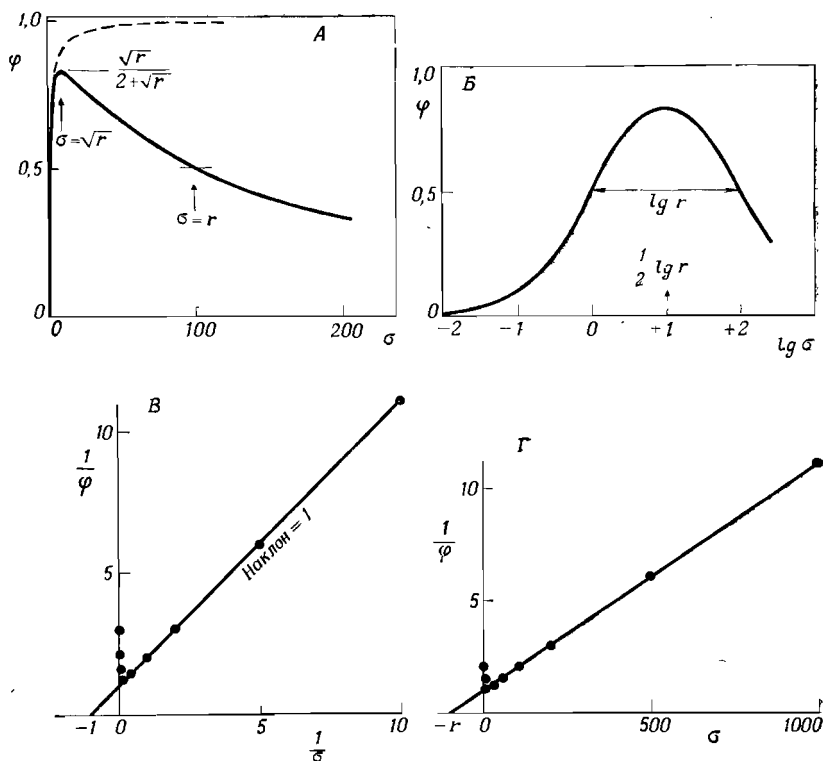


Рис. 4.34. Ингибирование реакции при высокой концентрации субстрата — нормированные кривые, построенные для произвольно выбранной величины $rg = K_i s^2 / K_m = 100$ (рис. 4.11). А. Зависимость φ от σ (пунктирная линия показывает ход кривой в отсутствие ингибирования избытком субстрата). Б. Зависимость φ от $\lg \sigma$. Следует обратить внимание на то, что при изменении знака левая ветвь кривой соответствует графику на рис. 4.11, Б. Кривая симметрична относительно величины $\sigma = \sqrt{r}$, и при $\varphi = 0,5$ ширина равна $\lg r$, следовательно, абсцисса точки перегиба левой ветви кривой равна нулю. В. Зависимость $1/\varphi$ от $1/\sigma$. Приведенные на графике теоретические точки на значительном протяжении ложатся на прямую с наклоном, равным единице (см. рис. 4.11, А). Небольшой изгиб кривой вверх при малых значениях $1/\sigma$ отражает ингибирование реакции избытком субстрата. Г. Зависимость $1/\varphi$ от σ . Точки, лежащие на прямой, соответствуют условиям ингибирования реакции избытком субстрата; те же точки, которые на рис. 4.34, В лежат на прямой, теперь расположены на загибающейся вверх части кривой, т. е. при малых значениях σ .

тает величина, определяющая ингибирование. Подставив в уравнение V вместо ke , получим

$$v = \frac{VK_i s}{s + K_i s}, \quad (4.211)$$

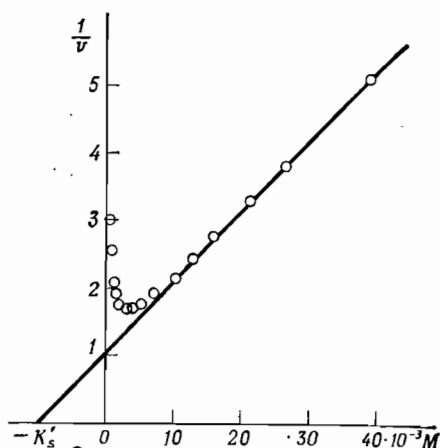


Рис. 4.35. Определение величины K_i^s по ингибированию реакции избытком субстрата [3305]. Гидролиз этилбутирата карбоксилэстеразой (К Ф 3.1.1.1.) из печени овцы.

или в обратной форме

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{s}{K_i^s V}. \quad (4.212)$$

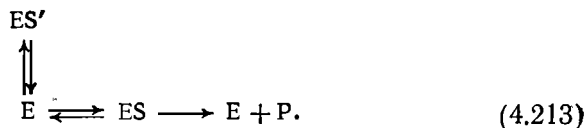
На рис. 4.35 изображен график зависимости $1/v$ от s для случая действия карбоксилэстеразы печени при высоких концентрациях субстрата, построенный по данным Мюррея [3305]. Точка пересечения данной прямой с осью абсцисс дает значение K_i^s , равное 0,010 М. Значение, полученное Мюрреем по тем же данным, но более трудоемким путем, равно 0,0097 М. Когда ферментативная реакция протекает в две стадии (с. 274), например когда эстераза вначале ацилируется с освобождением спирта, входившего в состав субстрата, а затем деацилируется, вторая молекула субстрата, взаимодействуя со связывающим спирт участком ацилированного фермента, может ингибировать деацилирование. Субстратное ингибирование ацетилхолинэстеразы обусловлено, по-видимому, подобного рода взаимодействием [2615].

На графике зависимости $1/v$ от s (рис. 4.35) линейный участок справа соответствует области, в которой член K_M/s , входящий в уравнение (4.208), пренебрежимо мал, а участок вдоль вертикальной оси соответствует области, в которой мал член s/K_i^s . Хотя рассмотренный график имеет почти такой же вид, как график зависимости $1/v$ от $1/s$, однако две его части как бы меняются местами, так что области, в которой член s/K_i^s пренебрежимо мал, отвечает прямая в правой части графика, в то время как область, в которой мал член K_M/s , располагается вдоль вертикальной оси.

Уравнение (4.208), как и следовало ожидать, по форме весьма близко к уравнению, описывающему влияние рН на актив-

ность фермента, когда присоединение к ферменту одного водородного иона приводит к появлению активности, а присоединение второго водородного иона «выключает» ее [см., например, уравнения (4.228) и (4.256), а также среднюю кривую на рис. 4.46]; если построить график зависимости v от $\lg s$, то мы получим обычную колоколообразную кривую с симметричным пиком при оптимальной концентрации субстрата.

Уэтли [5057, с. 51] предположил, что, поскольку ингибирование высокой концентрацией субстрата обусловлено связыванием двух молекул субстрата в неправильной по отношению к активному центру фермента ориентации, возможно, что некоторая доля связанных молекул субстрата ориентирована неправильно даже и при низкой концентрации субстрата, когда не наблюдается субстратного ингибирования. Схема реакции при ингибировании в результате неправильного связывания следующая:



ES' — комплекс, в котором субстрат ориентирован неправильно. Такая схема является фактически случаем конкурентного ингибирования, когда субстрат конкурирует сам с собой (см. гл. 8). Уравнение скорости для стационарных условий имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s} \left(1 + \frac{s}{K_i s} \right)} = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s} + \frac{1}{r}}. \quad (4.214)$$

На рис. 4.36 график двойных обратных величин для системы, подчиняющейся этому уравнению, сопоставлен с графиком для

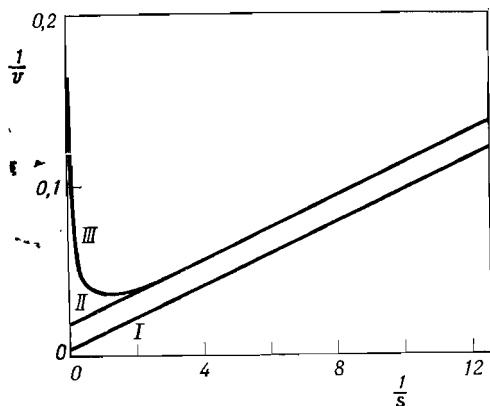


Рис. 4.36. Теоретические кривые для систем, подчиняющихся уравнениям (4.11) (кривая I), (4.214) (кривая II), (4.216) (кривая III). $K_M = K_i s = 1,0$; $V = 100$.

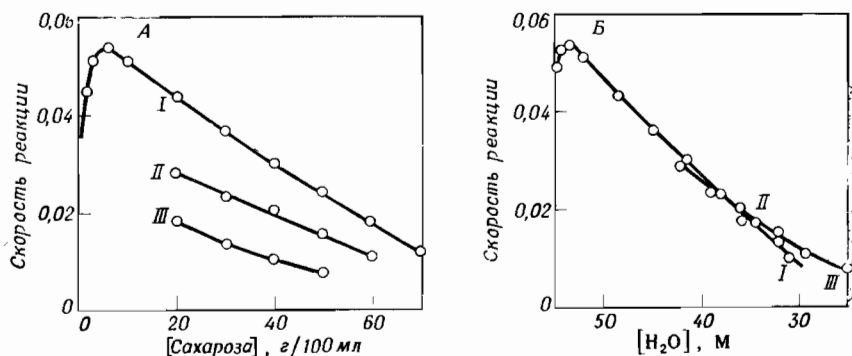
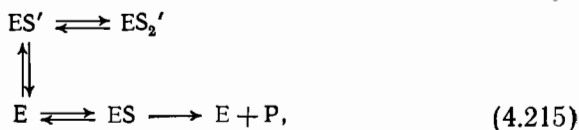


Рис. 4.37. Гидролитическое действие дрожжевой β-D-фруктофуранозидазы (КФ 3.2.1.26) в условиях высокой концентрации сахарозы — влияние уменьшения концентрации воды [3390]. А. Скорость реакции как функция концентрации сахарозы. Б. Скорость реакции как функция концентрации воды. I — раствор сахарозы; II — то же +10%-ный спирт; III — то же +20%-ный спирт.

системы, в которой не происходит неправильного связывания. Ситуация, описываемая этим уравнением, не приводит к типичному ингибированию высокими концентрациями субстрата; если, однако, при неправильном связывании субстрата некоторые связывающие участки фермента остаются свободными, то с образовавшимся комплексом может связываться вторая молекула субстрата



и уравнение стационарной скорости имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s} + \frac{1}{r} + \frac{s}{K_i s'}}, \quad (4.216)$$

где $K_i s'$ — константа диссоциации для реакции $ES' = E + S$, а $K_i s''$ является более сложной величиной, чем простая константа диссоциации. График двойных обратных величин для ферментов, подчиняющихся этой схеме, приведен на рис. 4.36.

2. Поскольку все ферменты функционируют в водной среде, то при очень высокой концентрации субстрата будет уменьшаться концентрация воды, что может снижать скорость реакции, особенно если вода является одним из реагентов. Такой пример приведен на рис. 4.37; ингибирование дрожжевой β-D-фруктофуранозидазы (КФ 3.2.1.26) в условиях высоких концентраций

сахарозы связывают с уменьшением концентрации воды [3390]. Было показано, что в широком диапазоне концентраций сахарозы скорость является функцией концентрации воды, при этом не имеет значения, чем вызвано уменьшение концентрации воды — добавлением сахарозы или спирта (см. рис. 4.37, Б). Следует указать на возникшее в этих экспериментах осложнение: в присутствии спирта фермент наряду с гидролизом катализирует перенос остатков фруктозы на спирт, что приводит к кажущемуся снижению скорости гидролиза [222]; однако ингибирование высокой концентрацией сахарозы не может быть обусловлено переносом фруктозы на сахарозу [221].

3. На рис. 4.38 приведена зависимость скорости восстановления метиленового синего от концентрации гипоксантина в присутствии ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2) [1120]. Ингибирование при высокой концентрации субстрата является результатом конкуренции с метиленовым синим; на это указывает тот факт, что эффективное сродство к красителю уменьшается в 20 раз при увеличении концентрации субстрата от А до В. Это частный случай конкурентного ингибирования, при котором один субстрат является конкурентным ингибитором другого. Аналогичным примером может служить действие полученной из змеиного яда оксидазы L-аминокислот (КФ 1.4.3.2) [4301]. Этот фермент был детально изучен, причем в качестве субстрата использовался лейцин, а в качестве акцептора водорода — метиленовый синий [1119]. На рис. 4.39 изображена зависимость $1/v$ от концентрации лейцина при различных концентрациях метиленового синего.

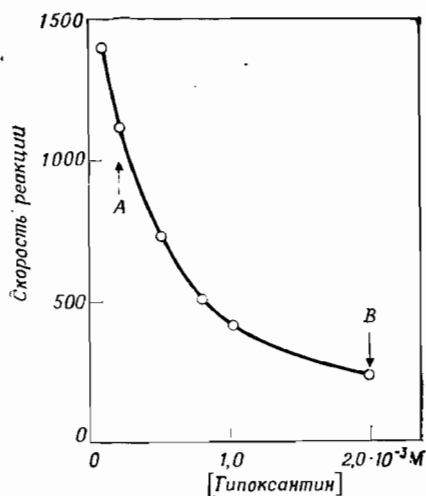


Рис. 4.38. Ингибирование реакции при повышении концентрации субстрата [1120]. Фермент — ксантиноксидаза (КФ 1.2.3.2).

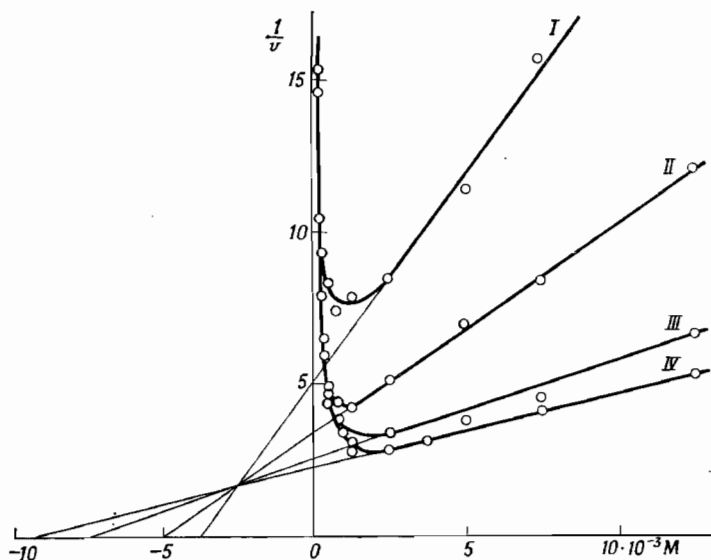


Рис. 4.39. Конкурентное ингибирование избытком субстрата [1119]. Окисление лейцина метиленовым синим под действием оксидазы L-аминокислот из змеиного яда (КФ 1.4.3.2). Кривые построены для различных концентраций метиленового синего: I — $0,344 \cdot 10^{-4}$ М; II — $0,67 \cdot 10^{-4}$ М; III — $1,34 \cdot 10^{-4}$ М; IV — $2,67 \cdot 10^{-4}$ М.

При сравнении этого графика с графиком на рис. 8.3, А (см. также рис. 4.34, Г и 4.35) становится очевидным, что лейцин действует как ингибитор, конкурирующий с метиленовым синим. Точка пересечения кривых (соответствующая $-K_i$ в случае обычного ингибитора) характеризует величину константы диссоциации субстрата, когда он действует как ингибитор.

4. Кажущееся ингибирование при высокой концентрации субстрата наблюдается при действии неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) [239]. В реакции участвует дополнительный фактор, Mg, который является необходимым для протекания реакции активатором. Рис. 4.40 иллюстрирует влияние различных концентраций пирофосфата на величину относительной скорости ϕ при постоянной концентрации Mg, равной $0,004$ М. Концентрации пирофосфата, вызывающие ингибирование, значительно превышают те, которые необходимы для насыщения фермента субстратом, так что максимальная скорость наблюдается в широком диапазоне концентраций пирофосфата.

Для этого случая ингибирования были предложены два разных объяснения; оба они исходят из предположения об образовании комплекса магний — пирофосфат. Первое объяснение [1911] состоит в том, что избыток субстрата связывает магний и

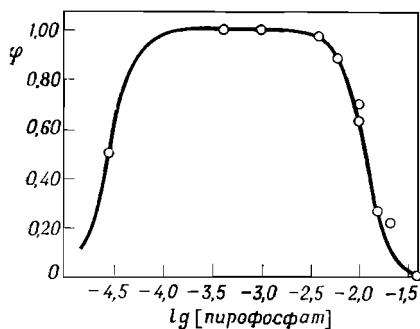


Рис. 4.40. Зависимость скорости реакции, катализируемой неорганической пирофосфатазой (К Ф 3.6.1.1), от концентрации субстрата в присутствии 0,004 М MgCl_2 [239].

таким образом понижает эффективную концентрацию активатора фермента, в результате чего скорость реакции уменьшается; когда же концентрация свободных ионов Mg^{2+} падает до нуля, фермент становится неактивным. Другое объяснение [464] связано с допущением (в пользу которого говорят некоторые данные), что истинным субстратом фермента служит ион $(\text{MgP}_2\text{O}_7)^{2-}$, а не свободный пирофосфат. Полагают, что ингибирование является следствием конкуренции пирофосфата с истинным субстратом. Во всяком случае, рассматриваемое влияние высоких концентраций пирофосфата нельзя считать истинным ингибированием, так как если изменять соотношение концентраций Mg и пирофосфата таким образом, чтобы удерживать пирофосфат в составе комплекса с магнием, то ингибирование оказывается значительно меньшим (рис. 4.41). При работе с ферментами, активность которых зависит от активатора, как в только что рассмотренном примере, следует учитывать вероятность того, что субстрат будет конкурировать с активатором за взаимодействие с ферментом и, следовательно, при высоких концентрациях субстрата будет наблюдаться ингибирование [500].

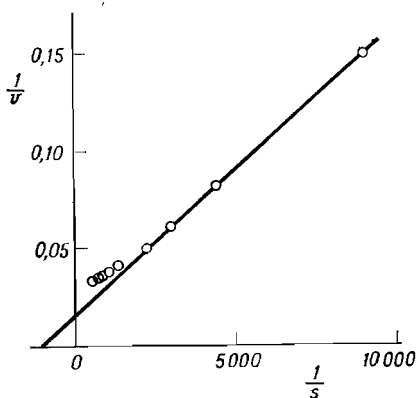


Рис. 4.41. График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (построенный по методу Лайнуивера — Бэрка) для действия неорганической пирофосфатазы (К Ф 3.6.1.1) в условиях постоянной величины отношения молярных концентраций $\text{MgCl}_2 / \text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 3,8$ [464].

5. К значительному ингибированию в условиях высокой концентрации субстрата может привести присутствие в субстратах примеси, действующей как смешанный или бесконкурентный ингибитор [804, 2061]. Эти эффекты более подробно обсуждаются в гл. 8.

6. Ингибирование высокими концентрациями субстрата в двухсубстратных реакциях

Ингибирование избытком субстрата в этих реакциях может проявляться таким же образом, как в односубстратных реакциях, и график зависимости $1/v$ от обратной концентрации ингибирующего субстрата имеет такую же форму, как и в простом случае для односубстратной реакции. Однако для двухсубстратных реакций принято строить графики двойных обратных величин при изменяющейся концентрации одного субстрата и ряде фиксированных концентраций второго субстрата, и ингибирование при высоких концентрациях этого второго субстрата может проявляться в изменении характерного вида этих графиков.

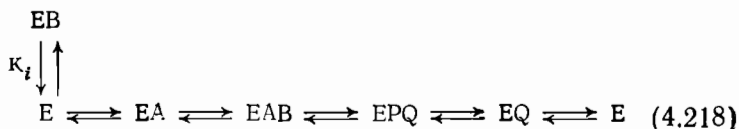
Дальдиль [956] проанализировал несколько возможных типов ингибирования субстратом и показал, что, как и в случае простого ингибирования, их можно разделить на конкурентное, бесконкурентное и смешанное ингибирование (см. гл. 8). Если при высокой концентрации второго субстрата наблюдается конкурентное ингибирование, то у графиков двойных обратных величин изменяется только наклон; если ингибирование бесконкурентное, то изменяется только длина отрезков, отсекаемых от оси $1/v$; при смешанном ингибировании изменяются и наклоны, и длины отрезков. Наряду с такими простыми может встретиться случай «частичного» ингибирования высокой концентрацией субстрата, при котором в результате связывания ингибирующего субстрата начинает функционировать менее эффективный альтернативный путь реакции (см. гл. 8). При частичном субстратном ингибировании вторичные графики зависимости наклонов или длин отрезков (получаемых из графиков двойных обратных величин при высокой концентрации ингибирующего второго субстрата) от концентрации второго субстрата не являются линейными.

1. *Конкурентное ингибирование высокими концентрациями субстрата.* Оно наблюдается в случае, когда связывание ингибирующего субстрата препятствует связыванию другого субстрата. Так, в случае двухсубстратной реакции



связывание с ферментом второй молекулы В препятствует связыванию А. Для того чтобы при этом ингибирование было кон-

курентным, ингибирующая молекула В должна связываться с той же формой фермента и с тем же участком, что и молекула А. Дальциль [956] рассмотрел ингибирование высокими концентрациями субстрата при упорядоченном механизме. Для системы



связывание молекулы субстрата В со свободным ферментом рассматривается как конкурирующее со связыванием субстрата А. Уравнение скорости в стационарных условиях для этой системы или для системы, у которой концентрацией тройных комплексов можно пренебречь (например, в случае механизма Теорелла — Чанса), имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} \left(1 + \frac{b}{K_i}\right) + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{b}{K_i}\right)}. \quad (4.219)$$

Оно сходно с уравнением для упорядоченной системы в присутствии ингибитора, конкурентного по отношению к А; отличие состоит в том, что в рассматриваемом случае ингибитор является одним из субстратов. Следует отметить, что при относительно небольшой концентрации В ($b/K_i \ll 1$) это уравнение упрощается до (4.86), и, следовательно, графики двойных обратных величин будут такими же, как для системы (4.86). При высоких концентрациях В графики зависимости $1/v$ от $1/b$ будут отклоняться вверх, что характерно для ингибирования высокими концентрациями субстрата. Графики в координатах $\{1/a; 1/v\}$ линейны при всех концентрациях В, однако их наклоны не являются линейной функцией $1/b$. Таким образом, при низких концентрациях В графики пересекаются в одной точке слева от оси $1/v$; при высоких концентрациях В этого не наблюдается (рис. 4.42, А).

Конкурентное ингибирование высокими концентрациями субстрата обычно имеет место в системах с двухстадийным переносом. Например, в случае системы (4.121) при не слишком различающихся Е и Е' субстрат, связывающийся с Е, будет, скорее всего, связываться в какой-то степени также с Е'. Следовательно, при высоких концентрациях субстрат А окажется ингибитором реакции, поскольку он будет связываться не только с Е, но и с Е'. Таким образом, при высоких концентрациях А будет выступать в роли конкурентного ингибитора связыва-

ния В с ферментом. Если ингибирование является истинно конкурентным, то при насыщающих концентрациях В оно не будет наблюдаться; следовательно, длины отрезков, отсекаемых от оси $1/v$ графиками зависимости $1/v$ от $1/b$ (это соответствует области насыщающей концентрации В) при разных ингибирующих концентрациях А будут одинаковыми. В то же время наклон этих графиков будет увеличиваться при высоких концентрациях А, и, следовательно, образуется семейство кривых, параллельных при низких концентрациях А и расходящихся при более высоких концентрациях этого субстрата; при очень высоких концентрациях А наблюдается тенденция к пересечению кривых в одной точке, как в случае простого конкурентного ингибирования (см. рис. 4.42, Б). График зависимости наклонов линейных участков кривых от a будет линейным при высоких концентрациях А; это позволяет определить обычным путем ингибиторную константу для А (K_i^A).

Поведение такого типа наблюдалось в случае нуклеозид-дифосфат — киназы (КФ 2.7.4.6) и оксиметилглутарил-СоА — синтазы (КФ 4.1.3.5) [3151]; оба этих фермента функционируют по механизму двухстадийного переноса. Конкурентным ингибитором для них является каждый из субстратов.

Конкурентное ингибирование высокими концентрациями субстрата может наблюдаться и в неупорядоченных системах, когда вторая молекула А, образуя комплекс ЕАА, конкурирует с В. Результат такого ингибирования будет аналогичен таковому для упорядоченных систем; в качестве ингибиторов могут выступать оба субстрата.

2. Бесконкурентное ингибирование высокими концентрациями субстрата. Дальциль [956] рассмотрел случай, когда второй

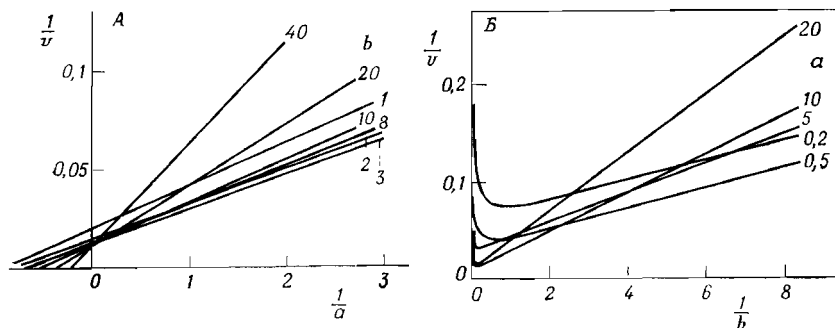
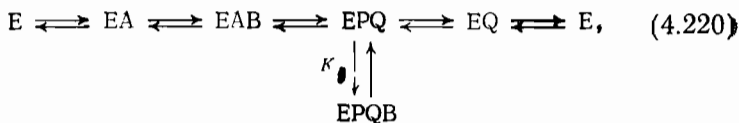
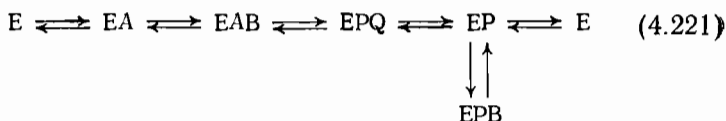


Рис. 4.42. Конкурентное ингибирование субстратом. А. Кривые, построенные по уравнению (4.219), для упорядоченной системы (4.218). Б. Кривые для системы с двухстадийным переносом (4.121) в случае ингибирования обоими субстратами. $K_M^A = K_M^B = 1,0$; $K_i = 10$; $V = 100$. $K_s^A = 1$ (для А).

субстрат (В) способен связываться с тройным комплексом в упорядоченной системе



а Келланд [803] проанализировал, по-видимому, более часто встречающийся случай, когда В может связываться с двойным комплексом:



Учитывая сказанное выше (с. 150—152) о характере ингибирования продуктом в таких системах, можно сделать вывод, что в обеих системах будет наблюдаться бесконкурентное ингибирование в отношении А, так что уравнение скорости будет иметь вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{b}{K_i'} + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab}}. \quad (4.222)$$

В этом уравнении величина K_i' не равна константе диссоциации ингибирующего субстрата из комплекса EPB — она зависит также от константы скорости образования комплекса EP из тройного комплекса EPQ.

В данном случае на графике зависимости $1/v$ от $1/b$ наблюдается характерное отклонение вверх при больших значениях b . График зависимости $1/v$ от $1/a$ линейен; при высоких концентрациях В длины отрезков, отсекаемых от оси $1/v$, изменятся, а наклоны останутся прежними. Такой график, взятый из работы Келланда, показан на рис. 4.43. Вторичные графики зависимости наклонов от $1/b$ будут линейными в отличие от вторичных графиков зависимости от $1/b$ длин отрезков, отсекаемых от оси $1/v$, при ингибировании высокими концентрациями субстрата.

Бесконкурентное ингибирование высокими концентрациями субстрата наблюдается, например, в случае изоцитратдегидрогеназы (NADP⁺) из сердечной мышцы свиньи (КФ 1.1.1.42); при этом 2-оксоглутарат выступает в роли бесконкурентного ингибитора по отношению и к бикарбонату, и к NADPH (см. [803]).

3. Смешанное ингибирование высокими концентрациями субстрата. Если в упорядоченной системе «второй» субстрат может

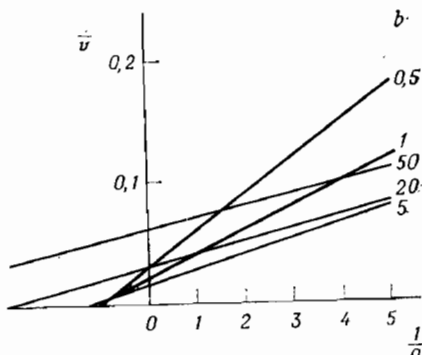


Рис. 4.43. Бесконкурентное ингибирование субстратом. Графики уравнения (4.222) для упорядоченной системы (4.221). Значения констант те же, что и для рис. 4.42.

взаимодействовать как со свободным ферментом, так и с тройным комплексом, то уравнение скорости будет иметь вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{b}{K_i'} + \frac{K_M^A}{a} \left(1 + \frac{b}{K_i'}\right) + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} \left(1 + \frac{b}{K_i'}\right)} \quad (4.223)$$

В этом случае графики зависимости $1/v$ от $1/a$, очевидно, будут линейными при всех концентрациях B , однако ни наклоны прямых, ни длины отсекаемых ими отрезков не будут линейными функциями $1/b$. Как и в случае бесконкурентного ингибирования, K_i' не обязательно является простой константой диссоциации ингибирующего субстрата из тройного (или четверного) комплекса. Дальций [956] отметил, что, поскольку K_i' не является истинной константой диссоциации, в то время как K_i есть истинная константа диссоциации комплекса EB , даже в случае, когда константы диссоциации двух комплексов ингибирующего субстрата с ферментом равны, не будет наблюдаться истинное неконкурентное ингибирование.

Ингибирование смешанного типа при высоких концентрациях субстрата наблюдали в случае алкогольдегидрогеназы печени (КФ 1.1.1.1) [803].

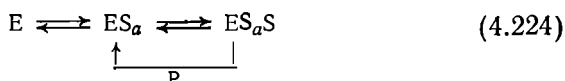
Субстрат, действующий одновременно как активатор фермента

В предыдущем разделе рассматривались случаи, когда субстрат действовал одновременно как ингибитор, однако субстрат может выступать и в роли активатора фермента. Фумаратгидратаза (КФ 4.2.1.2), например, активируется анионами [3010], и так как сами молекулы субстрата являются анионами, то весьма вероятно, что они в дополнение к своей обычной функции субстрата могут действовать и как активаторы фер-

мента. Массей [3012] предположил, что молекулы субстрата связываются с фумаразой не только в активном центре, но и в других участках. Имеется несколько возможных путей взаимодействия активатора с ферментом; этот вопрос обсуждается в гл. 8. Если активатор является также и субстратом, то следует учитывать образование минимум трех комплексов: фермент-субстратного комплекса (ES), комплекса, в котором субстрат связывается как активатор (ES_a), и комплекса, содержащего как активатор, так и субстрат (ES_aS). Взаимодействие фермента с субстратом и активатором может быть упорядоченным или неупорядоченным, оно может осуществляться в равновесных или стационарных условиях. Кроме того, комплекс ES может быть неактивным либо частично активным.

Кинетические уравнения для этих систем сходны с уравнениями для двухсубстратных реакций; во всех случаях в знаменателе уравнения скорости имеется член, содержащий s^2 ; исключение составляет неупорядоченная система в стационарных условиях, для которой показатель степени больше двух (с. 135—137).

Для упорядоченной системы



уравнение скорости для стационарных условий имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s^{S_{M'}}}{s} + \frac{K_s^S K_{M'}^S}{s^2}}, \quad (4.225)$$

где $K_s^{S_{M'}}$ — константа Михаэлиса для S, действующего как субстрат, а K_s^S — кажущаяся константа диссоциации комплекса ES_a (с. 138). Для неупорядоченной равновесной системы уравнение скорости имеет такой же вид, как (4.179); это уравнение обсуждалось в связи с функционированием ферментов, действующих на две молекулы одного субстрата (с. 171).

Таким уравнениям обычно соответствуют нелинейные графики двойных обратных величин. Например, уравнение, обратное (4.225), имеет вид

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_s^{S_{M'}}}{s} \frac{1}{V} + \frac{K_s^S K_{M'}^S}{s^2} \frac{1}{V}. \quad (4.226)$$

При высокой концентрации субстрата последний член становится пренебрежимо малым, особенно если K_s^S относительно невелико, и в этих условиях график приближается к прямой, которой отвечает константа Михаэлиса $K_s^{S_{M'}}$. На рис. 4.44 приведено несколько теоретических кривых, соответствующих

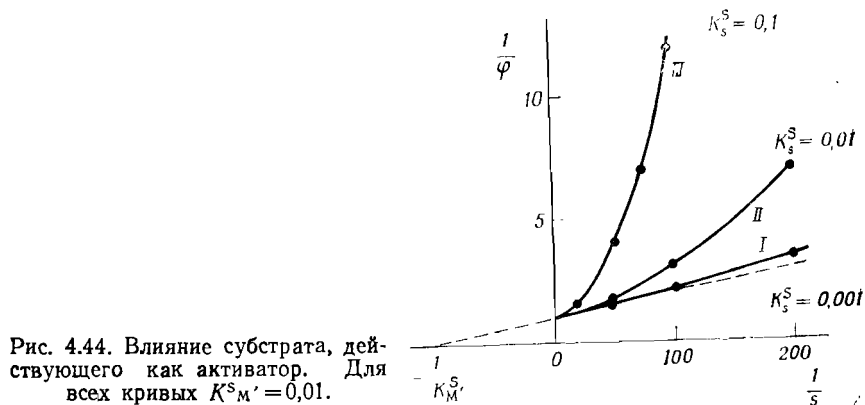


Рис. 4.44. Влияние субстрата, действующего как активатор. Для всех кривых $K_M^S = 0,01$.

зависимости (4.226). Константа Михаэлиса K_M^S произвольно выбрана равной 0,01 для всех кривых. Видно, что все кривые значительно отклоняются от пунктирной прямой, которая построена для данного значения константы Михаэлиса в предположении, что субстрат не активирует фермент.

Можно показать, что все эти кривые при $1/s=0$ имеют такой же наклон, как и пунктирная прямая; однако по мере увеличения $1/s$ они расходятся тем больше, чем больше K_s^S . Если K_s^S мала по сравнению с K_M^S (кривая I, для которой $K_s^S/K_M^S = 0,1$), отклонение от прямой относительно невелико; однако при больших K_s^S (кривые II и III, для которых K_s^S/K_M^S равно 1,0 и 10 соответственно) отклонение может быть весьма значительным, что не позволяет определить константу Михаэлиса.

В другом случае указанием на активацию субстратом может стать отклонение графика двойных обратных величин вниз от прямой. Такая картина может быть обусловлена действием двух ферментов (с. 118—121); если, однако, в системе имеется только один фермент, она может трактоваться как результат связывания ферментом более чем одной молекулы субстрата. Такое поведение фермента более подробно обсуждается в гл. 8.

В. ВЛИЯНИЕ pH

Ферменты, вообще говоря, активны только в определенном интервале pH, и в большинстве случаев для действия каждого фермента имеется определенный оптимум pH. Наличие такого оптимума может иметь несколько причин: 1) истинное обратное влияние pH на скорость реакции V (в условиях, когда фермент насыщен субстратом); 2) влияние pH на сродство фермента к субстрату (в этом случае падение активности по обе стороны от оптимума pH будет следствием понижения насыщения фермента субстратом в силу понижения сродства); 3) влияние

pH на стабильность фермента, который может необратимо инактивироваться при pH по одну или по обе стороны от оптимума. Перечисленные факторы могут действовать и в комбинации друг с другом; например, падение активности по одну сторону от оптимума pH может быть результатом уменьшения сродства фермента к субстрату, а по другую — результатом инактивации фермента.

Действие рассматриваемых факторов можно легко различить экспериментальным путем. Наличие необратимой инактивации устанавливают, сначала инкубируя фермент в растворах с различными значениями pH , а затем определяя его активность по возвращении pH к определенному значению. На рис. 4.45 приведены результаты опытов такого рода для моноаминоксидазы (КФ 1.4.3.4), из которых видно, что падение активности в щелочной области (по отношению к оптимуму pH) вызвано инактивацией фермента. Так как степень инактивации фермента со временем увеличивается, то и форма кривой, и положение кажущегося оптимума pH зависят от времени, в течение которого проводятся наблюдения; если бы можно было определить истинные начальные скорости сразу же после приведения раствора фермента к определенному значению pH , то тогда фактор инактивации был бы полностью исключен. Наблюдаемый оптимум pH аналогичен ложному «температурному оптимуму», который мы рассмотрим ниже.

Влияние pH на сродство фермента к субстрату можно исключить, если работать с такими концентрациями субстрата, которые достаточно высоки, чтобы насытить фермент при всех изучаемых значениях pH . Так как величина K_m может значительно изменяться при сдвиге pH , то мы отнюдь не вправе считать, что концентрация субстрата, достаточная для насы-

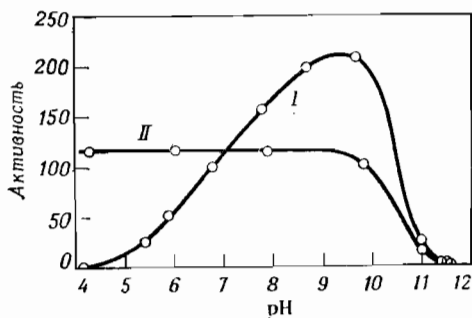


Рис. 4.45. Влияние pH на активность моноаминоксидазы (флавинсодержащей) (КФ 1.4.3.4) [1784]. I — активность при pH , указанных на оси абсцисс, II — активность при pH 7,3 после инкубации в течение 5 мин при pH , указанных на оси абсцисс.

щения фермента при одном из значений рН, будет достаточной для его насыщения и при других значениях рН. Чтобы определить влияние изменений собственно рН на активность фермента, необходимо получить достаточное количество данных по зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при каждом значении рН, а затем с помощью одного из графических методов, показанных на рис. 4.12, найти значения V и K_m . Большинство приводимых в литературе кривых, характеризующих влияние рН на активность фермента, представляет собой сложные кривые, форма которых зависит частично от изменений V , а частично от изменений K_m . Кривые, иллюстрирующие влияние изменения рН на V и K_m , приведены ниже.

Влияние рН на активность ферментов, подобно всем другим видам влияния рН, осуществляется путем изменения в состоянии ионизации отдельных компонентов системы при изменении рН. Такие изменения могут происходить в свободном ферменте, в фермент-субстратном комплексе или субстрате. Поскольку ферменты представляют собой белки, молекулы которых содержат большое число ионизирующихся групп, то они могут находиться в виде целого ряда различных ионных форм, причем распределение всего количества фермента между этими ионными формами зависит от рН и от констант ионизации различных групп. Поскольку, однако, каталитическая активность наблюдается обычно в относительно небольшом интервале значений рН, можно думать, что только одна из ионных форм фермента (или, точнее, его активного центра) каталитически активна, как это и предполагали Михаэлис и Дэвидсон [3148] еще в 1911 г. Имеется ряд соображений в пользу того, что ионизация тех групп в ферменте, которые удалены от активного центра, либо оказывает незначительное влияние, либо совсем не оказывает влияния на каталитическую активность; в то же время состояние ионизации групп, расположенных в самом активном центре или около него, очень существенно.

Если фермент активен только в одном состоянии ионизации, то из этого (в первом приближении) следует, что активность его будет в значительной мере определяться ионизацией двух особых групп в активном центре или вблизи него, а именно тех групп, которые в первую очередь ионизируются (или, наоборот, деионизируются) при сдвиге рН в кислую или щелочную сторону от оптимума. Эти группы иногда называют кислой и основной группами фермента. Мы не будем рассматривать другие процессы ионизации, которые могут протекать при сдвиге рН до значений, еще более удаленных от оптимума, так как эти процессы влияют на состояние уже неактивных форм фермента. Правда, молекула фермента может содержать несколько одинаковых групп, которые будут ионизироваться одновременно, но присутствие в активном центре более одной такой груп-

пы маловероятно. В силу рассмотренных выше обстоятельств влияние рН на скорость ферментативных реакций обсуждают часто с учетом только двух ионизирующихся групп, используя при этом уравнения, применимые к двухосновным кислотам или к простым амфолитам, хотя, без сомнения, такой подход является слишком упрощенным.

рН-функции Михаэлиса

Чтобы облегчить дальнейшее обсуждение вопроса о влиянии рН на активность ферментов и упростить уравнения, рассмотрим вначале свойства некоторых рН-функций, которые играют доминирующую роль в рассматриваемом вопросе. Михаэлис в 1913 г. первым обратил внимание на важность этих функций [3147, с. 48]. рН-функции Михаэлиса определяются следующим образом:

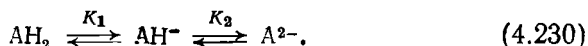
$$f = 1 + \frac{K_1}{H} + \frac{K_1 K_2}{H^2}, \quad (4.227)$$

$$f^- = 1 + \frac{H}{K_1} + \frac{K_2}{H}, \quad (4.228)$$

$$f^{2-} = 1 + \frac{H}{K_2} + \frac{H^2}{K_1 K_2}, \quad (4.229)$$

где H — концентрация ионов водорода¹.

Эти функции описывают поведение веществ, ионизация которых осуществляется в две стадии с константами K_1 и K_2 , например поведение симметричной двухосновной кислоты $АН_2$, такой, как янтарная кислота, которая существует в трех формах:



Следует помнить, что K_1 и K_2 характеризуют первую и вторую стадии ионизации молекулы и определяются уравнениями (4.232); они не являются константами ионизации отдельных карбоксильных групп. Важность этого разграничения станет ясной позже.

¹ Мы будем использовать в этой книге термин «нон водорода», а не такие термины, как «протон», «ион оксония», «ион гидрония», «ион гидроксония» и т. д. Три последних термина относятся к гидратированной форме нона водорода, т. е. к $ОН_3^+$. В химической термодинамике принято не учитывать гидратацию реагирующих веществ; поэтому, хотя в водных растворах нон водорода гидратирован [1758, с. 41], записывая уравнения реакций, в которых участвует этот ион, мы будем использовать символ H^+ , а не $ОН_3^+$.

Для обозначения суммы концентраций всех различных форм данного вещества удобно использовать индекс t ; так, для рассматриваемой системы

$$A_t = [AH_2] + [AH^-] + [A^{2-}]. \quad (4.231)$$

Отсюда, подставляя определения констант K_1 , K_2 ,

$$K_1 = \frac{[AH^-]H}{[AH_2]}, \quad K_2 = \frac{[A^{2-}]H}{[AH^-]} = \frac{[A^{2-}]H^2}{[AH_2]K_1}, \quad (4.232)$$

получаем

$$A_t = [AH_2] \left(1 + \frac{K_1}{H} + \frac{K_1 K_2}{H^2} \right) = [AH_2] \cdot f, \quad (4.233)$$

$$A_t = [AH^-] \cdot f^-, \quad (4.234)$$

$$A_t = [A^{2-}] \cdot f^{2-}. \quad (4.235)$$

Таким образом, количество какой-либо ионной формы вещества находят путем деления всего количества вещества на значение соответствующей рН-функции.

Все три рН-функции взаимосвязаны, и для дальнейшего рассмотрения удобно выразить соотношения между этими функциями и тремя различными формами вещества в следующем виде:

$$\begin{aligned} A_t &= [AH_2] \cdot f = [AH_2] \cdot f^- \frac{K_1}{H} = [AH_2] f^{2-} \frac{K_1 K_2}{H^2} = \\ &= [AH^-] \cdot f \frac{H}{K_1} = [AH^-] \cdot f^- = [AH^-] \cdot f^{2-} \frac{K_2}{H} = \\ &= [A^{2-}] \cdot f \frac{H^2}{K_1 K_2} = [A^{2-}] \cdot f^- \frac{H}{K_2} = [A^{2-}] \cdot f^{2-} \end{aligned} \quad (4.236)$$

На рис. 4.46, А приведены графики зависимости $1/f$, $1/f^-$ и $1/f^{2-}$ от рН (напомним, что $1/f$, $1/f^-$ и $1/f^{2-}$ пропорциональны количеству неионизированной, частично ионизированной и полностью ионизированной форм вещества). При построении этих графиков K_1 принято равным 10^{-5} , а K_2 — 10^{-10} М. Подобные кривые могут быть получены для любой системы с двумя последовательными стадиями ионизации; они отражают ход ионизации не только двухосновных кислот, у которых промежуточная форма имеет один отрицательный заряд, но могут столь же успешно характеризовать ионизацию аминокислоты, у которой промежуточная форма представляет собой биполярный ион с нулевым суммарным зарядом. Кривая для промежуточной формы ($1/f^-$) может вполне точно представлять долю того количества фермента, которое находится в каталитически активной ионной форме, даже если мы и не знаем, каким именно зарядом эта форма обладает. Действительно, именно сходст-

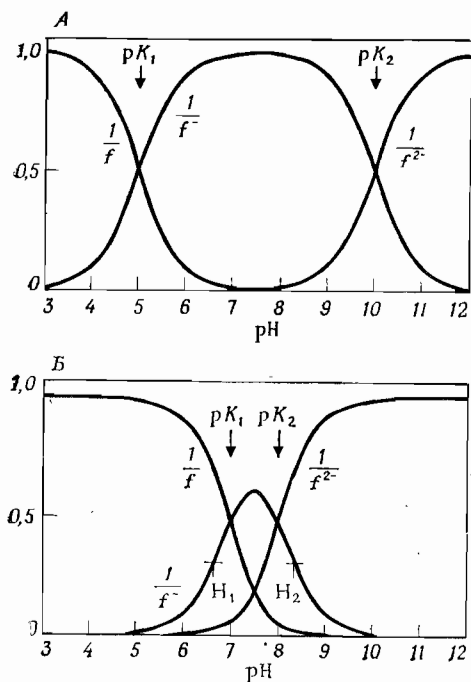


Рис. 4.46. Характер изменения рН-функций при изменении рН. А. Изменение величин, обратных рН-функциям, для системы с двумя нонизирующимися группами, рК которых равны 5 и 10. Б. Изменение величин, обратных рН-функциям, для симметричной системы с рК 7 и 8.

во между такими кривыми и кривыми, характеризующими зависимость активности многих ферментов от рН, и привело Михаэлиса и Дэвидсона к построению соответствующей теории.

Кривая для промежуточной формы достигает максимума при значении рН (рН₀, соответствующее оптимуму рН в случае фермента), находящемся посередине между двумя значениями рК¹. Это означает, что

$$H_0 = \sqrt{K_1 K_2}. \quad (4.237)$$

Если рК значительно различаются, как в рассматриваемом случае (рис. 4.46, А), то при рН₀ практически все вещество будет находиться в промежуточной форме; дело, однако, обстоит иначе, если константы почти равны по величине, как это показано на рис. 4.46, Б. Действительно, если (в предельном случае) константы равны, то пик кривой для промежуточной формы достигает величины, соответствующей только одной третьей всего количества вещества. В этом случае все три члена в выражениях для каждой рН-функции равны единице и все три формы вещества присутствуют в равных количествах.

¹ рК = -lg K.

В том случае, когда значения pK значительно отличаются друг от друга, их легко определить по величинам, равным половине максимальных величин, или по «средним точкам» обеих ветвей кривой для промежуточной формы (которая может соответствовать кривой, характеризующей зависимость активности фермента от pH), как показано на рис. 4.46, А. Если же pK весьма близки, то этот метод расчета неприменим, так как он приводит к большим ошибкам, как это видно из рис. 4.46, Б. Правило для определения в таких случаях значений K предложили Олберти и Массей [70]; они вывели его из уравнений, описывающих действие ферментов, но это правило является общим и может быть легко получено из определения величины f^- следующим образом. Из уравнений (4.228) и (4.237) следует, что высота пика кривой для $1/f^-$ при pH_0 составляет

$$\frac{1}{f_0^-} = \frac{1}{1 + 2 \sqrt{\frac{K_2}{K_1}}} \quad (4.238)$$

Величина H , при которой функция $1/f^-$ имеет значение, равное половине этой максимальной величины, может быть определена путем подстановки $1/f^-$, равной половине $1/f_0^-$, или

$$\frac{1}{f^-} = \frac{K_1 H}{K_1 H + H^2 + K_1 K_2} = \frac{1}{2 + 4 \sqrt{\frac{K_2}{K_1}}} \quad (4.239)$$

Это выражение можно упростить до

$$H^2 - (K_1 + 4H_0) H + H_0^2 = 0. \quad (4.240)$$

Полученное уравнение имеет два действительных корня (которые мы обозначим через H_1 и H_2), соответствующих половинам максимальных значений на обеих ветвях кривой. Сумма корней равна выражению в скобках, так что

$$H_1 + H_2 = K_1 + 4H_0. \quad (4.241)$$

Это простое правило дает возможность вычислить K_1 , поскольку нам известны концентрации ионов водорода в точках, соответствующих максимуму нашей функции, и в обеих точках, соответствующих половине максимума. K_2 после этого может быть определено из уравнения (4.237). Рассмотренный метод весьма ценен для определения констант ионизации фермента по кривым, характеризующим зависимость активности фермента от pH , хотя, к сожалению, точность его оказывается наименьшей именно в тех случаях, когда неприменимы другие методы вычисления.

Рассматривая рис. 4.46, Б как иллюстрацию применения изложенного выше метода, отмечаем, что если ориентироваться

только на «средние точки» обеих ветвей кривой для $1/f^-$, то значения pK окажутся равными 6,64 и 8,36 вместо истинных значений 7,0 и 8,0. Однако, применяя правило (4.241), найдем, что $H_1 = 10^{-6,64} = 10^{-7+0,36} = 2,29 \cdot 10^{-7}$, а $H_2 = 4,37 \cdot 10^{-9}$, так что $H_1 + H_2 = 2,33 \cdot 10^{-7}$. Так как $H_0 = 10^{-7,5}$, то $4H_0 = 1,26 \cdot 10^{-7}$. Таким образом, $H_1 + H_2 - 4H_0 = 1,07 \cdot 10^{-7}$, что достаточно хорошо согласуется с истинным значением $1,00 \cdot 10^{-7}$.

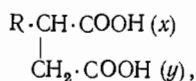
Олберти и Массей [70] составили таблицу значений ширины колоколообразной кривой для $1/f^-$ на половине высоты (т. е. $pH_2 - pH_1$), выразив ее через разность между pK_1 и pK_2 , и отметили, что при уменьшении разности $pK_2 - pK_1$ (которая проходит через нуль и становится отрицательной при $pK_1 > pK_2$) значение ее постепенно снижается, асимптотически приближаясь к пределу, когда разность стремится к $-\infty$. В этой области кривая сливается с базовой линией, как следует из уравнения (4.238).

Для системы, существующей в трех различных формах, каждая из трех pH -функций содержит по три члена и по мере постепенного увеличения pH каждый из этих трех членов по очереди становится доминирующим. Если величины pK системы значительно различаются, то для каждого члена pH -функции может быть выделена область pH , в пределах которой двумя другими членами можно пренебречь. В случае, приведенном на рис. 4.46, А [уравнение (4.228)], при pH 3 второй член равен 100, что по сравнению с 1 рассматривается как большая величина; третий же член в этом случае равен 10^{-7} ; следовательно, в этой области pH определяющим является второй член. При pH 7 второй и третий члены равны 10^{-2} и 10^{-3} соответственно и оба они малы по сравнению с 1; при pH 12 второй член равен 10^{-7} , а третий — 100, т. е. в сравнении с двумя другими членами его можно рассматривать как большую величину. Между этими областями имеются ограниченные участки, где значение pH -функции определяют одновременно два члена.

График зависимости $-\lg f^- (= pf^- = \lg \frac{1}{f^-})$ от pH будет состоять из прямолинейных отрезков, соответствующих тем областям, в которых существенное значение имеет только один из членов функции, и коротких криволинейных участков, соединяющих эти прямые и соответствующих областям, где значение функции определяют два члена. Наклон прямолинейных отрезков равен степени H в соответствующем (играющем главную роль в данной области) члене функции. Например, при pH 3, когда основное значение имеет второй член, $pf^- = -\lg \frac{H}{K_1} = pH - pK_1$, так что график зависимости pf^- от pH будет представлять собой прямую с наклоном, равным 1; другими словами, в области, в которой главный член содержит H в первой степени, pf^-

увеличивается на единицу при увеличении pH на единицу. При $pH 12$ $p f^- = -\lg \frac{K_2}{H} = pK_2 - pH$ и график имеет наклон -1 , а в области $pH 7$ $p f^-$ не зависит от pH , как это видно на рис. 4.47. Легко показать, что если продолжить прямолинейные отрезки, то они пересекутся при значениях pH , равных pK , и что при переходе от одного pK к другому наклон прямой изменяется на единицу. Подобные рассуждения применимы, конечно, и к графикам, изображающим зависимость $p f$ и $p f^{2-}$ от pH ; в этих двух случаях последние члены функций содержат H во второй степени и, следовательно, наклон прямых будет равен двум единицам. Диксон [1106а, 1109] положил эти факты в основу объединенной теории при рассмотрении влияния pH на равновесия, имеющие место в реакциях переноса водорода и фосфатных групп, и на процессы соединения фермента с субстратом и фермента с ингибитором. Эта теория будет рассмотрена подробно в разделе, посвященном K_m .

Возвращаясь к pH -функциям Михаэлиса для двухосновных кислот, отметим попутно недостаточную уясненность того обстоятельства (отмеченного Адамсом [32] еще в 1916 г.), что K_1 и K_2 относятся к первой и второй стадиям ионизации молекулы и не являются константами ионизации отдельных групп. Важность этого разграничения недостаточно очевидна для симметричных двухосновных кислот, рассмотренных Михаэлисом, так как в этих случаях образуется один и тот же анион, какая бы карбоксильная группа ни подвергалась ионизации. В этих условиях могут существовать только три формы вещества. Однако у асимметричной молекулы, такой, как



в которой можно различить две карбоксильные группы, обозначенные буквами x и y , могут существовать две промежуточные формы, а именно однозарядные анионы, образованные в результате ионизации x и y -групп. Для такого вещества возможны не три, а четыре формы. При титровании совершенно

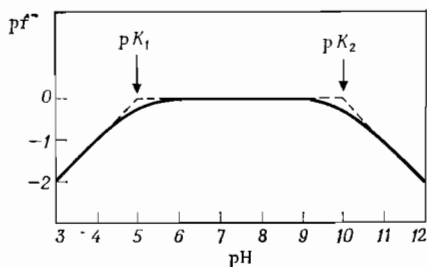
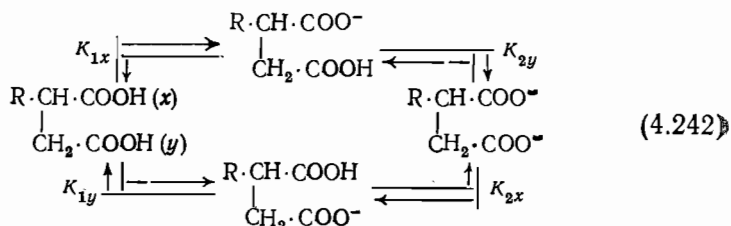


Рис. 4.47. График зависимости $p f^- = -\lg f^- = \lg 1/f^-$ от pH для системы, изображенной на рис. 4.46, А.

несущественно, какая именно группа подвергается ионизации, так как количество потребляемой щелочи в обоих случаях одно и то же и обе промежуточные формы в этом смысле эквивалентны. Поэтому при титровании интересуются только стадиями ионизации и, следовательно, K_1 и K_2 . Весьма возможно, однако, что активность ферментов определяется именно состоянием ионизации определенных групп в активном центре. Более чем вероятно, что только одна из двух возможных промежуточных форм будет в этом случае активной, и, следовательно, мы должны в первую очередь интересоваться константами ионизации отдельных групп, K_x и K_y .

Каждая группа может ионизироваться или из состояния недиссоциированной молекулы, или из аниона, другими словами, в первой и второй стадиях ионизации; поэтому для характеристики полной ионизации асимметричной двухосновной кислоты необходимо знать четыре константы ионизации, а именно:



Если мы имеем дело с молекулой, у которой обе ионизирующиеся группы достаточно удалены друг от друга и поэтому не оказывают влияния одна на другую, то $K_{1x} = K_{2x}$ и $K_{1y} = K_{2y}$.

Обозначив две промежуточные формы, образуемые при ионизации групп x и y , соответственно через AH_x^- и AH_y^- , получим следующие выражения, определяющие четыре константы ионизации групп:

$$\begin{aligned}
 K_{1x} &= \frac{[\text{AH}_x^-] \text{H}}{[\text{AH}_2]}, & K_{1y} &= \frac{[\text{AH}_y^-] \text{H}}{[\text{AH}_2]}, & K_{2x} &= \frac{[\text{A}^{2-}] \text{H}}{[\text{AH}_y^-]}, \\
 K_{2y} &= \frac{[\text{A}^{2-}] \text{H}}{[\text{AH}_x^-]}. & & &
 \end{aligned} \quad (4.243)$$

Из этих уравнений следует, что

$$K_{1x} K_{2y} = K_{1y} K_{2x}. \quad (4.244)$$

Соотношения между константами ионизации молекулы K_1 и K_2 и только что упомянутыми константами ионизации групп могут быть представлены следующим образом. Общая концентрация промежуточной формы равна сумме концентраций AH_x^- и AH_y^- . Подставляя $[\text{AH}_x^-] + [\text{AH}_y^-]$ вместо $[\text{AH}^-]$ в выра-

жения, определяющие K_1 и K_2 [уравнения (4.232)], получаем (см. Адамс [32])

$$K_1 = \frac{([AH_x^-] + [AH_y^-])H}{[AH_2]} = K_{1x}K_{1y}, \quad (4.245)$$

$$K_2 = \frac{[A^{2-}]H}{[AH_x^-] + [AH_y^-]} = \frac{1}{\frac{1}{K_{2x}} + \frac{1}{K_{2y}}}. \quad (4.246)$$

В свете этих результатов интересно вновь рассмотреть случай диссоциации симметричной молекулы двухосновной кислоты. В этом случае $K_{1x} = K_{1y}$ и $K_{2x} = K_{2y}$. Если мы предположим, что ионизирующиеся группы не влияют одна на другую, то все четыре константы ионизации групп будут равны. Тогда из уравнений (4.245) и (4.246) следует, что $K_1 = 4K_2$. Более того, для симметричных кислот, рассмотренных Михаэлисом, из уравнения (4.245) следует, что первая константа ионизации молекулы K_1 равна удвоенной истинной константе ионизации карбоксильной группы (поскольку концентрация карбоксильных групп в 2 раза больше молекулярной концентрации кислоты). Действительно, если воспрепятствовать ионизации одной из карбоксильных групп, например путем этерификации, то K_1 немедленно уменьшится до половины своего первоначального значения (став теперь истинной константой ионизации группы), хотя карбоксильная группа остается такой же сильной кислотой, какой она была прежде. Адамс отмечает, что рассматриваемые теоретические положения вполне согласуются с результатами наблюдений; приведенные выше данные достаточны для того, чтобы показать важность разграничения между константами двух типов.

При рассмотрении асимметричной молекулы двухосновной кислоты теперь потребуются четыре рН-функции, чтобы определить количество каждой из четырех форм существования молекулы. Подставляя выражения, которые определяют четыре константы ионизации групп [уравнения (4.243)], в уравнение

$$A_t = [AH_2] + [AH_x^-] + [AH_y^-] + [A^{2-}] \quad (4.247)$$

и используя уравнение (4.244), получаем новые рН-функции:

$$f = 1 + \frac{K_{1x}}{H} + \frac{K_{1y}}{H} + \frac{K_{1x}K_{2y}}{H^2}, \quad (4.248)$$

$$f_x^- = 1 + \frac{K_{1y}}{K_{1x}} + \frac{H}{K_{1x}} + \frac{K_{2y}}{H}, \quad (4.249)$$

$$f_y^- = 1 + \frac{K_{1x}}{K_{1y}} + \frac{H}{K_{1y}} + \frac{K_{1x}K_{2y}}{K_{1y}H}, \quad (4.250)$$

$$f^{2-} = 1 + \frac{H}{K_{2y}} + \frac{K_{1y}H}{K_{1x}K_{2y}} + \frac{H^2}{K_{1x}K_{2y}}. \quad (4.251)$$

Как и прежде, выражения, обратные этим функциям, будут характеризовать доли всего количества вещества, находящиеся в соответствующих состояниях ионизации.

Эти функции важны только в том случае, когда две ионизирующиеся группы не слишком отличаются друг от друга по степени ионизации, как это, вероятно, и бывает в активных центрах ферментов. Если же величины pK заметно различаются, то необходимости в использовании новых рН-функций не возникает. В этом можно убедиться, если принять в приведенных выше уравнениях K_{1x} значительно большим, чем K_{1y} . Тогда мы увидим, что выражения для f , f^-_x и f^{2-} упрощаются до выражений, идентичных по форме трем функциям Михаэлиса (4.227) — (4.229), а величина f^-_y становится очень большой. Это означает, что концентрация AH^-_y является ничтожной; следовательно, практически существует только одна промежуточная форма. Такой случай встречается, например, при диссоциации обычной аминокислоты, для которой, округлив, можно принять pK_{1x} (карбоксильной группы) равным 2 и pK_{1y} (аминогруппы) равным 8. Единственной промежуточной формой оказывается здесь биполярный ион; количество же незаряженной формы ничтожно мало, и, следовательно, к этому случаю применимы выражения для рН-функций Михаэлиса.

Следует отметить, что (4.248) и (4.251) идентичны (4.227) и (4.229), если подставить выражения для K_1 и K_2 (4.245) и (4.246).

Возможность использования рассмотренных выше рН-функций не зависит от химической природы ионизирующихся групп; их применимость не ограничивается молекулами с двумя карбоксильными группами, но в равной мере распространяется также на амфолиты, такие, как аминокислоты, и на активные центры ферментов, для которых природа ионизирующихся групп может быть неизвестна. График функции $1/f^-_x$ может, например, очень хорошо отражать влияние рН на количество активной формы фермента и таким образом соответствовать графику зависимости активности от рН. Это может относиться также к графику функции $1/f^-_y$, поскольку активная форма — это не обязательно та форма, доля которой наибольшая, и графики не указывают, какая из промежуточных форм является активной. Количества преобладающей и второстепенной форм изменяются в зависимости от рН аналогичным образом, и активная форма может присутствовать лишь в относительно очень малом количестве.

Из определений (4.243) видно, что отношение концентраций двух промежуточных форм равно

$$\frac{[AH^-_x]}{[AH^-_y]} = \frac{K_{1x}}{K_{1y}} \quad (4.252)$$

и не зависит от рН. Другими словами, $[AH^-_x]$ и $[AH^-_y]$ [а следовательно, также и их сумма $[AH^-]$, определяемая по уравнению (4.228) через K_1 и K_2] одинаковым образом зависят от рН. Следовательно, все, что можно получить при титровании вещества или при исследовании характера зависимости активности от рН, — это величины молекулярных констант K_1 и K_2 . Подобные исследования не позволяют непосредственно определить отношение $[AH^-_x]/[AH^-_y]$. Значения, обратные значениям четырех рН-функций (которые определяют доли всего количества вещества, присутствующие в соответствующих четырех формах), отложены по оси ординат на графике рис. 4.48, который иллюстрирует влияние изменений pK_{1y} . K_{1x} и K_{2y} приняты равными 10^{-7} и 10^{-8} М соответственно, но для рис. 4.48, А $K_{1y} \simeq K_{1x}$, а для рис. 4.48, Б она равна K_{2y} . В случае, изображенном на рис. 4.48, А, речь может идти о молекуле с двумя сходными группами, между которыми существует некоторое взаимодействие; в случае, изображенном на рис. 4.48, Б, — о молекуле с двумя разными не взаимодействующими группами. Кривые для обеих промежуточных форм расположены в одной и той же области рН, имеют, как и прежде, максимумы при pH_0 и характеризуются той же формой, что и рассмотренная выше кривая для $1/f^-$. Если все константы ионизации групп равны между собой и если $pH = pK$, то каждый из четырех членов в каждой из четырех рН-функций становится равным единице и каждая ионная форма будет составлять $1/4$ общего количества данного вещества. В этом случае общее количество

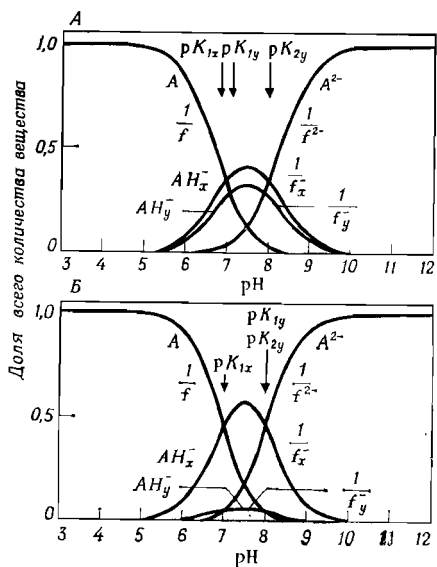


Рис. 4.48. Изменение величин, обратных рН-функциям, в зависимости от рН для несимметричной системы с указанными значениями pK .

промежуточной формы будет составлять $1/2$ общего количества вещества, а не $1/3$, как прежде (когда K_1 принималась равной K_2).

Если использовать символ x для более сильно ионизирующей группы, то тогда величина K_{1y} будет лежать между K_{1x} и K_{2y} ; она не может быть меньше K_{2y} , ибо в результате ионизации одной группы ионизация другой будет уменьшаться, а не увеличиваться.

Из уравнений (4.245), (4.246) можно получить, что

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{K_{1x}}{K_{2x}} \left(2 + \frac{K_{1x}}{K_{1y}} + \frac{K_{1y}}{K_{2y}} \right) \quad (\text{Х. Диксон и Типтон [1105]}. \quad (4.253)$$

Следовательно, K_1 будет больше, чем $4K_2$, если только не имеет место довольно редкая ситуация, при которой $K_{2x} > K_{1x}$, т. е. протонирование одной группы увеличивает способность другой группы связывать протон. Такая положительная кооперативность при связывании протона может происходить, если, во-первых, при протонировании одной группы вытесняется поливалентный катион (в результате протонирование уменьшает положительный заряд молекулы) или, во-вторых, происходит протон-зависимое изменение конформации молекулы.

На рис. 4.49 приведено семейство кривых, соответствующих функций $1/f_x^-$; они иллюстрируют влияние изменения pK_{2y} при постоянном pK_{1x} на количество одной из промежуточных форм (например, активной формы фермента; в этом случае ордината может отражать скорость ферментативной реакции). Это очень напоминает влияние некоторых ингибиторов на pH-зависимость ферментов (см., например, [3313], рис. 1). Олберти и Массей [70] приводят подобное семейство кривых, но используя константы K_1 и K_2 .

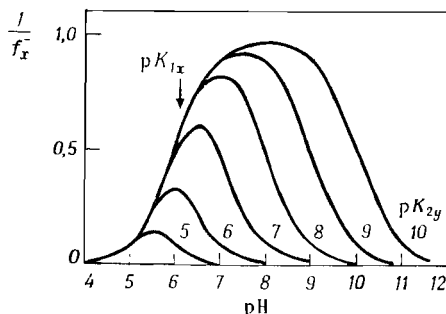


Рис. 4.49. Зависимость количества одной из промежуточных форм, АН_x^- , от pH при изменении pK_{2y} и постоянных pK_{1x} и pK_{1y} . pK_{1x} постоянно и равно 6; pK_{1y} равно 7,5; значения pK_{2y} приведены рядом с кривыми. Кривые построены по уравнению (4.249).

Так как мы рассматриваем изменение активности ферментов под влиянием факторов, оказывающих действие на определенные группы ферментов, а не результаты титрования, то мы полагаем, что в этом случае лучше пользоваться константами ионизации групп. Графики рН-функций, показывающие влияние одновременного изменения обеих констант ионизации амфолита, были рассмотрены значительно раньше Михаэлисом [3147].

В последующих разделах в тех случаях, когда функции обозначены просто через f и т. д., подразумевается, что используются соответствующие выражения для этих функций.

Влияние рН на V

Как уже упоминалось, влияние рН только на V можно определить путем проведения серии измерений скорости ферментативной реакции при различных значениях рН в условиях, когда концентрация субстрата достаточно высока для постоянного насыщения фермента. Таким образом исключается какое-либо влияние рН на сродство фермента к субстрату. В этих условиях весь фермент находится в составе комплекса ES , и так как скорость ферментативной реакции является в конечном счете скоростью распада комплекса на свободный фермент и продукт, то влияние рН на V определяется только состоянием ионизации комплекса. Изменения в состоянии ионизации свободного фермента и субстрата не будут влиять на V ; они могут оказывать влияние на K_m , однако это влияние устраняется благодаря использованию высоких концентраций субстрата. Эти предпосылки значительно облегчают обсуждение вопроса.

Напомним уравнение $v = k_{+2}x$ (4.16), где x — концентрация комплекса ES ; в присутствии избытка субстрата x становится равным суммарной концентрации фермента, т. е. $V = k_{+2}e$ [уравнение (4.17)]. Величина x равна сумме концентраций всех ионных форм комплекса, поэтому ее можно обозначить также через x_t (=полная концентрация комплекса). Но так как мы уже часто использовали x именно в этом смысле, то и в дальнейшем мы будем опускать индекс t ; аналогично мы будем поступать и в отношении символа e . Константа скорости k_{+2} относится ко всему количеству комплекса, и она должна изменяться в зависимости от рН. Это изменение вызвано тем обстоятельством (на мысль о нем наводит уже рассмотренные кривые, характеризующие зависимость активности от рН), что распадается только одна ионная форма комплекса (или по крайней мере только одна форма распадается быстрее, чем все другие) и что доля всего комплекса, находящаяся в этой форме, изменяется с изменением рН. Таким образом, k_{+2} определяется двумя величинами: константой скорости распада опреде-

ленной ионной формы комплекса (которая не зависит от рН и которую мы обозначим через $\tilde{k}_{+2}$) и соответствующей рН-функцией, которая определяет концентрацию этой ионной формы при данном значении рН. Тот факт, что скорость реакции падает по обе стороны от оптимума рН, указывает, что активное состояние является промежуточной ионной формой, так что входящая в выражение для k_{+2} рН-функция представляет собой по форме выражение для f^- [уравнение (4.228)]. Таким образом, мы имеем

$$k_{+2} = \frac{\tilde{k}_{+2}}{f_{es}^-}, \quad (4.254)$$

где индекс *es* относится к комплексу ES. Так как нам неизвестна природа ионизирующихся групп фермента, которые влияют на его активность или определяют активную ионную форму комплекса, то будет удобно обозначить последнюю через ES^n (ср. [70]), где *n* — суммарный отрицательный заряд, который несет активная форма. Тогда

$$v = \tilde{k}_{+2} \frac{x}{f_{es}^-}, \quad (4.255)$$

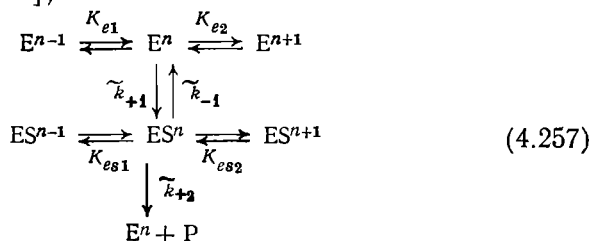
где $\tilde{k}_{+2}$ — константа скорости распада ES^n , x/f_{es}^- — концентрация ES^n . Выражение для *V* получается при подстановке $x = e$, и оно может быть представлено как

$$V = \frac{\tilde{k}_{+2}e}{1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}}, \quad (4.256)$$

где K_{es1} — константа ионизации комплекса, которая определяет «кислую» ветвь кривой рН — активность, и K_{es2} — константа ионизации, определяющая «щелочную» ветвь этой кривой. Аналогичное уравнение было введено Валеом [4946].

В основе приведенных рассуждений лежит допущение, согласно которому процессы ионизации протекают достаточно быстро по сравнению с образованием и распадом фермент-субстратного комплекса, так что различные ионные формы каждого из компонентов системы находятся в равновесии между собой. Принимая во внимание природу процессов, это допущение, по видимому, можно считать справедливым. Лайдлер [2683] вывел полные уравнения, не делая этого допущения, но полученные им уравнения слишком сложны и приобретают практическую ценность опять-таки лишь при указанном допущении.

Рассматриваемая система может быть представлена в следующем виде (см. [70]):



Каждая из трех констант скорости относится к определенной ионной форме, участвующей в реакции.

При выведении уравнения (4.256) мы допускали, что распадается только одна из форм комплекса ES, но можно предположить, что будут распадаться с одинаковыми или разными скоростями две формы комплекса (хотя, насколько нам известно, ни в одном случае не было показано, что это имеет место). Если, например, могут распадаться ES^n и ES^{n+1} , то падение активности до нуля на щелочной ветви кривой рН — активность должно быть связано со следующей стадией ионизации, характеризующейся константой ионизации, которая может быть обозначена через K_{es3} . Если ES^{n+1} распадается медленнее, чем ES^n , то щелочная ветвь кривой рН — активность будет иметь сложную форму с двумя степенями (которые, однако, могут проявляться недостаточно отчетливо), соответствующими K_{es2} и K_{es3} .

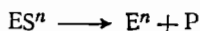
В некоторых случаях K_{es2} не будет влиять на форму кривой. Если группа с константой ионизации K_{es2} находится в таком положении в ферментной или в субстратной части комплекса, что ее ионизация не оказывает влияния на реакцию, то обе формы (ES^n и ES^{n+1}) будут распадаться с одинаковой скоростью. В области рН, в которой ES^n и ES^{n+1} существуют вместе (т. е. в области, где H — величина того же порядка, что и K_{es2}), f_{es}^- приближается к величине $1 + (K_{es2}/H)$, а f_{es}^{2-} — к $1 + (H/K_{es2})$; поэтому можно написать

$$v = \tilde{k}_{+2} \frac{x}{f_{es}^-} + \tilde{k}_{+2} \frac{x}{f_{es}^{2-}} = \tilde{k}_{+2} x \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{es2}}{H}} + \frac{1}{1 + \frac{H}{K_{es2}}} \right) = \tilde{k}_{+2} x. \quad (4.258)$$

Следовательно, в этих условиях, как и следовало ожидать, K_{es2} не оказывает влияния на скорость реакции и рассматриваемый случай упрощается до случая распада только одной формы комплекса с кривой рН — активность, полностью определяемой величинами K_{es1} и K_{es3} .

Если, однако, группа с константой ионизации K_{es2} находится в таком положении в активном центре или вблизи него, что ее

ионизация влияет на скорость распада комплекса, то тогда константы $\tilde{k}_{+2}$ и $\tilde{k}_{-+2}^-$, характеризующие распад соответственно ES^n и ES^{n+1} , не будут равны. В этом случае результат будет зависеть от природы процесса распада, а именно от того, образуются ли при распаде обеих форм комплекса одни и те же ионные формы продукта или нет. Если в обоих случаях образуются $E^n + P$, то ясно, что реакции должны быть представлены как



и



Тогда скорость реакции будет выражаться уравнением

$$v = \tilde{k}_{+2} \frac{x}{f_{es}} + \tilde{k}_{-+2}^- \frac{x}{f_{es}^2} H. \quad (4.259)$$

Однако из уравнений (4.236) имеем, что $H/f_{es}^2 = K_2/f_{es}$, так что

$$v = (\tilde{k}_{+2} + \tilde{k}_{-+2}^- K_{es2}) \frac{x}{f_{es}}. \quad (4.260)$$

Это уравнение скорости имеет тот же вид, что и (4.255), за исключением того, что одна константа заменена другой. Таким образом, и в данном случае влияние рН на скорость процесса носит тот же характер, что и прежде; изменяется только интерпретация константы скорости.

Возможно, однако, что при распаде двух форм комплекса будут образовываться продукты, находящиеся в различных ионных состояниях. Например, из ES^n может образовываться E^n , тогда как ES^{n+1} будет распадаться до E^{n+1} и лишь затем в результате реакции с ионом водорода давать E^n . Хотя оба варианта процесса распада почти идентичны, однако они могут протекать с несколько разными скоростями вследствие влияния дополнительного заряда. Это приводит к уравнению

$$v = \tilde{k}_{+2} \frac{x}{f_{es}} + \tilde{k}_{-+2}^- \frac{x}{f_{es}^2}, \quad (4.261)$$

которое не упрощается таким же образом, как уравнение (4.258), если $\tilde{k}_{+2}$ и $\tilde{k}_{-+2}^-$ заметно различаются.

Остается возможность (хотя в пользу такой возможности, насколько мы знаем, нет доказательств), что в некоторых случаях распад комплекса ES представляет собой процесс, катализируемый ионами водорода, подобно ряду неферментативных

процессов распада. В этом случае скорость должна была бы выражаться уравнением

$$v = \tilde{k}_{+2} H \frac{x}{f_{es}}. \quad (4.262)$$

Обращаясь теперь еще раз к уравнениям (4.236), находим, что $H/f^- = K_1/f$, так что

$$v = \tilde{k}_{+2} K_{es1} \frac{x}{f_{es}}. \quad (4.263)$$

Таким образом, в предполагаемом варианте получаем такое выражение для скорости, как если бы распадался комплекс ES^{n+1} , а комплекс ES^n не распадался.

Возвращаясь к уравнению (4.256), отметим, что если построить график зависимости $\lg V$ от pH , то этот график по своему типу будет аналогичен тому, который изображен на рис. 4.47, так как

$$\lg V = \lg \tilde{k}_{+2} e + p f_{es}^-. \quad (4.264)$$

В рассматриваемом выражении первый член справа не зависит от pH . Это уравнение позволяет по положению перегибов на кривой определить pK тех ионизирующихся групп комплекса ES , которые влияют на активность, или, другими словами, тех групп, которые либо образуют часть активного центра, либо тесно связаны с ним.

В тех случаях, когда наблюдения не охватывают достаточно большого диапазона pH для того, чтобы можно было построить линейные участки по обе стороны от искомой величины pK , эту величину часто можно определить путем построения графика зависимости $1/V$ от H (или $1/H$ в зависимости от обстоятельств). Этот метод применим только в том случае, если ионизация других групп не изменяется в пределах рассматриваемой области pH . Если это условие выполняется, то одним из двух членов (H/K_{es1} или K_{es2}/H) в уравнении (4.256) можно пренебречь; тогда

$$\frac{1}{V} = \frac{1 + \frac{H}{K_{es1}}}{\tilde{k}_{+2} e}$$

или

$$\frac{1}{V} = \frac{1 + \frac{K_{es2}}{H}}{\tilde{k}_{+2} e}.$$

График зависимости $1/V$ от H или $1/H$ представляет собой прямую с наклоном $1/K_{es1}\tilde{k}_{+2}e$ или $K_{es2}/\tilde{k}_{+2}e$, пересекающую ось ординат в точке $1/\tilde{k}_{+2}e$. Таким образом, по наклону прямой и

длине отрезка, отсекаемого от оси ординат, могут быть определены K_{es1} или K_{es2} . Этот метод определения pK использовался Лайдлером [2684] и другими исследователями.

Хотя в литературе и приводятся кривые, характеризующие зависимость pH —активность для многих ферментов, и хотя в ряде случаев было показано, что при оптимальном для активности фермента pH концентрация субстрата была вполне достаточной для насыщения фермента, однако только в отношении очень небольшого числа случаев можно быть уверенным, что это условие выполнялось при всех рассматривавшихся величинах pH . Среди немногочисленных надежных данных, характеризующих зависимость V от pH , можно назвать результаты опытов с фумаратгидратазой (КФ 4.2.1.2) [3018]. По этим данным построены кривые pH — $\lg V$, приведенные на рис. 4.50, для двух субстратов—фумарата и малата. Из этих кривых видно, что фермент-фумаратный комплекс характеризуется pK около 5,7 и 7,7, тогда как для фермент-малатного комплекса эти величины равны приблизительно 7 и (возможно) 9. Не было, конечно, оснований ожидать, что оба комплекса будут иметь одинаковые pK , но следует иметь в виду, что фумаратгидратаза представляет собой фермент, который обладает особым свойством: она чувствительна к анионам, и потому на характер кривых pH — $\lg V$ значительное влияние оказывает присутствие солей.

Лайдлер [2684] построил по литературным данным кривые pH — $\lg V$ для холинэстеразы (КФ 3.1.1.8) [1816] и для ксан-

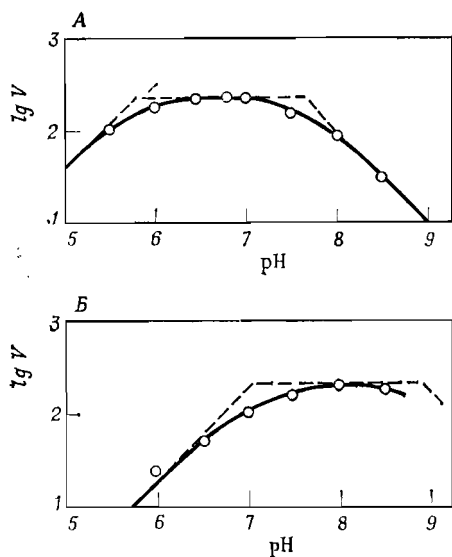


Рис. 4.50. Зависимость $\lg V$ от pH для фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2) [3018]. А. Субстратом служит фумарат. Б. Субстратом служит малат.

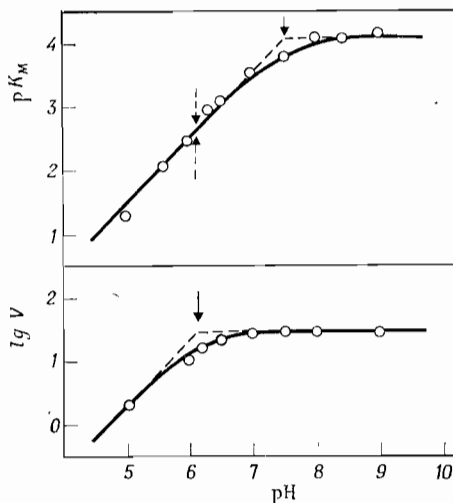


Рис. 4.51. Зависимость K_M и V от pH при действии холинэстеразы (КФ 3.1.1.8) на ацетилхолин [1818]. Верхний график — из работы [1109]; нижний график — из работы [2684].

тиноксидазы (КФ 1.2.3.2), действующей на 2-амино-4-гидроксиптеридин [2879]; эти кривые приведены на рис. 4.51 и 4.52. В обоих случаях в изучавшейся области pH наблюдается только одно pK для комплекса ES и отсутствует оптимальный pH для V , которая просто увеличивается до некоего постоянного максимального значения.

Весьма необходимы дальнейшие работы по определению pK фермент-субстратных комплексов. В результате сравнения pK комплексов с pK свободных ферментов и субстратов могут быть получены интересные данные о том влиянии, которое оказывает на молекулу субстрата связывание с активным центром фермента.

В то время как измерения скорости реакции при высокой концентрации субстрата позволяют определить pK фермент-субстратного комплекса, измерения при очень низкой концентрации субстрата могут дать pK для свободного фермента и субстрата. Как уже отмечалось выше, при низких концентрациях субстрата $v = (V/K_M)s$. Зная V/K_M , можно определить pK свободного фермента (ср. [70]) и свободного субстрата. Основания для этого станут ясными после рассмотрения влияния pH на K_M , но кратко можно сказать, что K_M зависит от констант ионизации всех трех компонентов, тогда как V является функцией только констант комплекса ES . При рассмотрении отношения этих двух величин константы, относящиеся к комплексу ES , сокращаются и остаются только константы для свободного фермента и субстрата. Однако наблюдения только за изменением величины K_M позволяют определить pK всех компонентов, как это будет показано в следующем разделе. Измерения

скорости при низкой и высокой концентрациях субстрата полезны для проверки результатов. На рис. 4.52 представлено изменение всех трех величин; логарифмический метод построения, предложенный М. Диксоном [1109], позволяет сравнительно легко интерпретировать результаты.

Х. Диксон [1103] отметил, что в том случае, когда ферментативная реакция протекает через ряд последовательных стадий с образованием промежуточных комплексов, ионизирующиеся группы комплексов, определяющие ход ветвей колоколообразной рН-кривой, не обязательно должны относиться к одному и тому же комплексу. В таком случае лимитирующая стадия при переходе от одной ветви графика рН-зависимости к другой меняется. Тем не менее график имеет нормальную колоколообразную форму.

Образование эффективного комплекса ES, в котором субстрат связан с активным центром фермента надлежащим образом, может проходить через несколько промежуточных стадий. В равновесных условиях нет необходимости рассматривать рК этих промежуточных комплексов, поскольку они не влияют на K_s (последняя определяется стандартными свободными энергиями образования E, S и ES). Однако в стационарных условиях одна или несколько ранних стадий могут оказаться достаточно медленными и лимитировать скорость процесса; тогда рК промежуточных комплексов могут играть некоторую роль. Если мы имеем систему с большим числом последовательных стадий, скорость которых различается, то решить вопрос о том, какой из интермедиатов следует рассматривать как ES, доволь-

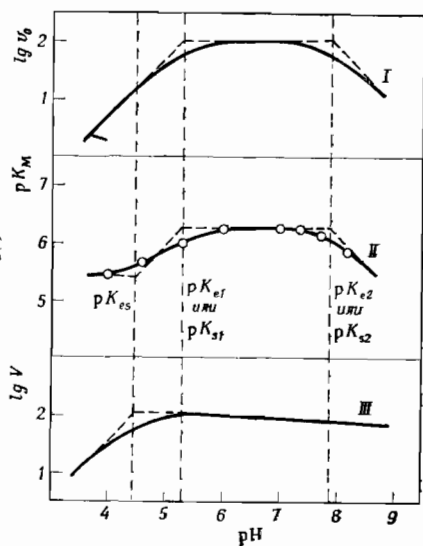


Рис. 4.52. Зависимость K_m , V и v_0 от рН при действии ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2) на 2-амино-4-гидроксиптеридин [2879]. I и III — из работы [2684], II — из работы [1109].

но трудно. Обычно за ES принимают первый комплекс, стадия превращения которого лимитирует результирующую скорость процесса в такой мере, что данный комплекс накапливается в заметном количестве.

Влияние pH на K_M

а. Равновесные условия

Уокер и Шмидт [4947] при рассмотрении действия гистидин — аммиак-лиазы (КФ 4.3.1.3) описали в общей форме влияние ионизации трех компонентов системы на константу Михаэлиса; они вывели соответствующие уравнения при допущении, что каждый компонент имеет одну ионизирующуюся группу. Позже М. Диксон [1109] проанализировал этот вопрос в более общей форме и предложил ряд правил для интерпретации получаемых данных. Его анализ относится к величине K_s , но он в равной мере применим и к величине K_i для ингибиторов; он представляет собой, таким образом, теорию влияния pH на величины сродства ферментов к субстратам и ингибиторам. При создании этой теории было сделано допущение, что комплекс ES находится в равновесии со свободным ферментом и субстратом, или другими словами, что k_{+2} мало по сравнению с k_{-1} и система отвечает условиям теории Михаэлиса. Этот анализ в равной мере применим к величинам K_s и K_i ; вопрос о применимости его к величине K_M и к кинетике стационарного состояния обсуждается ниже.

Рассматривая систему (4.257), допустим, что, как и прежде, форма E^n фермента соединяется с неионизированной формой субстрата (который может быть, например, двухосновной кислотой), в результате чего образуется комплекс ES^n :



и при этом устанавливается равновесие. Константу равновесия $\tilde{K}_s$ определим отношением

$$\tilde{K}_s = \frac{[E^n][S]}{[ES^n]}. \quad (4.266)$$

Эта константа отличается от обычной субстратной константы K_s ; последняя представляет собой константу равновесия, определяемую в отношении полных количеств E , S и ES , и зависит от pH , тогда как K_s относится к особым ионным формам компонентов, фигурирующих в выражении (4.266), и не зависит от pH . В данном случае $[S]$ — концентрация неионизированной формы субстрата.

Из уравнений (4.223) — (4.225) и определения K_s получаем

$$K_s = \frac{E_t S_t}{ES_t} = \frac{[E^n] f_e^- [S] f_s}{[ES^n] f_{-es}} = \tilde{K}_s \frac{f_e^- f_s}{f_{-es}}. \quad (4.267)$$

Это важное уравнение, показывающее, как K_s изменяется в зависимости от pH, удобно представить в логарифмической форме

$$pK_s = p\tilde{K}_s + \lg f_{-es} - \lg f_e^- - \lg f_s = pK_s - pf_{-es}^- + pf_e^- + pf_s. \quad (4.268)$$

Точно такие же уравнения описывают влияние pH на сродство ферментов к ингибиторам

$$K_i = \tilde{K}_i \frac{f_e^- f_i}{f_{-ei}}, \quad (4.269)$$

$$pK_i = p\tilde{K}_i - pf_{-ei}^- + pf_e^- + pf_i. \quad (4.270)$$

Так как различные ионные формы каждого компонента находятся в равновесии между собой, уравнения типа (4.265) и (4.266) можно написать для любых других ионных форм. Не имеет значения, какие ионные формы, согласно нашему допущению, присоединяются с образованием комплекса ES, и указанный выше вариант соединения выбран как простейший для системы (4.257). Легко показать, что тот же самый результат получается при любом допущении относительно механизма присоединения. Если, например, допустить, что с ферментом связывается вместо незаряженной формы субстрата анион, несущий два заряда, и что комплекс ES остается таким же, как прежде, то вместо уравнений (4.265) и (4.266) мы должны будем написать

$$E^n + S^{2-} + 2H^+ = ES^n, \quad (4.271)$$

$$\tilde{K}_{s2-} = \frac{[E^n] [S^{2-}] H^2}{[ES^n]}, \quad (4.272)$$

и из уравнений (4.232) — (4.236) и (4.266) получим

$$\begin{aligned} K_s &= \frac{E_t S_t}{ES_t} = \frac{[E^n] f_e^- [S^{2-}] f_s^{2-}}{[ES^n] f_{-es}} = \frac{\tilde{K}_{s2-}}{H^2} \cdot \frac{f_e^- f_{s2-}}{f_{-es}} = \\ &= \frac{\tilde{K}_{s2-}}{K_{s1} K_{s2}} \cdot \frac{f_e^- f_s}{f_{-es}} = \tilde{K}_s \frac{f_e^- f_s}{f_{-es}}, \end{aligned} \quad (4.273)$$

т. е. тот же самый результат, что и прежде [ср. уравнение (4.267)].

Выбор правильной функции для использования в уравнении (4.268) определяется не какими-либо допущениями относительно механизма образования комплекса ES, а зависит от того, как мы определим константу равновесия, входящую в уравне-

ние. Таким образом, написанное выше уравнение содержит f^- -функции для E и ES и f -функцию для S просто потому, что при определении K_s учитывались промежуточные формы E и ES и незаряженная форма S.

М. Диксон [1109] отметил, что если построить график зависимости $-\lg K_s$, или pK_s , от pH, то результаты можно будет легко интерпретировать на основе нескольких простых правил, теоретическую базу для которых составляет уравнение (4.268). Если пренебречь первым постоянным членом, который влияет только на смещение графика вдоль оси ординат, то pK будет равно алгебраической сумме трех членов типа $p\bar{f}$, каждый из которых изменяется по тому же закону, что и функции, изображенные на рис. 4.47. Следует, однако, отметить, что, в то время как члены типа $p\bar{f}$ для свободного фермента и субстрата имеют те же знаки, что и упомянутые функции на рис. 4.47, члены типа $p\bar{f}$ для комплекса ES имеют обратные знаки и их влияние носит противоположный характер. Эти соображения приводят к формулированию следующих правил:

1. График зависимости pK_s от pH состоит из прямолинейных отрезков (если pK достаточно сильно различаются), соединенных короткими криволинейными участками.

2. Наклоны прямолинейных отрезков равны 0, ± 1 или ± 2 .

3. Каждый перегиб на кривой дает значение pK ионизирующей группы в одном из компонентов; если продолжить прямолинейные отрезки, то они пересекутся при значении pH, соответствующем pK .

4. При переходе от одного pK к другому наклон кривой изменяется на единицу.

5. Каждое pK группы, относящейся к комплексу ES, вызывает увеличение (положительного) наклона с увеличением pH, каждое pK группы, относящейся к свободному ферменту или к свободному субстрату, вызывает уменьшение наклона кривой.

6. Кривизна в точках перегиба такова, что расстояние между точкой пересечения продолженных соседних прямолинейных отрезков и касательной к кривой в точке перегиба равно 0,3 единицы (т. е. $\lg 2$). Если при рассматриваемом pH происходит одновременная ионизация двух групп, то расстояние будет равно $\lg 3$.

7. Величина наклона каждого из прямолинейных отрезков численно равна величине изменения заряда, происходящего в рассматриваемой области pH при диссоциации комплекса ES на свободный фермент и субстрат. Если, например, при данном pH и фермент, и комплекс имеют по n отрицательных зарядов, а свободный субстрат находится в незаряженном состоянии, то процесс диссоциации будет протекать в соответствии с уравнением $ES^n \rightarrow E^n + S$; при этом не будет происходить изменения заряда и наклон отрезка будет равен нулю. Если комплекс име-

ет $(n+1)$ отрицательных зарядов, а субстрат имеет 1 отрицательный заряд, то процесс диссоциации выразится уравнением $ES^{n+1} \rightleftharpoons E^n + S^-$ и наклон отрезка по-прежнему будет равен нулю. Если процесс диссоциации пойдет по пути $ES^{n-1} \rightleftharpoons E^n + S$, то изменение заряда будет равно -1 и наклон тоже будет равен -1 и т. д. Наклон отрезка, таким образом, определяется величиной заряда определенных ионных форм компонентов, доминирующих при рассматриваемом рН.

В общем случае по этому признаку, т. е. по изменению наклона, невозможно различить ионизацию свободного фермента и свободного субстрата, но так как константы ионизации субстрата обычно известны или же могут быть определены, то на этом пути практически не возникает значительных трудностей.

Следует отметить, что применимость этих правил не зависит от допущений, определяющих, какие именно ионные формы компонентов соединяются при образовании комплекса ES или какие рН-функции фигурируют в уравнениях. Для того чтобы интерпретировать кривые зависимости rK_s — рН с помощью этих правил, вообще не требуется составлять уравнение образования комплекса для данной системы. Эти правила в равной мере применимы и при изучении влияния рН на rK_s , они значительно упрощают интерпретацию действия ингибиторов.

Если ионизирующиеся группы не участвуют в образовании связи между ферментом и субстратом, то они обычно могут ионизироваться и в комплексе; однако в результате образования комплекса может иметь место изменение величин rK , что сопровождается появлением на графике волнообразного сдвига, как показано на кривых II и III рис. 4.53. Если масштаб вертикальной и горизонтальной шкал на графике один и тот же, что весьма желательно, то разность между уровнями (по вертикали) в результате появления волны равна изменению величины rK при образовании комплекса. Если же ионизирующаяся группа непосредственно вовлекается в образование связи, то ионизация ее обычно полностью подавляется, на графике это выражается появлением перегиба (рис. 4.53, кривая I).

Ионизация групп, которые одинаково сильно ионизируются и в свободном ферменте, и в фермент-субстратном комплексе, практически не оказывает влияния на K_s , хотя ионизация этих групп может влиять на V и проявляться на кривой $\text{pH} - \lg V$; это весьма благоприятное обстоятельство, так как оно означает, что только те ионизирующиеся группы, которые тесно связаны с активным центром фермента, т. е. группы, изменяющие характер ионизации в результате соединения с субстратом, обнаруживаются на графиках $\text{pH} - rK_m$. Многие ионизирующиеся группы в ферменте, более удаленные от активного центра, не обнаруживают себя на этих графиках. Необходимо, однако, отдавать себе отчет и в том, что некоторые группы, не ионизи-

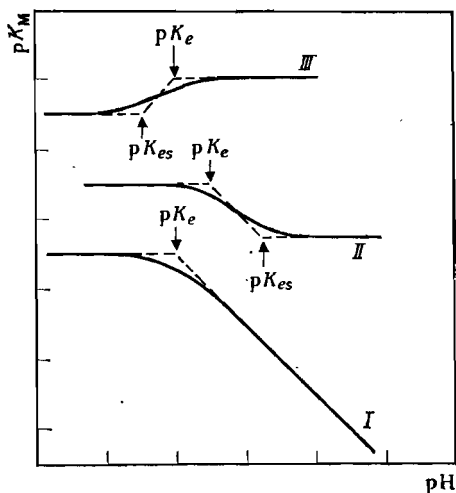


Рис. 4.53. Схема, иллюстрирующая возможные влияния pH на K_M ; объяснение см. в тексте.

рующиеся вообще, могут быть ответственны за соединение с субстратом или вовлекаться в это соединение, хотя график не даст нам никаких указаний на существование этих групп.

6. СТАЦИОНАРНЫЕ УСЛОВИЯ

Изложенная выше теория применима при рассмотрении влияния pH на K_s . Естественно возникает вопрос: можно ли пользоваться этой теорией и при анализе влияния pH на K_M в условиях, рассмотренных Бриггсом и Холдейном, т. е. когда K_M не является истинной константой равновесия, а определяется выражением $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$, в котором какая-либо из констант или даже все три константы скорости могут изменяться при изменении pH? Анализ этого вопроса упрощается, если принять во внимание, что реакция, характеризующаяся константой скорости k_{+1} (образование комплекса из свободного фермента и субстрата), зависит только от состояния ионизации фермента и субстрата и не зависит от состояния ионизации комплекса, тогда как реакции с константами скорости k_{-1} и k_{+2} (реакции распада комплекса либо на фермент и субстрат, либо на фермент и продукт) зависят только от ионизации комплекса и не зависят от ионизации фермента и субстрата.

В предыдущем разделе уже было отмечено [уравнение (4.255)], что влияние pH на k_{+2} учитывается при подстановке $\bar{k}_{+2}/f_{-es}$ вместо k_{+2} , при этом константа скорости и выбранная функция pH относятся к распадающейся форме комплекса ES. Допуская, что та же самая форма комплекса ES участвует в реакции, характеризующейся константой скорости k_{-1} , как это показано для системы (4.257), можно вместо k_{-1} подставить $\bar{k}_{-1}/f_{-es}$. Для k_{+1} -реакции, в которой участвуют как свободный

фермент, так и субстрат, вместо k_{+1} можно написать $\tilde{k}_{+1}/(f_{-e}f_s)$. Если произвести эти подстановки, то мы получим

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = \frac{\tilde{k}_{-1} + \tilde{k}_{+2}}{\tilde{k}_{+1}} \cdot \frac{f_e f_s}{f_{es}}. \quad (4.274)$$

Таким образом, влияние рН на K_M оказывается точно таким же, как и влияние рН на K_s [см. уравнение (4.267)], так как $\tilde{k}_{+1}$, $\tilde{k}_{-1}$ и $\tilde{k}_{+2}$ не зависят от рН, ибо они относятся к определенным ионным формам компонентов. Поэтому теория о влиянии рН на K_s применима и к данному случаю.

Выражение такого вида было впервые выведено для кинетики стационарного состояния по Бригсу — Холдейну Валеом [4946]. Полное выражение для скорости реакции в системе (4.257) может быть представлено следующим образом (включая выражение Валея для V):

$$v = \frac{\frac{\tilde{k}_{+2}e}{1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}}}{1 + \frac{1}{s} \cdot \frac{\tilde{k}_{-1} + \tilde{k}_{+2}}{\tilde{k}_{+1}} \cdot \frac{\left(1 + \frac{H}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{H}\right) \left(1 + \frac{K_{s1}}{H} + \frac{K_{s1}K_{s2}}{H^2}\right)}{1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}}}. \quad (4.275)$$

В данном случае сделаны допущения, что активной формой комплекса является ES^n , что эта форма образуется в результате соединения E^n с S и что субстрат может подвергаться ионизации как двухосновная кислота.

При анализе зависимости K_s от рН в равновесных условиях было отмечено, что вопрос о том, какие именно ионные формы компонентов соединяются при образовании комплекса ES , не имеет значения. Для величины K_M это положение перестает быть справедливым. Если в системе (4.257) E^{n-1} также соединяется с S , в результате чего образуется ES^{n-1} , то скорость этой реакции следует добавить к скорости реакции с константой $\tilde{k}_{+1}$, что отразится на результате. Лайдлер [2683], развивая анализ Боттса и Моралеса [501], вывел полные кинетические уравнения для такой системы и показал, что если образование активной формы комплекса ES из E^n происходит значительно быстрее, чем ее образование из какой-либо другой формы фермента, то приведенные выше уравнения будут справедливы; если же это условие не соблюдается, то могут иметь место ошибки в величинах ионизации (pK) до 0,3 единицы рН. Поскольку, однако, такие ошибки лежат, по-видимому, в пределах ошибок опыта для работ подобного рода, это ограничение не является существенным.

Лайдлер и другие исследователи [68, 2328, 2613, 2683, 3572, 3643] рассмотрели также более сложные случаи, при которых все три ионные формы свободного фермента В (4.257) могут связывать субстрат с образованием комплексов, способных распадаться с образованием продуктов. Уравнения для таких систем в предположении стационарности являются слишком сложными, если только не принять допущение, согласно которому процессы ионизации протекают достаточно быстро по сравнению с процессами образования и распада комплексов. Лайдлер показал, что в таких условиях рН-теория вполне применима и что получаемые кинетические уравнения позволяют объяснить поведение ряда ферментов.

В анализе Лайдлера и других подразумевается, что влияние рН на k_{-1} - и k_{+2} -реакции сходно, так как обе эти реакции зависят от состояния Е. Можно, однако, допустить, что не во всех случаях это так, хотя нелегко сформулировать условия, при которых влияние рН на указанные реакции было бы различным. Если существует еще некое дополнительное влияние рН только на k_{+2} , то эту константу следует умножить на некоторую рН-функцию, например на f_{+2} . При этом все остальные константы останутся неизменными и уравнение (4.274) надо будет заменить уравнением

$$K_M = \frac{\tilde{k}_{-1} + f_{+2} \tilde{k}_{+2}}{\tilde{k}_{+1}} \cdot \frac{f_e \bar{f}_s}{\bar{c} \bar{f}_{es}}.$$

Насколько сильно данное обстоятельство будет влиять на результаты анализа, зависит от относительных величин $\tilde{k}_{-1}$ и $\tilde{k}_{+2}$, а также от природы f_{+2} . Мы не располагаем данными, которые указывали бы, что рассмотренное осложнение имеет место, но такая возможность не может быть полностью исключена. По мнению Лайдлера, если пренебречь возможностью небольших ошибок в величинах констант ионизации, о которых упоминалось выше, то теорию влияния рН на образование комплекса Е можно считать применимой не только к случаям равновесия, но также к случаям стационарного состояния, предусмотренного теорией Бриггса — Холдейна. Таким образом, как при равновесном, так и при стационарном связывании субстрата может быть применена общая рН-теория и соответствующие величины рК можно определить по графику зависимости рК_М от рН. Использование же графиков зависимости lg V и lg V/K_М от рН позволяет получить лишь небольшую дополнительную информацию, поскольку

$$\text{рК}_M = \lg \frac{V}{K_M} - \lg V. \quad (4.276)$$

Однако, как отмечалось выше, график зависимости lg V—рН позволяет выявить ионизирующиеся группы, рК которых не из-

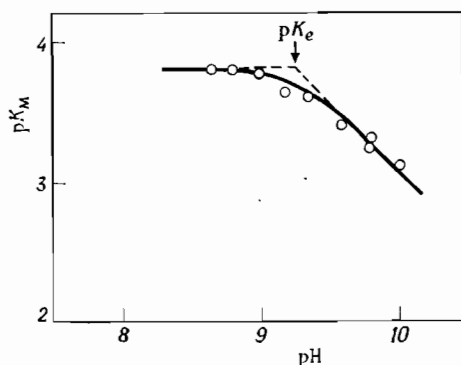


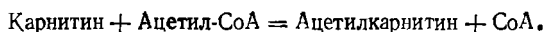
Рис. 4.54. Зависимость K_M от pH при действии щелочной фосфатазы (К Ф 3.1.3.1). По Мортону [3271], проанализировано М. Диксоном [1109].

меняется при связывании субстрата (с. 217). Кроме того, поскольку зависимости rK_M — pH бывают в ряде случаев довольно сложными, использование двух других графиков является весьма полезным подходом для проверки полученных значений. На графиках зависимости $\lg V$ и $\lg V/K_M$ от pH наблюдается только уменьшение наклонов; вклады этих графиков видны на графике rK_M — pH . Поскольку стадиям ионизации комплекса ES соответствует на графике rK_M — pH увеличение наклонов, на графике $\lg V$ — pH им отвечает уменьшение наклонов, а на графике $\lg V/K_M$ — pH эти стадии не выявляются. В то же время стадиям ионизации свободного фермента (или субстрата) соответствует уменьшение наклонов как на графике rK_M — pH , так и на графике $\lg V/K_M$ — pH , а на графике $\lg V$ — pH эти стадии не выявляются.

Выполнен ряд детальных исследований по выяснению влияния pH на активность отдельных ферментов. М. Диксон рассмотрел шесть случаев, из которых три представлены на рис. 4.51, 52 и 54. Применение изложенных выше правил для интерпретации кривых иллюстрирует рис. 4.52; rK_M -кривая дает для rK комплекса ES (увеличение наклона) значение 4,5, а для rK свободного фермента (или субстрата) два значения: 5,3 и 7,9. rK комплекса ES можно определить также по кривой pH — $\lg V$, но не по кривой pH — $\lg v_0$; в то же время rK фермента определяется по кривой pH — $\lg v_0$, но не по кривой pH — $\lg V$ в полном соответствии с приведенной выше теорией. Рис. 4.51 иллюстрирует уже упоминавшийся выше факт, а именно, что rK , характеризующее такую группу фермента, которая может влиять на скорость реакции, и выявляющееся на кривой pH — $\lg V$, не обнаруживается при построении кривой для rK_M , если константа ионизации данной группы не изменяется в результате присоединения субстрата.

Ряд интересных результатов, полученных Доджсоном и др. [1130] в опытах с арилсульфатазой (КФ 3.1.6.1) и тремя различными субстратами, показан на рис. 4.55. Можно отметить, что данный фермент характеризуется двумя pK , имеющими значение около 8,1 и 9,4, а комплекс ES — одним pK , слегка изменяющимся при использовании различных субстратов (в пределах 7,5—7,8). Это обстоятельство вызывает появление дополнительной волны на кривой, при этом видны два новых значения pK — одно несколько больше 6,5, принадлежащее свободному ферменту или субстрату, и другое 6,9, принадлежащее ES-комплексу. pK 6,5 соответствует pK свободного субстрата; оно не может принадлежать ферменту, так как не обнаруживается на других кривых; pK 6,9, очевидно, относится к ионизации той же самой группы в субстрате, соединившемся с ферментом, и указывает на то, что эта группа в комплексе ES все еще свободна, хотя соединение субстрата с активным центром фермента делает ее менее кислой. Возможно, изучение подобного влияния соединения с ферментом на различные функциональные группы субстрата позволит составить представление о характере электронных изменений, которые происходят в молекуле субстрата, когда она активируется в результате взаимодействия с ферментом.

Тщательное исследование влияния pH на активность карнитин-ацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.7) провел Чейз [747]; результаты его представлены на рис. 4.56. Фермент катализирует реакцию



Приведенные данные получены при исследовании реакции в обоих направлениях. График на рис. 4.56, А указывает на pK около 7,1; поскольку, однако, ни карнитин, ни ацетилкарнитин

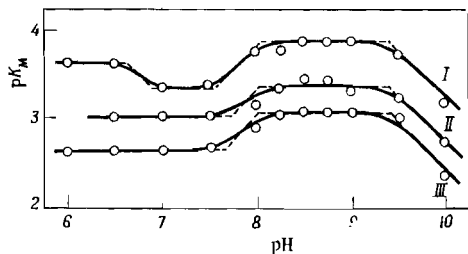


Рис. 4.55. Зависимость K_m от pH при действии арилсульфатазы (КФ 3.1.6.1) [1130]. I — субстратом служит нитрокатохолсульфат; II — субстратом служит *n*-нитрофенилсульфат; III — субстратом служит *n*-ацетилфенилсульфат.

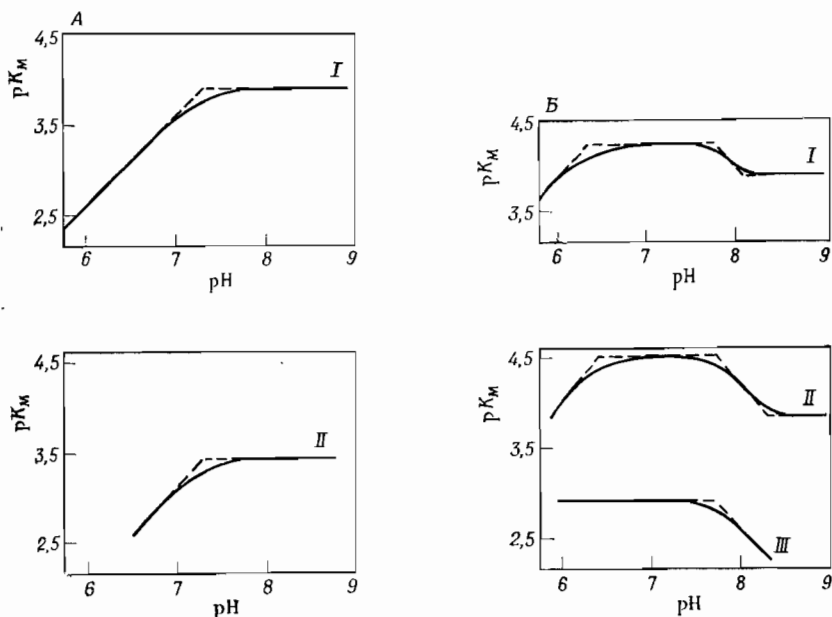
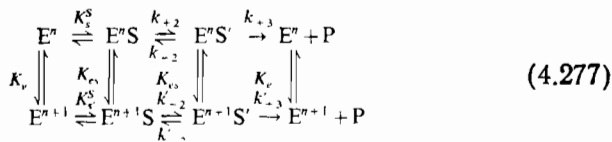


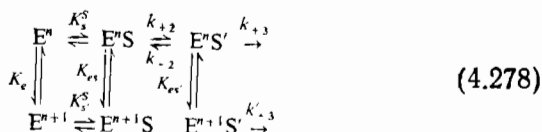
Рис. 4.56. Зависимость pK_m от pH для реактантов карнитин-ацетилтрансферазной (КФ 2.3.1.7) реакции [747]: для карнитина (А, кривая I); для ацетилкарнитина (А, кривая II); для CoA (Б, кривая I); для ацетил-CoA (Б, кривая II) и для ацетил-3'-дефосфо-CoA (Б, кривая III).

не ионизируются в исследованной области pH, это значение должно относиться к pK группы свободного фермента. Результаты, полученные с CoA и его производными (рис. 4.56, Б), интерпретировать трудно; соответствующие графики для CoA и ацетил-CoA дают pK 8,25, которое характеризует ионизацию фермент-субстратного комплекса, а также pK 6,4 и 7,85, характеризующие ионизацию либо свободного фермента, либо субстрата. Так как CoA и его производные содержат фосфатную группу с pK около 6,4, то обнаруженное значение pK могло бы соответствовать ионизации фосфатных групп этих соединений, находящихся в свободном состоянии. О том, что это действительно так, свидетельствуют результаты, полученные при использовании аналога, ацетил-дефосфо-CoA, который не имеет такой группы (рис. 4.56, Б, кривая III). На основании исследования pH-зависимости реакции, катализируемой химотрипсином (КФ 3.4.21.1), Фёршт и др. [1307, 1327] высказали предположение о том, что в двух случаях pK , определяемые в подобных исследованиях, не равны истинным значениям pK участвующих в процессе групп.

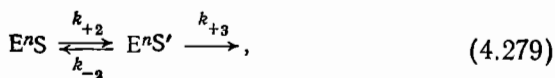
1. Изменение лимитирующей стадии при изменении рН. Для реакции типа



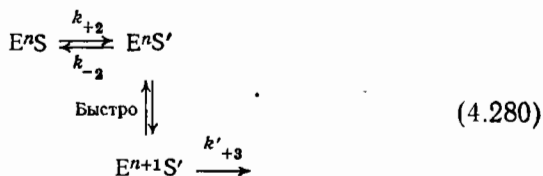
зависимости K_M и V от рН аналогичны рассмотренным выше (см. [2328]). Если, однако, k'_{+2} и k'_{-2} очень малы, система становится асимметричной, и зависимости рН— V и рН— K_M оказываются невязаносвязанными:



Если в системе (4.278) k_{-2} больше k_{+3} , то лимитирующей стадией при высоких значениях рН будет распад комплекса $E^n S'$. Однако при уменьшении рН концентрация $E^n S'$ будет падать, и в связи с этим скорость на k_2 -стадии уменьшится, а на стадии с образованием комплекса $E^{n+1} S'$ увеличится. Таким образом, при низких и высоких рН имеют место следующие реакционные последовательности:
при высоких рН

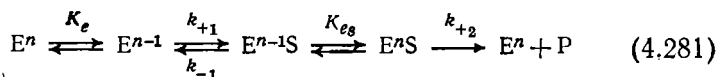


где $k_{+3}[E^n S'] < k_{-2}[E^n S']$, так что k_{+3} -стадия является лимитирующей;
при низких рН



Рассматриваемый эффект вносит некоторую неопределенность при трактовке рК, полученной по графику зависимости рН— V . На с. 220 уже отмечалось, что при изменении рН может измениться лимитирующая стадия. Кинетика ряда систем такого

типа была детально рассмотрена, например, в работе [565а].
Анализ системы

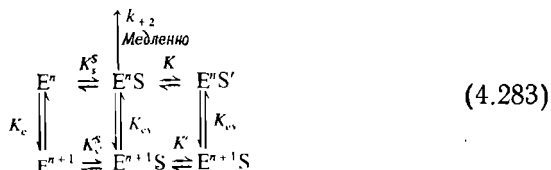


в стационарном приближении приводит к следующему уравнению скорости:

$$v = \frac{k_{+2}e}{1 + \frac{K_{es}}{H} + \frac{K_{es}}{k_{+1}H} \left(1 + \frac{H}{K_e}\right) \left(k_{-1} + k_{+2} \frac{H}{K_{es}}\right) \frac{1}{s}}. \quad (4.282)$$

При низких рН лимитирующей оказывается k_{+1} -стадия, а при высоких — k_{+2} -стадия. В результате величина pK в выражении для K_M не является истинной, поскольку она частично определяется кинетическими константами.

2. *Образование непродуктивного комплекса:* Фастрез и Фёршт [1307] отметили, что в том случае, когда субстрат образует с ферментом тупиковый комплекс, графики зависимости V и K_M от рН могут давать кажущееся pK , отличающееся от реального значения, свойственного продуктивному комплексу, если доля тупикового комплекса изменяется с изменением рН. Для системы



в которой распад комплекса E^nS протекает столь медленно, что остальные компоненты системы остаются в равновесии, уравнение скорости имеет вид

$$v = \frac{\frac{k_{+2}e}{1 + \frac{H}{K_{es}} + K \left(1 + \frac{H}{K_{es}'}\right)}}{1 + \frac{\frac{K_s^s}{s} \left(1 + \frac{H}{K_e}\right)}{1 + \frac{H}{K_{es}} + K' \left(1 + \frac{H}{K_{es}'}\right)}}. \quad (4.284)$$

Из этого уравнения следует, что pK , определяемое по графикам зависимости pK_M или $\lg V$ от рН, отличается от истинной величины:

$$pK_{\text{наблюдаемое}} = pK - \lg \frac{1+K}{1+K'}. \quad (4.285)$$

Другие случаи непродуктивного связывания обсуждались Уортоном и др. [5060].

Хотя два рассмотренных выше случая и могут иметь место, следует подчеркнуть, что, как правило, определяемые значения pK являются истинными pK функциональных групп на поверхности фермента и, следовательно, помогают установить химическую природу этих групп. Надо, конечно, учитывать при этом, что совпадение pK , определенной по графику, с pK известной химической группы еще не является достаточным основанием для однозначной идентификации, поскольку сходные значения pK могут иметь разные группы. Кроме того, данная функциональная группа в молекуле фермента может иметь pK , отличающееся от того, которое характерно для нее в свободной аминокислоте или другой небольшой молекуле, поскольку в свернутой определенным образом молекуле фермента на pK данной группы влияют соседние функциональные группы. Изменение pK , однако, обычно относительно невелико и редко превышает две единицы pH [827, с. 445].

Идентификации исследуемой группы может помочь определение влияния температуры на ее pK , позволяющее рассчитать теплоту ионизации (ΔH) группы. Для реакции ионизации



можно записать

$$\Delta H = 2,303RT^2 \frac{d \lg K_a}{dT}, \quad (4.287)$$

или

$$\Delta H = -2,303RT^2 \frac{dpK_a}{dT} = 2,303R \frac{dpK_a}{d(1/T)}.$$

Таким образом, график зависимости pK от $1/T$ является прямой с наклоном $-\Delta H/2,303R$.

В табл. 4.10, заимствованной у Эдсалла [827], приведены pK для ряда групп, присутствующих в белках, а также значения энтальпии (ΔH) ионизации этих групп. Изменение окружения группы, входящей в состав белка, может изменять не только ее pK , но также и ΔH ионизации; поэтому при идентификации специфических групп по результатам измерения ΔH следует учитывать те же ограничения, что и при использовании для этой цели pK .

Интерпретации результатов определения pK помогают в ряде случаев исследования по влиянию изменения диэлектрической постоянной среды на pK . Если в результате диссоциации группы происходит увеличение суммарного заряда, как, например, при диссоциации карбоксильной группы $R-COOH \rightleftharpoons R-COO^- + H^+$, то увеличение диэлектрической постоянной будет

Таблица 4.10

Значения pK и теплоты ионизации некоторых групп, присутствующих в белках

Группа	pK (25 °C)	ΔH , кал/моль
Карбоксильная (α)	3,0—3,2	(± 1500)
Карбоксильная (в аспарагиновой кислоте)	3,0—4,7	(± 1500)
Карбоксильная (в глутаминовой кислоте)	4,4	(± 1500)
Фенольный гидроксил (в тирозине)	9,8—10,4	6000
Сульфгидрильная [356]	8,3—8,6	—
Имидазольная (в гистидине)	5,6—7,0	6 900—7 500
Аминогруппа (α)	7,6—8,4	10 000—13 000
Аминогруппа (α , в цистине)	6,5—8,5	—
Аминогруппа (ϵ в лизине)	9,4—10,6	10 000—12 000
Гуанидиновая (в аргинине)	11,6—12,6	12 000—13 000

способствовать разделению зарядов и, следовательно, pK уменьшится. Если же в результате реакции суммарный заряд не изменяется, как, например, при диссоциации аминогруппы $R-NH_3^+ \rightleftharpoons R-NH_2 + H^+$, то при изменении диэлектрической постоянной pK , скорее всего, изменится незначительно. Такой подход был использован Рабином и др., показавшими, что обе ионизирующиеся группы, которые выявляются при исследовании pH -зависимости активности рибонуклеазы [1340], являются катионными и находятся в кислой форме.

Следует отметить, что точки перегиба на кривых $pH-lg V$ и $pH-pK_M$ характеризуют величины молекулярных констант ионизации (K_1 , K_2 и т. д.), а не констант ионизации групп (K_x , K_y и т. д.). Это можно показать следующим образом. Если в уравнении (4.249) f_x^- является pH -функцией активной формы фермента и может быть представлена кривой, сходной с той, которая изображена на рис. 4.47, то уравнение для средней (независимой от pH) части графика будет иметь вид $pf_x^- = -lg(1 + K_{1y}/K_{1x})$, уравнение для левой части $pf_x^- = -lg(H/K_{1x})$ и уравнение для правой части $pf_x^- = -lg(K_{2y}/H)$. При пересечении в левой части графика первые два выражения должны быть равны и поэтому $H = K_{1x} + K_{1y} = K_1$ [см. уравнение (4.245)]. Аналогично при пересечении в правой части графика должны быть равны первое и третье выражения и поэтому $H = 1/(1/K_{2x} + 1/K_{2y}) = K_2$ по уравнению (4.244).

Если константы значительно отличаются друг от друга, то определенные по графику молекулярные константы будут рав-

ны константам ионизации групп. Только в том случае, когда константы мало отличаются друг от друга, необходимо проводить различие между молекулярными константами и константами ионизации групп, но при этом трудно точно вычислить pK_1 и pK_2 . Если все же такие вычисления удалось сделать, нельзя безоговорочно утверждать, что эти константы являются именно константами ионизации определенных групп.

Наконец, следует отметить, что идентификацию специфической ионизирующейся группы описанным выше способом не следует рассматривать как доказательство участия соответствующей группы в формировании активного центра. Так, при наличии зависящих от pH обратимых конформационных изменений фермента, приводящих к потере активности, могут получаться результаты, трудно отличимые от тех, которые обусловлены ионизацией группы активного центра (если не проведено исследования влияния pH на конформацию фермента). Для химотрипсина убедительно показано, что $pK \sim 8,5$, определенное из графика $\lg V - pH$, связано именно с такими конформационными изменениями (см. [1933]).

Критический анализ проблемы интерпретации влияния pH на активность ферментов был проведен Ноулзом [2498].

Г. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

Влияние температуры на скорость ферментативных реакций может быть обусловлено действием ряда различных факторов. Температура влияет на стабильность фермента; на скорость распада фермент-субстратного комплекса (т. е. на $\bar{k}_{+2}$), определяемую по величине теплоты активации реакции; на сродство фермента к субстрату (т. е. на $\bar{k}_{+1}$ и $\bar{k}_{-1}$); на величину pH-функций одного или всех компонентов (в результате изменения pK , определяемых по теплоте ионизации); на сродство фермента к активаторам или ингибиторам (если таковые имеются); на природу ключевой реакции (если в системе участвуют несколько ферментов с различными температурными коэффициентами) и даже на такие факторы, как изменение концентрации растворенного O_2 вследствие изменения растворимости (в манометрических опытах) или pH используемого буферного раствора.

Многообразие форм, в которых проявляется влияние температуры на скорость ферментативных реакций, дает основание ожидать, что анализ этого влияния должен представлять большие трудности. В действительности, однако, влияние температуры легко исследовать экспериментально. Влияние на стабильность фермента можно изучить, инкубируя фермент при различных значениях температуры в течение определенного периода времени, а затем определяя его активность в той температурной зоне, в которой он остается стабильным. Влияние

температуры на сродство фермента к субстрату или активатору можно элиминировать использованием достаточно высоких концентраций субстрата или активатора, при которых фермент оказывается насыщенным, что дает возможность определить влияние температуры на V . Влияние на константу Михаэлиса можно изучить с помощью обычных методов, в некоторых случаях можно даже определить влияние температуры на каждую из трех констант скорости. Влияние на pK каждого из компонентов реакции определяется с помощью методов, описанных в последнем разделе этой главы. В полиферментных системах каждый фермент обычно можно изучать в отдельности, чтобы таким образом избежать лимитирующих влияний на скорость наблюдаемого процесса со стороны других ферментов. Наконец, влияние температуры на большую часть прочих факторов можно, как правило, исключить, если достаточно тщательно следить за всеми деталями методики проведения опытов.

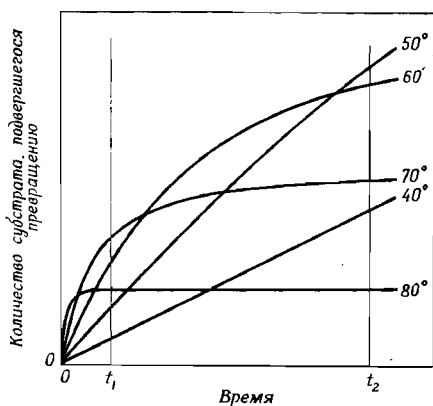
Теплота инактивации ферментов

Если построить серию кривых, отражающих ход ферментативной реакции при различных значениях температуры, то эти кривые будут в общем случае близки к тем, которые изображены на рис. 4.57. Хотя истинная начальная скорость реакции неуклонно увеличивается по мере повышения температуры, количество субстрата, подвергшегося превращению за определенный промежуток времени, вначале повышается, а затем падает, вследствие чего наблюдается кажущийся температурный оптимум. Эта наблюдаемая оптимальная температура не остается постоянной, она падает по мере увеличения промежутка времени, в течение которого рассматривается процесс, что видно, например, из сравнения t_1 и t_2 на рис. 4.57. *Безы*

В данном случае одновременно действуют два различных фактора, определяющих влияние температуры: с одной стороны — увеличение начальной скорости (или истинной каталитической активности фермента), с другой — деструкция фермента при более высоких значениях температуры, обуславливающая непрерывное уменьшение концентрации активного фермента. Все это проявляется в увеличении кривизны приведенных на рис. 4.57 кривых при повышении температуры. Оптимальная температура зависит от соотношения между влиянием температуры на скорость ферментативной реакции и ее влиянием на скорость деструкции фермента, так что наблюдаемые величины температурных оптимумов, в сущности, не имеют особого значения.

Скорость инактивации ферментов в растворе быстро возрастает с повышением температуры; почти во всех случаях инактивация происходит практически мгновенно при значениях

Рис. 4.57. Типичные кривые хода ферментативной реакции при различных значениях температуры, показывающие зависимость кажущегося температурного оптимума от времени наблюдения.



температуры, близких к 100°C , в большинстве же случаев она наступает при температуре около 70°C . Число ферментов, которые устойчивы при температуре 100°C , исключительно мало; классическим примером может служить аденилаткиназа (КФ 2.7.4.3), выдерживающая в течение продолжительного времени температуру 100°C при pH 1. Интересно, однако, что некоторые бактерии, обычно живущие в условиях высоких температур (так называемые термофильные бактерии), содержат ферменты, отличающиеся необычно высокой термостабильностью. Показано, например, что кристаллическая α -амилаза (КФ 3.2.1.1), выделенная из *Bacillus stearothermophilus*, сохраняет 90% своей активности после инкубации при 90°C в течение 1 ч [2965].

Тепловая инактивация ферментов почти всегда является результатом денатурации белка. Температурный коэффициент процесса инактивации значительно выше, чем у какого-либо другого известного процесса, за исключением денатурации белков; величина этого коэффициента может, однако, сильно варьировать — от 10 до нескольких сотен. Строгая пропорциональная зависимость между инактивацией фермента и денатурацией белка была продемонстрирована для пепсина А (КФ 3.4.23.1) и трипсина (КФ 3.4.21.4) Нортропом [3470, 3472]; результаты одного из опытов такого рода представлены на рис. 4.58. В тех случаях, когда при определенных условиях денатурация белка могла быть обращена, параллельно с ренатурацией белка наблюдалось и восстановление активности фермента.

Имеется ряд детальных исследований по термодинамике тепловой денатурации белков [531, 2893, 3706, 4663]; они, однако, относятся к области белковой химии и не будут подробно рассматриваться в этой книге. Измерение ферментативной ак-

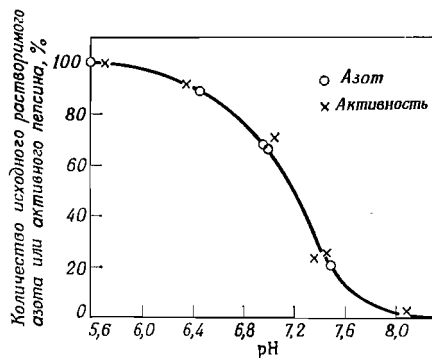


Рис. 4.58. Соответствие между процессами инактивации фермента и денатурации белка [3470]. Фермент — пепсин А (КФ 3.4.23.1), $T = 20^\circ\text{C}$.

тивности вооружает специалиста в области химии белка быстрым методом, с помощью которого он может вести наблюдение за ходом денатурации.

Высокий температурный коэффициент тепловой денатурации означает, что процесс денатурации характеризуется большой величиной теплоты активации. Применив теорию абсолютных скоростей реакций (см. [4472]), можно рассчитать свободную энергию и энтропию активации этого процесса; было найдено, что величины свободной энергии лежат в обычных пределах¹ и высокие значения теплоты активации данного процесса определяются исключительно высокими положительными значениями энтропии активации. Это обстоятельство было интерпретировано как указание на то, что при денатурации белков и ферментов разрывается большое число слабых связей, например водородных. Такая интерпретация согласуется с общепринятым представлением о денатурации как о «раскрывании» молекулы путем разворачивания пептидных цепей или расхождения соседних участков цепей.

Скорость инактивации ферментов (как и вообще денатурации белков) в большинстве случаев сильно зависит от pH раствора. Влияние pH на инактивацию различных ферментов может быть весьма различным. Обычно имеется область максимальной стабильности фермента, причем она не обязательно располагается поблизости от его изоэлектрической точки; ин-

¹ Из приведенной в статье Стирна [4472] табл. 1 следует, что свободная энергия активации процесса денатурации характеризуется замечательным постоянством. Это, однако, является просто следствием того обстоятельства, что исследователи стремились выбирать такие температурные условия, при которых скорость денатурации легко поддается измерению. Так как скорость процесса определяется величиной свободной энергии активации, то естественно, что при этом должны получаться близкие значения для рассматриваемой величины.

активация увеличивается при сдвиге в кислую и щелочную сторону от этой области. Многие ферменты уже при pH 4—5 и 8—10 инактивируются даже при комнатной температуре. Так как параметры инактивации значительно изменяются с изменением pH, то следует проявлять осторожность при выведении каких-либо заключений общего характера из наблюдений, относящихся только к одному значению pH. Другие факторы, помимо pH, например ионная сила, концентрация белка и защитное действие субстратов, ингибиторов и прочих веществ, также могут оказывать значительное влияние на скорость инактивации. Имеет значение также и содержание воды, ибо в высушенном состоянии ферменты весьма термостабильны.

В ряде случаев тепловая денатурация оказывается обратимой. Ярким примером может служить нуклеотид-пирофосфатаза (КФ 3.6.1.9) *Proteus vulgaris*, которая полностью инактивируется за 10 мин при 70°C и полностью реактивируется при охлаждении до 37°C. Непрогретые препараты фермента содержат термолabile ингибитор, и фермент остается неактивным до тех пор, пока ингибитор не будет удален в результате нагревания до 100°C в присутствии субстрата фермента (пирофосфата), который предохраняет фермент от инактивации [4601].

В некоторых случаях обратимой тепловой денатурации оказывается возможным определить равновесие между активной и неактивной формами фермента. Правда, проделать это без нарушения равновесия обычно весьма трудно. Практически единственные ферменты, с которыми были проведены такого рода исследования, — это трипсин (КФ 3.4.21.4) и оксидаза L-аминокислот из змеиного яда (КФ 1.4.3.2) [2373]. Равновесие при изменении температуры довольно быстро смещается. Для трипсина в 0,01 н. HCl, в которой денатурация полностью обратима, процент денатурированного белка в состоянии равновесия равен 33 при 42°C, 50 при 44°C и 80 при 50°C. Процесс денатурации трипсина эндотермичен, теплота денатурации составляет около 68 000 кал/моль, а изменение энтропии (которое не зависит от температуры) 213 кал/(моль·град). Эти величины значительно выше, чем теплота и энтропия активации процесса денатурации, которые имеют значения соответственно 40 200 кал/моль и 44,7 кал/(моль·град). Такое соотношение, т. е. тот факт, что теплота и энтропия определенного процесса выше, чем теплота и энтропия активации того же процесса, совершенно необычно и представляет собой замечательную особенность процесса денатурации белков. Рис. 4.59 изображает это соотношение в схематическом виде. Для сравнения на рис. 4.60 показан более обычный тип соотношений.

Хотя стабильность ферментов, как правило, наиболее высока при низких температурах (поэтому выделение ферментов

обычно проводят в холодной комнате), известны и случаи (правда, редкие), когда стабильность при 0°C оказывается ниже, чем при комнатной температуре. Бактериальная глутаматдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.15) стабильна при 25°C , однако при 0°C ее активность в течение примерно 1 ч снижается приблизительно вдвое [4269]. Падения активности не наблюдается при предварительном добавлении пиридоксальфосфата (фермент представляет собой пиридоксальфосфатпротеид), в присутствии сывороточного альбумина или в условиях высоких концентраций глицина. После инактивации при 0°C частичное восстановление активности наблюдается при добавлении пиридоксальфосфата, однако при добавлении альбумина или глицина или же после повторной инкубации при 25°C активность не восстанавливается. Наблюдаемое поведение объясняют тем, что присоединение простетической группы стабилизирует белок; диссоциация же простетической группы представляет собой экзотермический процесс, и, следовательно, при охлаждении создаются более благоприятные условия для диссоциации.

Другого рода примером может служить неустойчивость аденозинтрифосфатазы митохондрий при охлаждении [3761]. Этот фермент довольно быстро инактивируется при 0°C , но при комнатной температуре он стабилен и даже обнаруживает медленное увеличение активности. Субстрат (АТР), который предохраняет фермент от инактивации при повышении температуры или при диализе, не предохраняет его от инактивации при низкой температуре. При повышении температуры от 0°C до комнатной температуры наступает лишь частичная реактивация, так что снижение активности при охлаждении не может являться просто следствием сдвига равновесия между активной и неактивной формами фермента. Такая чувствительность к охлаж-

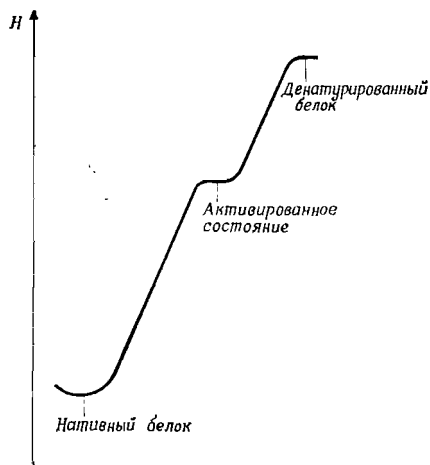


Рис. 4.59. Изменение H для процесса денатурации трипсина (КФ 3.4.21.4).

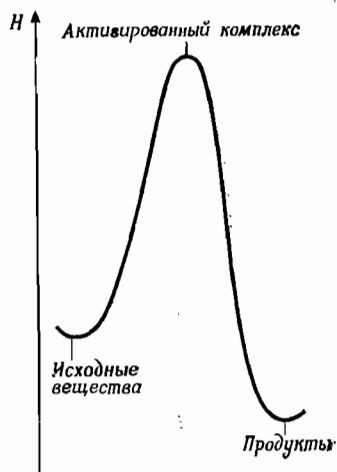


Рис. 4.60. Изменение H для типичной химической реакции.

дению свидетельствует о том, что реакция инактивации характеризуется отрицательным ΔH ; это позволяет предполагать также отрицательное изменение энтропии; последнее обстоятельство является неожиданным, поскольку можно было ожидать, что неактивное состояние имеет менее упорядоченную структуру. Известны, однако, случаи, когда кристаллизация макромолекулярного вещества сопровождается увеличением энтропии [4470]; полагают, что это обусловлено освобождением связанных молекул воды, сопровождающим образование водородных связей.

Те чувствительные к охлаждению ферменты, которые были детально изучены, по-видимому, состоят из субъединиц и активны в полимеризованном состоянии. Процесс полимеризации сопровождается, как можно предполагать, понижением энтропии; если, однако, при этом в результате образования гидрофобных связей между субъединицами происходит освобождение молекул воды, то суммарный процесс может характеризоваться увеличением энтропии и, следовательно, «положительной» теплотой полимеризации. В этом случае низкая температура будет благоприятствовать диссоциации и утрате активности.

Влияние температуры на собственно ферментативную реакцию

Как уже указывалось, ферментативная реакция в целом состоит по крайней мере из трех последовательных стадий, а именно стадии образования фермент-субстратного комплекса, стадии превращения этого комплекса в комплекс фермент—продукт и стадии диссоциации продукта. Влияние температу-

ры на реакцию в целом является результатом ее влияния на каждую из этих стадий. Это означает, что имеется по крайней мере 18 термодинамических параметров для всей прямой реакции, а именно тепловой эффект, свободная энергия и энтропия процесса активации и тепловой эффект, свободная энергия и энтропия собственно процесса для каждой из трех стадий (табл. 4.11). Во всех изученных до сих пор случаях определялась, однако, лишь небольшая часть этих величин. Необходимо признать, что нам известно об указанных величинах очень мало и что те значения, которые приводятся для них в литературе, весьма сомнительны по ряду соображений (этих соображений мы коснемся ниже).

В идеале следовало бы измерить абсолютные величины каждой из отдельных констант скорости, упоминавшихся в разд. Е, и изучить влияние температуры на каждую из них. При наличии этих данных искомые величины могут быть рассчитаны следующим образом: k_{+1}/k_{-1} дает константу равновесия для первой стадии, а величина свободной энергии выражается обычным уравнением

$$\Delta G_1^0 = -RT \ln \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = -2,303 \cdot RT \lg \frac{k_{+1}}{k_{-1}}, \quad (4.288)$$

где ΔG_1^0 — стандартное изменение свободной энергии (т. е. изменение свободной энергии в кал/моль для реакции $E + S \rightarrow ES$ в условиях, когда активности всех компонентов, E , S и ES , равны 1); оно является положительной величиной, если образование ES представляет собой эндотермический¹ процесс; R равно 1,986 кал/(моль·град).

По влиянию температуры на k_{+1}/k_{-1} можно определить тепловой эффект первой стадии процесса с помощью уравнения

$$\Delta H_1^0 = 2,303 \cdot RT^2 \frac{d \lg \frac{k_{+1}}{k_{-1}}}{dT}, \quad (4.289)$$

а энтропию процесса ΔS_1^0 можно найти, зная ΔG_1^0 и ΔH_1^0 , по уравнению

$$\Delta S_1^0 = \frac{\Delta H_1^0 - \Delta G_1^0}{T}. \quad (4.290)$$

Наиболее удобный путь использования уравнения (4.289) состоит в построении графика зависимости $\lg (k_{+1}/k_{-1})$ от $1/T$; наклон полученной прямой будет при этом равен $-\Delta H_1^0/2,303 R$. Если же построить график зависимости $\lg K_s$ от $1/T$, то наклон будет равен $+\Delta H_1^0/2,303 R$.

¹ Точнее — эндергонический. — Прим. перев.

Соответствующие величины для второй и третьей стадий можно определить аналогичным путем с помощью отношений k_{+2}/k_{-2} и k_{+3}/k_{-3} . Искомые величины для стадий обратной реакции равны тем же величинам для соответствующих стадий прямой реакции, но взятым с обратным знаком. Алгебраическая сумма величин ΔH^0 для трех стадий равна общему тепловому эффекту превращения субстрата в продукт, который может быть независимым путем определен по термохимическим данным; подобного же рода суммирование можно провести и для величин ΔG^0 и ΔS^0 .

Далее ради удобства мы будем опускать индекс «нуль», который показывает, что соответствующие величины являются стандартными.

Для того чтобы определить величины энергий и энтропий активации, необходимо использовать теорию абсолютных скоростей реакции, разработанную Эйрингом [1293]. Центральное место в этой теории занимает положение, гласящее, что скорость реакции при данной температуре зависит только от концентрации богатого энергией активированного комплекса, который находится в равновесии с неактивированными молекулами. Согласно этой теории, все активированные комплексы распадаются со скоростью¹, определяемой отношением $k_B T/h$, в котором k_B — константа Больцмана (газовая постоянная в расчете на молекулу), h — постоянная Планка. Другими словами, скорость распада не зависит от природы комплекса.

Таким образом, константа скорости реакции k определяется выражением

$$k = \frac{k_B T}{h} K^*, \quad (4.291)$$

где K^* — константа равновесия между активированным комплексом и неактивированными молекулами. Звездочкой обозначены величины, относящиеся к процессу активации. К этому равновесию можно применить обычные термодинамические уравнения, так что

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* = -RT \ln K^*. \quad (4.292)$$

Подставляя в уравнение (4.291) выражение для K^* , получаем

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R}}. \quad (4.293)$$

¹ Мы опускаем трансмиссионный коэффициент κ , который обычно принимается равным 1.

Допуская, что ΔS^* не зависит от температуры, после логарифмирования и дифференцирования получаем

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta H^*}{RT^2} = \frac{\Delta H^* + RT}{RT^2}. \quad (4.294)$$

Это выражение можно сравнить с эмпирическим уравнением Аррениуса

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E}{RT^2}, \quad (4.295)$$

где E — энергия активации. Следует отметить, что

$$E = \Delta H^* + RT. \quad (4.296)$$

Многие исследователи приводят в своих работах величины теплот активации, которые в действительности являются величинами E ; в этих случаях требуется вносить поправку на величину RT , которая равна приблизительно 600 кал и которой поэтому нельзя пренебречь.

Наиболее удобный путь использования уравнения (4.294) состоит [как и для уравнения (4.289)] в построении графика зависимости $\lg k$ от $1/T$; это уравнение может быть представлено в следующем виде:

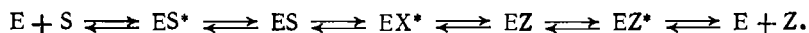
$$d \lg k = \frac{\Delta H^* + RT}{2,303R} \cdot \frac{dT}{T^2} = -\frac{\Delta H^* + RT}{2,303R} \cdot d\left(\frac{1}{T}\right), \quad (4.297)$$

так что построенный график представляет собой прямую с наклоном $-(\Delta H^* + RT)/2,303R$. Важно отметить, что при этом находят величину E , а не ΔH^* . Этот метод позволяет непосредственно определять скорости, выраженные в произвольных единицах, так как любая постоянная величина будет влиять лишь на положение кривой, но не на ее наклон.

ΔG^* , т. е. свободную энергию активации, можно определить, зная k , с помощью уравнения (4.293); для этой цели k должно быть выражено в абсолютных единицах. Например, из уравнения (4.17) следует, что $k_{+2} = V/e$; таким образом, в этом случае необходимо знать молярную концентрацию активных центров. При этом обычно предполагается использование чистых ферментов с известной молекулярной массой. ΔS^* (энтропию активации) можно затем определить по уравнению (4.292).

Нетрудно заметить, что имеется определенная аналогия между теорией абсолютных скоростей реакций и михаэлисовской теорией действия ферментов, так как каждая из этих теорий предусматривает образование и распад активного комплекса, который находится в равновесии с исходными реагирующими веществами. Однако фермент-субстратный комплекс Михаэлиса и активированный комплекс Эйринга находятся в

совершенно разных состояниях. Комплекс Михаэлиса не активирован в физическом смысле, для того чтобы прореагировать, он еще требует тепловой активации. В период соединения E и S при образовании комплекса Михаэлиса должен образоваться переходный активированный комплекс, и именно эта стадия определяет величину k_{+1} . Аналогично этому комплекс EZ для диссоциации также требует тепловой активации. В рассматриваемой простой системе участвуют, таким образом, три активированных и два неактивированных комплекса:



Энергетические взаимоотношения различных комплексов в этой системе может пояснить схема, приведенная на рис. 4.61, *A* и *B* [1555]. На этой схеме представлены величины ΔH , однако подобные же схемы могут быть составлены и для величин ΔG и ΔS . Связывание фермента с субстратом или продуктом может быть либо экзотермическим, либо эндотермическим процессом; на приведенных схемах образование ES считается экзотермическим, а связывание E и Z — эндотермическим процессом. Рис. 4.61, *A* относится к прямой реакции, а рис. 4.61, *B* — к обратной реакции, катализируемой тем же самым ферментом; в каждом случае отдельные стадии пронумерованы в том порядке, в каком они следуют друг за другом в ходе реакции. Неактивированным комплексам соответствуют «ямы» на графиках, а активированным комплексам — пики; высота каждого пика по отношению к глубине соседней «ямы» характеризует теплоту активации или, другими словами, энергетический барьер, который должен быть преодолен на данной стадии. Величины ΔH одинаковы для обоих направлений реакции, изменяется только их знак. Величины же теплот активации различны. Сложение отдельных ΔH дает ΔH для суммарной реакции.

EX^* — активированный комплекс как для превращения ES в EZ , так и для обратной реакции; иными словами, мы принимаем, что один и тот же комплекс участвует в реакциях в обоих направлениях. Для каждой из стадий разность между величинами ΔH^* и ΔH равна величине ΔH^* для процесса, идущего в обратном направлении. Разность между суммой величин ΔH^* для прямой и обратной реакций равна ΔH суммарной реакции.

Пути расчета всех рассматриваемых термодинамических величин по данным измерений отдельных констант скорости суммированы в табл. 4.11. По-видимому, нет такого фермента, для которого был бы определен столь полный набор термодинамических характеристик, хотя несколько весьма детальных исследований были проведены с некоторыми гидролазами, катализирующими практически необратимые реакции (см., на-

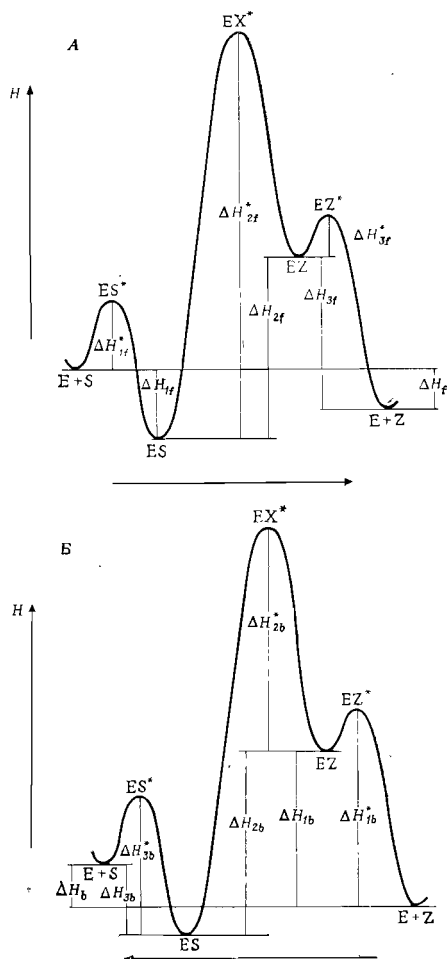


Рис. 4.61. Изменение H для типичной обратимой ферментативной реакции. А. Прямая реакция. Б. Обратная реакция.

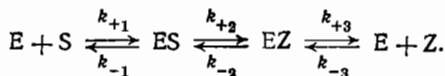
пример, [644, 2360, 4314, 4472]). Имеется настоятельная потребность в получении более полных данных такого рода, и это вполне можно сделать путем использования описанных выше методов при различных значениях температуры. Многие из опубликованных данных были получены с помощью определения влияния температуры на K_M и V , и в большинстве случаев

Таблица 4.11

Определение термодинамических величин по значениям констант скорости¹⁾

Величина	Способ определения	Используемое уравнение	Величина	Способ определения	Используемое уравнение
$\Delta H_f = -\Delta H_b$	По влиянию T на равновесие суммарной реакции	(4.289)	$\Delta G_f = -\Delta G_b$	По равновесию суммарной реакции	(4.288)
ΔH_{1f}	По влиянию T на $k_{+1}/k_{-1} = 1/K_{sf}$	(4.289)	ΔH_{1b}	По влиянию T на $k_{-3}/k_{+3} = 1/K_{sb}$	(4.289)
ΔH^*_{1f}	По влиянию T на k_{+1}	(4.294)	ΔH^*_{1b}	По влиянию T на k_{-3}	(4.294)
ΔG_{1f}	По величине $k_{+1}/k_{-1} = 1/K_{sf}$	(4.288)	ΔG_{1b}	По величине $k_{-3}/k_{+3} = 1/K_{sb}$	(4.288)
ΔG^*_{1f}	По величине k_{+1}	(4.293)	ΔG^*_{1b}	По величине k_{-3}	(4.293)
ΔH_{2f}	По влиянию T на k_{+2}/k_{-2}	(4.289)	ΔH_{2b}	По влиянию T на k_{-2}/k_{+2}	(4.289)
ΔH^*_{2f}	По влиянию T на k_{+2}	(4.294)	ΔH^*_{2b}	По влиянию T на k_{-2}	(4.294)
ΔG_{2f}	По величине k_{+2}/k_{-2}	(4.288)	ΔG_{2b}	По величине k_{-2}/k_{+2}	(4.288)
ΔG^*_{2f}	По величине k_{+2}	(4.293)	ΔG^*_{2b}	По величине k_{-2}	(4.293)
ΔH_{3f}	По влиянию T на $k_{+3}/k_{-3} = K_{sb}$	(4.289)	ΔH_{3b}	По влиянию T на $k_{-1}/k_{+1} = K_{sf}$	(4.289)
ΔH^*_{3f}	По влиянию T на k_{+3}	(4.294)	ΔH^*_{3b}	По влиянию T на k_{-1}	(4.294)
ΔG_{3f}	По величине $k_{+3}/k_{-3} = K_{sb}$	(4.288)	ΔG_{3b}	По величине $k_{-1}/k_{+1} = K_{sf}$	(4.288)
ΔG^*_{3f}	По величине k_{+3}	(4.293)	ΔG^*_{3b}	По величине k_{-1}	(4.293)

¹⁾ Величины, относящиеся к прямой и обратной реакциям, отмечены индексами f и b соответственно. Константы скорости пронумерованы согласно следующей схеме:



Для каждой соответствующей пары величин ΔH и ΔG изменение ΔS можно определить из уравнений (4.290) и (4.292). Следует отметить, что $\Delta H_{1f} = -\Delta H_{3b}$, $\Delta H_{2f} = -\Delta H_{2b}$, $\Delta H_{3f} = -\Delta H_{1b}$. Аналогичные соотношения справедливы и для соотношения между величинами ΔH :

$$\begin{aligned} \Delta H_{1f} + \Delta H_{2f} + \Delta H_{3f} &= \Delta H_f; & \Delta H_{1b} + \Delta H_{2b} + \Delta H_{3b} &= \Delta H_b \\ \Delta H^*_{1f} - \Delta H_{1f} &= \Delta H^*_{3b}; & \Delta H^*_{1b} - \Delta H_{1b} &= \Delta H^*_{3f} \\ \Delta H^*_{2f} - \Delta H_{2f} &= \Delta H^*_{2b}; & \Delta H^*_{2b} - \Delta H_{2b} &= \Delta H^*_{2f} \\ \Delta H^*_{3f} - \Delta H_{3f} &= \Delta H^*_{1b}; & \Delta H^*_{3b} - \Delta H_{3b} &= \Delta H^*_{1f} \\ \Delta H^*_{1f} + \Delta H^*_{2f} + \Delta H^*_{3f} - \Delta H^*_{1b} - \Delta H^*_{2b} - \Delta H^*_{3b} &= \Delta H_f \\ (\Delta H_{1f} + \Delta H^*_{2f}) - (\Delta H_{1b} + \Delta H^*_{2b}) &= \Delta H_f \end{aligned}$$

Аналогичные соотношения справедливы также для величин ΔG и ΔS .

значение результатов оказывается сомнительным, как это будет видно из последующего изложения.

Рассматривая вначале вопрос о K_M , отметим, что характер влияния температуры зависит от значений K_M , как это уже подробно обсуждалось ранее в настоящей главе. В двух крайних случаях положение достаточно просто. В одном из них, когда $K_M = K_s = k_{-1}/k_{+1}$, измерения позволяют определить истинную константу равновесия и следует пользоваться уравнениями (4.288) и (4.289), дающими свободную энергию, теплоту и [из уравнения (4.290)] энтропию реакции связывания фермента с субстратом (т. е. ΔG_{1f} , ΔH_{1f} и ΔS_{1f}). В другом крайнем случае, когда $K_M = k_{+2}/k_{+1}$, мы имеем дело с отношением констант скорости двух последовательных реакций, так что график зависимости r_{K_M} от $1/T$ дает нам разность между теплотами активации процессов образования и распада комплекса (т. е. $\Delta H^*_{2f} - \Delta H^*_{1f}$). Для того чтобы определить ΔH^*_{1f} , необходимо знать ΔH^*_{2f} , а эту величину можно определить по влиянию изменения температуры на V . Другой метод определения ΔH^*_{1f} и ΔG^*_{1f} (а следовательно, и ΔS^*_{1f}) состоит в измерении константы скорости реакции при низкой концентрации субстрата, когда течение реакции подчиняется уравнению первого порядка в отношении концентрации субстрата с константой скорости $k_{+2}e/K_M$ (с. 104—105), которая в рассматриваемом случае равна $k_{+1}e$. Следует отметить, что в случае применимости теории Михаэлиса получают величины, относящиеся к процессу соединения фермента с субстратом в целом, тогда как в случае применимости теории Бриггса—Холдейна определяют величины активации (т. е. величины со звездочкой) для процесса соединения фермента с субстратом.

В промежуточном случае, когда K_M является функцией трех констант скорости, положение становится сложным и величины " ΔH ", полученные путем построения графика зависимости r_{K_M} от $1/T$, будут сложными функциями ΔH_{1f} , ΔH^*_{1f} , ΔH^*_{2f} и трех констант скорости. Мы полагаем, что для интерпретации таких данных пока еще не существует надлежащего метода. По всей вероятности, некоторые из приводящихся в литературе величин теплот образования комплексов ES относятся именно к этой категории.

Рассматривая теперь вопрос о влиянии температуры на V , следует отметить, что V пропорциональна k_{+2} только в том случае, если в реакции участвует один промежуточный комплекс; фактически же во многих случаях имеются два или больше комплексов. V , подобно K_M , оказывается при этом сложной функцией нескольких констант скорости, включая константы диссоциации продукта из комплекса с ферментом. Если V зависит только от k_{+2} , то ΔH^*_{2f} можно определить графически по зависимости $\lg V$ от $1/T$ [уравнение (4.294)]. В таком случае,

если только известна концентрация фермента, что дает абсолютную величину k_{+2} , ΔG^*_{2f} можно определить по уравнению (4.293), а ΔS^*_{2f} — по уравнению (4.292). Если же V — сложная функция, то «кажущиеся» величины ' ΔH^* ' и ' ΔG^* ' также будут сложными функциями и их будет трудно интерпретировать без знания величин отдельных констант. В частном случае, когда V/e близко к той константе скорости, которая характеризует стадию, лимитирующую скорость суммарной реакции, определенные графически величины будут относиться именно к этой стадии. Если отдельные стадии реакции характеризуются разными температурными коэффициентами, то возможно, что при разных значениях температуры лимитировать скорость суммарной реакции будут различные стадии; в таком случае между $\lg V$ и $1/T$ не будет существовать линейной зависимости.

Для получения достоверных величин энергии активации E , определяемых графически по уравнению Аррениуса, следует убедиться в том, что при каждом значении температуры была определена истинная величина V . Так как в общем случае K_M зависит от температуры, то не следует полагать, что концентрация субстрата, которая насыщает фермент при одной температуре, будет насыщать его также при других значениях температуры. В идеальном случае V следует определять путем экстраполяции кривой, описываемой уравнением Лайнуивера—Бэрка или другим подходящим уравнением, при каждом данном значении температуры. Пренебрежение этим правилом неоднократно приводило к значительным ошибкам, на что указывает в своей работе Гибсон [1555]. Он отмечает, что если скорости измеряют, как обычно, при одной и той же концентрации субстрата, но при различных значениях температуры, то

$$\Delta H^*_{2f} - \Delta H^*_{2f} = \frac{K_M}{s + K_M} \Delta H'_{1f} = \frac{1}{1 + \sigma} \Delta H'_{1f}. \quad (4.298)$$

В этом уравнении ΔH^*_{2f} — «кажущаяся» теплота активации (без внесения поправки на изменение величины K_M), найденная при постоянной концентрации субстрата и при допущении, что измеренная скорость равна V ; $\Delta H'_{1f}$ — «кажущаяся» теплота связывания фермента с субстратом, полученная по данным о зависимости K_M от температуры. Если величина σ становится достаточно большой, то рассматриваемой поправкой можно пренебречь; так же можно поступить и в том случае, когда $\Delta H'_{1f}$ мало. Гибсон приводит ряд примеров из литературы, в которых подобная ошибка оказывается весьма существенной и в некоторых случаях достигает, вероятно, нескольких тысяч калорий.

В разд. В было показано, что и V , и K_M зависят от ионизации групп в активном центре фермента. Если эти группы характеризуются значительными теплотами ионизации, то ионное

состояние системы будет существенно зависеть от температуры и это будет оказывать влияние на скорость реакций. Например, кривая зависимости рН-активность может изменяться при изменении температуры, в результате чего может сдвинуться значение оптимума рН; иногда изменяется и влияние рН на сродство фермента к субстрату, так что при изменении температуры и прежнем значении рН концентрация субстрата может оказаться уже недостаточной для насыщения фермента. Если не учитывать такого рода изменений, то это приведет к дальнейшим ошибкам при вычислении величин, приведенных в табл. 4.11.

Когда все указанные трудности будут успешно преодолены, мы получим возможность по данным измерений K_m и V при различных значениях температуры определить все величины, приведенные на рис. 4.61, за исключением тех, которые зависят от уровней энергии ES^* и EZ^* (ср. с данными для фумаратгидратазы на рис. 4.66).

Влияние температуры на ферментативные реакции принято выражать с помощью температурного коэффициента Q_{10} , показывающего, во сколько раз увеличивается скорость реакции при повышении температуры на 10° . Из уравнения (4.295) легко показать, что

$$E = \frac{RT^2 \ln Q_{10}}{10}. \quad (4.299)$$

Температурный коэффициент ферментативных реакций обычно лежит в пределах 1—2. Для всех каталитических процессов характерно, что температурный коэффициент катализируемой реакции оказывается ниже, чем температурный коэффициент той же самой реакции, протекающей без участия катализатора. Величина Q_{10} для ферментативных реакций ниже, чем для реакций с неорганическими катализаторами, например с ионами водорода. Так как большинство реакций, катализируемых ферментами, не протекает с измеримой скоростью в отсутствие фермента, то их температурные коэффициенты в отсутствие фермента неизвестны.

Когда одну и ту же реакцию катализируют несколько ферментов, для каждого из них характерна своя величина энергии активации. Если же один фермент действует на несколько субстратов, то часто энергия активации оказывается одинаковой во всех случаях. Таким образом, величина энергии активации, по-видимому, более характерна для фермента, нежели для субстрата. Это можно проиллюстрировать данными, приведенными ниже [4314].

График зависимости скорости реакции от $1/T$ не всегда представляет собой прямую. В ряде случаев наклон графика меняется и он принимает вид ломаной линии. Это означает,

Реакция	Катализатор	E, кал/моль
Гидролиз сахарозы	H+	26 000
» »	«Сахараза» солода	13 000
» »	Дрожжевая «сахараза»	11 000
Гидролиз рафинозы	То же	11 000

что при определенной критической температуре меняется величина энергии активации. Для объяснения этого явления был выдвинут ряд гипотез.

1. Изменение фазового состояния растворителя. Трипсин (КФ 3.4.21.4) и пепсин (КФ 3.4.23.1) изучали при очень низких температурах и в каждом случае наблюдали значительное изменение энергии активации при температурах, близких к 0°C. Для липазы соответствующая величина равна при отрицательных температурах 37 000 кал, а при положительных — 7600 кал. При этом, однако, оказалось, что изменение энергии активации не связано с переходом воды из жидкого состояния в твердое: те же результаты получались и в том случае, когда замерзание предотвращали проведением опыта в условиях высоких концентраций глицерина [4314]. Подобные изменения энергии активации характерны для ряда ферментов, которые образуют комплексы с компонентами мембран. Во многих случаях такие изменения коррелировали с изменением фазового состояния связанных липидов (см., например, [2675, 3801]).

2. Существование двух параллельных реакций с различными температурными коэффициентами (например, двух реакций, катализируемых разными активными центрами). Скорость реакции, характеризующейся более высоким температурным коэффициентом, увеличивается с ростом температуры быстрее, чем скорость второй реакции, так что первая реакция при более высоких значениях температуры становится доминирующей. Поэтому можно было бы ожидать, что при более высоких значениях температуры мы будем наблюдать более высокую энергию активации, и кривая, описываемая уравнением Аррениуса, будет для данного случая вогнутой. Обычно, однако, дело обстоит как раз наоборот. Кроме того, согласно этой теории, отчетливый перегиб кривой может наблюдаться лишь при очень значительных различиях в величине энергии активации.

3. Существование двух последовательных реакций с различными температурными коэффициентами. Реакция с более высоким коэффициентом будет более быстрой при высоких значениях температуры, и процесс в целом будет лимитироваться второй реакцией, энергию активации которой мы будем наблю-

дать в опыте. Это должно дать на графике ломаную линию того типа, который обычно наблюдается в опыте и при котором меньшая энергия активации соответствует более высоким значениям температуры. Кривая, описываемая уравнением Аррениуса, будет в этом случае выпуклой. Теоретическое рассмотрение такой системы приведено у Стирна [4472].

4. Существование фермента в двух формах, обладающих различной активностью. Если фермент существует в двух активных формах, находящихся в равновесии друг с другом, но характеризующихся различными энергиями активации, и если влияние температуры на переход одной формы в другую достаточно четко выражено, то на графике будет наблюдаться отчетливый излом (изменение наклона). Согласно работе [4314], уреазы (КФ 3.5.1.5) в восстановленной форме характеризуется энергией активации 8700 кал, а в окисленной 11700 кал. В опытах с ферментом, находящимся в одной из этих форм, не наблюдалось изменения наклона графика. В слабовосстановительной среде перелом отмечался при 22°C; выше этой температуры наблюдали энергию активации, характерную для восстановленной формы, а ниже — энергию активации, характерную для окисленной формы. Сайзер предполагает, что с повышением температуры фермент довольно быстро переходит из одной формы в другую, однако не вполне ясно, почему должен происходить такой переход. Кистяковский и Ламри [2475] не наблюдали на графиках такого изменения наклона и выдвинули другое объяснение, которое мы обсудим ниже, в п. 5. Массей [3011], изучавший действие фумаратгидратазы в щелочных растворах, наблюдал изменение наклона прямых: более высоким значениям температуры соответствовали более высокие значения энергии активации. Насколько нам известно, это единственный случай, когда график, описываемый уравнением Аррениуса, оказывается вогнутым. Этот график (рис. 4.62) отличается от графика, описывающего действие того же фермента в кислых растворах (см. ниже, п. 6), тем, что он сохраняет свой характер при использовании двух различных субстратов — фумарата и малата; тем, что излому в этом случае не соответствует перегиб на кривой K_m , и тем, что с изменением рН критическая температура изменяется от 22 до 32°C. Массей считает, что мы имеем здесь дело с диссоциацией фермента (при повышении температуры) на субъединицы меньшей молекулярной массы и что реакция, катализируемая субъединицами, характеризуется более высокой энергией активации. Диссоциация на субъединицы, подобно денатурации, может характеризоваться высоким температурным коэффициентом.

Для АТРаза миозина (КФ 3.6.1.3) в определенных условиях, например в присутствии динитрофенола или актина, график, описываемый уравнением Аррениуса, в области 16°C ока-

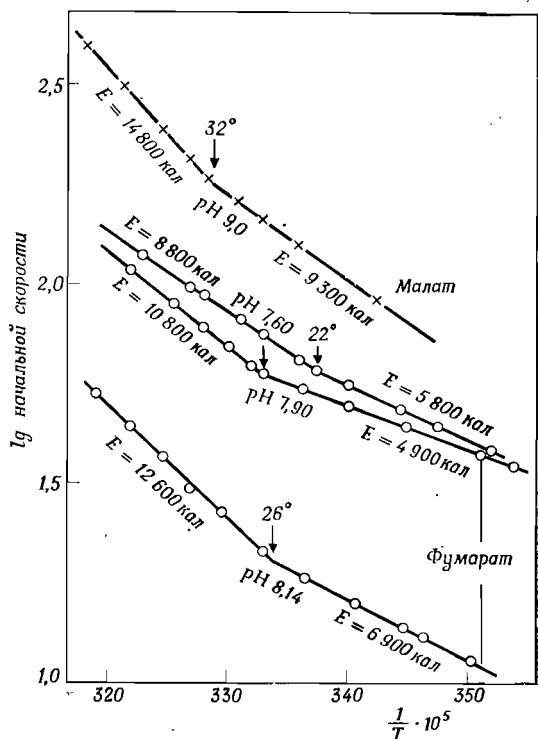


Рис. 4.62. Графическое определение энергии активации с помощью уравнения Аррениуса для прямой и обратной реакций в присутствии фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2) в щелочном растворе [3011].

зывается выпуклым. Если субстратом является не АТР, а ИТР, то и в отсутствие динитрофенола и актина на графике наблюдается излом [2786, 2787]. Это объясняют изменением конфигурации фермента, которое предотвращается при соединении его с субстратами, содержащими 6-аминогруппу.

5. Обратимая инактивация фермента. Кистяковский и Ламри [2475] рассматривают случай, когда неактивная и активная формы фермента находятся в состоянии равновесия, а тепловой эффект превращения одной формы в другую равен ΔH_c . В этом случае графики, описываемые уравнением Аррениуса, будут представлять собой прямые, если фермент будет находиться преимущественно в активной или преимущественно в неактивной форме. В первом случае наклон будет равен E , во втором $E - \Delta H_c$. Кистяковский и Ламри вновь изучили поведение уреазы и пришли к заключению, что сульфит, использованный в качестве мягкого восстановителя, вызывает обратимую инактивацию фермента. Они предполагают, что изменения наклона графиков можно объяснить таким же образом и в случае других ферментов.

6. Изменение наклона, наблюдающееся только на графике для прямой реакции. Массей [3011] в опытах с фумаратгидра-

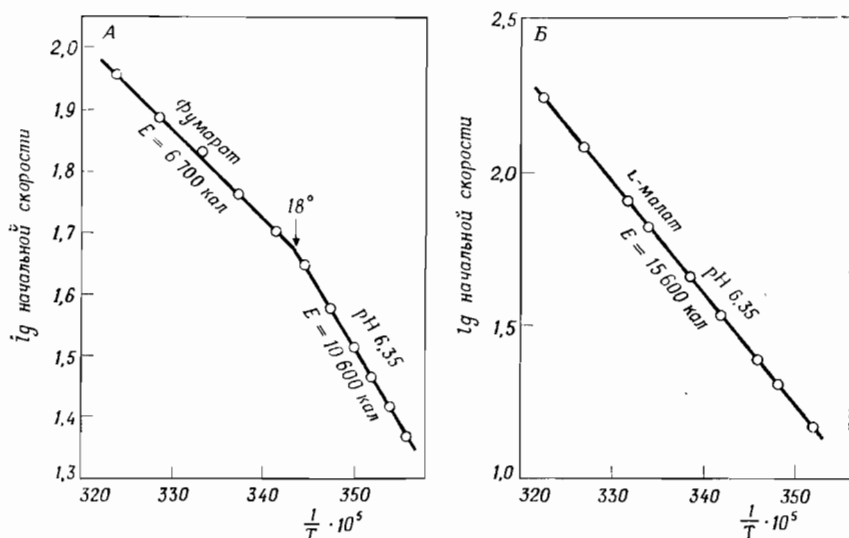


Рис. 4.63. Графическое определение энергии активации по уравнению Аррениуса для прямой и обратной реакций в присутствии фумаратгидратазы в кислом растворе [3011]. А. Прямая реакция. Б. Обратная реакция.

тазой, действующей в кислой среде, наблюдал изменение наклона прямой при температуре около 18°C . Эта критическая температура практически не зависит от pH (рис. 4.63, А). Для реакции, протекающей в обратном направлении (с малатом в качестве субстрата), подобного изменения наклона не наблюдалось (рис. 4.63, Б). Изменение энергии активации при критической температуре сопровождается в этом случае равным и противоположным по знаку изменением величины «кажущейся» теплоты связывания фермента с фумаратом, определяемой по влиянию температуры на K_M (исходя из допущения, что K_M представляет собой константу равновесия) (рис. 4.64). Значения ΔH в двух температурных областях (выше и ниже 18°C) при pH 6,35 приведены на рис. 4.66. Так как изменение наклона графика наблюдается только для реакции гидратации, то Массей предполагает, что оно может быть связано с влиянием температуры на ориентацию молекул воды, участвующих в реакции. Однако на этой основе трудно объяснить кажущееся изменение сродства фермента к фумарату, а также обнаруженное позднее [3012] изменение его сродства к ингибитору (рис. 4.65). По-видимому, в кислой среде при температурах выше и ниже критической существуют два различных фермент-фумаратных комплекса, каждый из которых является реакционно-способным. В нейтральной же среде изменения наклона графика вообще не наблюдается.

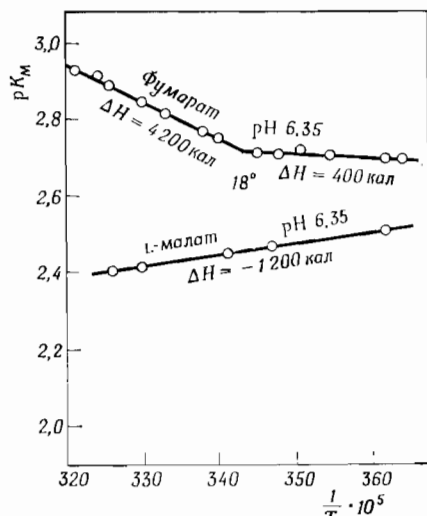


Рис. 4.64. Влияние температуры на величину K_m для прямой и обратной реакций в присутствии фумаратгидратазы в кислом растворе [3011].

В случае обратимых реакций можно по данным измерений K_s и V для прямой и обратной реакций определить теплоту образования ES и EP и энергию активации прямой и обратной реакций (т. е. ΔH_{1f} , ΔH_{1b} , ΔH_{2f} и ΔH_{2b}). По этим данным с помощью последнего уравнения, приведенного в примечании к табл. 4.11, можно вычислить теплоту суммарной реакции и, сравнив ее с известной величиной, таким способом проверить достоверность данных. Следует отметить, что в этом уравнении оба выражения в скобках соответствуют высоте главного пика над исходным уровнем для реакций в прямом и обратном направлениях, а разность между ними должна равняться суммарному тепловому эффекту. Аналогичные расчеты могут быть проведены для свободной энергии и энтропии.

Фумаратгидратаза — единственный фермент, для которого имеются в этом отношении достаточно полные данные [3011]. На рис. 4.66 графически представлены полученные экспериментальным путем значения ΔH для фумаразной реакции в кислой среде, причем можно убедиться, что эти величины хорошо согласуются между собой в пределах ошибки опыта. Это относится к обеим кривым для двух различных температурных областей, в которых, как отмечалось выше, действуют различные фермент-фумаратные комплексы.

Те же данные для фумаратгидратазы приведены также (вместе со значениями величин ΔG и ΔS) в табл. 4.12. Следует помнить, что, в то время как значения ΔH рассчитаны по наклонам графиков для V и K_m , которые постоянны в определенном интервале температуры, но резко изменяются при критической температуре, ΔG определены по действительным значениям

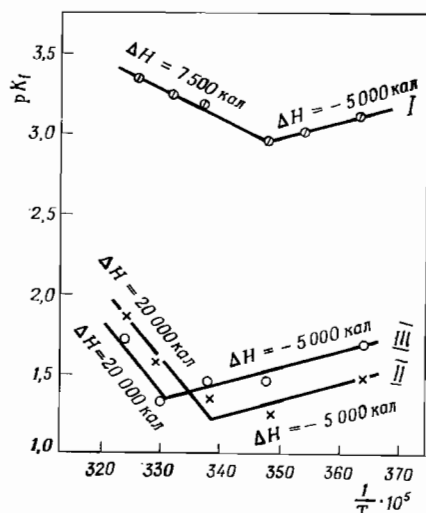


Рис. 4.65. Влияние температуры на K_I для ингибиторов фумаратгидратазы в кислом растворе [3012]. Для прямой и обратной реакций были получены одинаковые значения K_I . I — транс-аконитат; II — сукцинат; III — малонат.

ям V и K_M , которые непрерывно изменяются с температурой без какого-либо резкого изменения в указанной точке. Поэтому величины ΔG следует вычислять для какой-либо определенной температуры; в табл. 4.12 приведены значения ΔG для 18°C.

Было высказано предположение, что удовлетворительные результаты проверки путем суммирования соответствующих величин, иллюстрируемые рис. 4.66, доказывают, что для фумаратгидратазы $K_M = K_s$, а V является функцией одной из констант скорости (такие именно допущения и были сделаны при расчете ΔH). Однако это не так. Подобных результатов суммирования следует ожидать в любом случае из выражения Холдейна (4.45), а применимость этого выражения не ограничивается системами, в которых K_M и V имеют такое простое значение. Из уравнения (4.45) после логарифмирования и дифференцирования (по температуре) получаем

$$\frac{d \lg V_f}{dT} + \frac{d \lg \frac{1}{K_{Mf}}}{dT} - \frac{d \lg V_b}{dT} - \frac{d \lg \frac{1}{K_{Mb}}}{dT} = \frac{d \lg K}{dT}. \quad (4.300)$$

или после умножения на $2,303 RT^2$

$$(\Delta H_{2f}^* + RT \Delta H_{1f}) - (\Delta H_{2b}^* + RT \Delta H_{1b}) = \Delta H. \quad (4.301)$$

Так как величины RT сокращаются, мы получаем уравнение, идентичное по форме последнему уравнению в примечании к табл. 4.11. Символами в кавычках обозначены в уравнении (4.301) величины, полученные графически на основе экспериментальных данных обычным путем. Если бы первоначальные

Таблица 4.12

Термодинамические характеристики фумаратгидратазы при pH 6,35¹⁾

Температура	ΔH_{1f}	ΔH_{2f}^*	ΔH_{1b}	ΔH_{2b}^*	ΔH_f , расч	ΔH
Ниже 18 °С	400	10 000	—1200	15 000	—3400	—3600
Выше 18 °С	4200	6 100	—1200	15 000	—3500	—3600
	ΔG_{1f}	ΔG_{2f}^*	ΔG_{1b}	ΔG_{2b}^*	ΔG_f , расч	ΔG_f
Немного ниже 18 °С	—3600	12 900	—2800	13 600	—1500	—865
Немного выше 18 °С	—3600	12 900	—2800	13 600	—1500	—865
	ΔS_{1f}	ΔS_{2f}^*	ΔS_{1b}	ΔS_{2b}^*	ΔS_f , расч	ΔS_f
Немного ниже 18 °С	13,7	—10	7,1	4,8	—8,2	—9,4
Немного выше 18 °С	26,8	—23,4	7,1	4,8	—8,5	—9,4

¹⁾ При сопоставлении величин ΔH с данными, приведенными на рис. 4.63 и 4.64, по которым они были найдены, следует помнить, что $\Delta H^* = E - RT$ [уравнение (4.296)]. Индекс f относится к гидратации фумарата, индекс b — к дегидратации малата.

допущения были справедливы, то кавычки можно было бы опустить; однако уравнение остается справедливым также и в том случае, если эти величины являются сложными функциями.

Хотя расчеты изменений энтропии, связанных с различными стадиями ферментативной реакции, являются относительно несложными, интерпретация значений полученных данных — весьма трудная проблема. Ее детально рассматривал Лайдлер [2682]; иллюстрацией может служить рассмотрение данных об изменении энтропии при образовании фермент-субстратного комплекса. Для простой реакции $E + S = ES$ можно ожидать, что образование комплекса сопровождается понижением энтропии; действительно, имеются сообщения о том, что на первой стадии действия химотрипсина [4367], карбоксипептидазы [2894] и уреазы [4965] энтропия уменьшается. Однако факторы, вносящие вклад в изменение энтропии при связывании субстрата, более сложны, чем можно было бы предполагать, рассматривая простое уравнение связывания; показано, что у ряда ферментов, в том числе у пепсина [702], трипсина [644] и фумаратгидратазы (табл. 4.12), этот процесс характеризует-

ся положительным изменением энтропии. Один из факторов, который, очевидно, вносит вклад в наблюдаемое изменение энтропии, — это изменение конформации фермента (гл. 6). Конформационные изменения могут приводить либо к разрыхлению, либо к компактизации структуры фермента и, таким образом, сопровождаются либо увеличением, либо уменьшением энтропии. Второй фактор, который может влиять на энтропию процесса, — это изменение связывания растворителя. В любой бимолекулярной реакции всегда происходит изменения энтропии, обусловленные «антисмешиванием», т. е. потерей молекул растворителя при образовании активированного комплекса; этот эффект, однако, весьма невелик (—7,9 энтропийных единиц в водном растворе). Кроме того, изменения полярности фермента в результате образования комплекса с субстратом могут привести либо к связыванию, либо к освобождению молекул воды. Например, если связывание субстрата приводит к нейтрализации заряда, то это ведет к освобождению молекул воды и увеличению энтропии, если же связывание субстрата вызывает увеличение заряда, то возрастает связывание молекул воды, что характеризуется понижением энтропии. Рассмотренные выше эффекты относятся к изменениям энтропии, происходящим не только на стадии связывания субстрата, но и на других стадиях реакции.

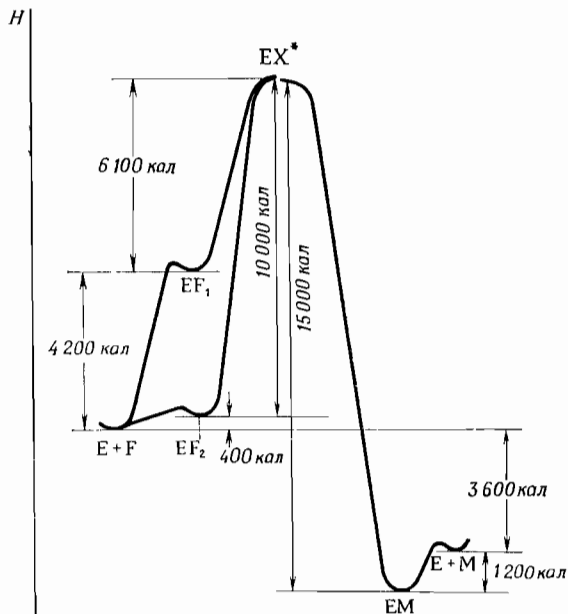


Рис. 4.66. Изменение H для реакции, катализируемой фумаратгидратазой в кислом растворе [3011].

Влияние температуры на состояние ионизации фермента

В разделе, посвященном рН, мы обсуждали влияние изменений в состоянии ионизации различных групп на величину сродства фермента к реагирующим веществам и на скорость ферментативной реакции. Изменения температуры будут в свою очередь вызывать изменения в состоянии ионизации каждой из рассматриваемых групп, и размер этих изменений определяется теплотой ионизации соответствующей группы. Влияние температуры на K_M и V отчасти определяется изменением рН-функций компонентов, в результате которого изменяется характер кривых рН—активность.

Если построить график зависимости pK_M от рН, подобный тем, какие изображены на рис. 4.51—4.56, то положение перегибов на кривых позволит определить величины pK ионизирующихся групп, участвующих в связывании фермента с субстратом. Таким образом, строя кривые для ряда значений температуры, можно по смещению положения точек перегиба определить изменения pK с изменением температуры. Отсюда теплота ионизации соответствующей группы может быть рассчитана по уравнению

$$\Delta H = -2,303 \cdot RT^2 \frac{dpK}{dT}. \quad (4.302)$$

Нам в настоящее время не известны такого рода исследования. Видимо, данная область пока еще совершенно не разработана, и только в одном случае подобные определения были выполнены для ингибитора, при действии тиоцианата на фумаратгидратазу [3018].

Строя график зависимости $\lg V$ от рН, часто можно определить величины pK ионизирующихся групп, которые влияют на распад комплекса ES. Правда, вследствие наложения перегибов такая интерпретация кривых рН—активность при помощи величины pK не всегда оказывается легкой (см. раздел о влиянии рН). Однако в тех случаях, когда pK удается определить, теплоты ионизации соответствующих групп могут быть рассчитаны по величине pK при различных значениях температуры. Это было сделано для трипсина Гутфрейндом [1719], который по величине pK и рассчитанной теплоте ионизации заключил, что ионизирующейся группой оказывается в этом случае остаток гистидина.

Д. ВЛИЯНИЕ ДАВЛЕНИЯ

Лайдлер [2685] отметил, что важную информацию о катализируемых ферментами реакциях можно получить, исследуя

влияние гидростатического давления. Поскольку повышение давления способствует протеканию процессов, идущих с уменьшением объема системы (и наоборот), можно определять изменение объема для каждой стадии реакции, подобно тому, как определяют изменение ΔH при изменении температуры. Давления, необходимые для проведения таких исследований, весьма велики (10 000—100 000 фунтов на квадратный дюйм), и не исключено, что третичная или четвертичная структура исследуемого фермента может при этом измениться. К сожалению, данный подход использовался лишь в очень немногих исследованиях, а анализ результатов не был столь полным, как, например, в рассмотренном выше случае влияния температуры на фумаратгидратазную реакцию. Ряд ферментных систем был исследован при таких концентрациях субстрата, когда скорость реакции, вероятно, равна V , а также при очень низких концентрациях субстрата, когда скорость пропорциональна V/K_M . Эти данные суммированы Лайдлером и Бантингом [2686]; в их работе приведены также соответствующие уравнения.

Е. ПРЕДСТАЦИОНАРНАЯ ФАЗА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

За исключением самых простых случаев, не представляется возможным определить значения констант скорости отдельных стадий ферментативных реакций, основываясь только на данных о начальных скоростях. Для определения этих величин используют два подхода. В первом из них регистрируют ход реакции за очень короткий промежуток времени, предшествующий установлению стационарного (или равновесного) состояния на промежуточных стадиях; этот подход рассматривается в разделе «Методы исследования быстрых реакций». При втором подходе, скачкообразно изменяя условия, выводят систему из состояния равновесия, в котором она находилась, и следят за переходом ее в новое состояние равновесия; этот подход рассматривается в разделе «Релаксационные методы».

Методы исследования быстрых реакций

Выше при рассмотрении кинетики реакций в стационарных и равновесных условиях постулировалось, что в период исследуемой начальной фазы реакций концентрации фермент-субстратных интермедиатов остаются постоянными. Однако установлению стационарного или равновесного состояния предшествует короткий период времени, в течение которого концентрации этих комплексов изменяются, и измерения в этот пере-

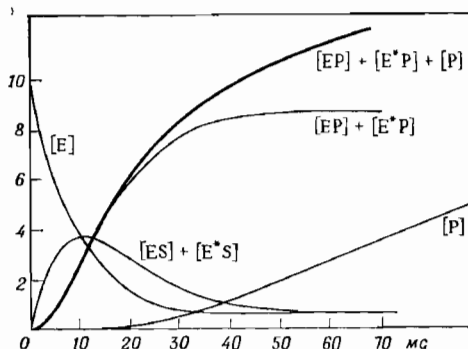


Рис. 4.67. Изменение концентраций интермедиатов и продуктов в предстационарном состоянии для системы $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_{+2}} E^*S \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_{+3}} E^*P \xrightleftharpoons[k_{-4}]{k_{+4}} EP \xrightleftharpoons[k_{-5}]{k_{+5}} E + P$. Кривые построены с помощью ЭВМ [1720]. Суммарная концентрация фермента 10^{-7} М. Исходная концентрация субстрата 10^{-5} М. Константы k_{-1} , k_{-2} , k_{-3} , k_{-4} меньше, чем 10 с^{-1} . $k_{+1} = 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$; $k_{+2} = 10^3 \text{ с}^{-1}$; $k_{+3} = 10^3 \text{ с}^{-1}$; $k_{+4} = 10^2 \text{ с}^{-1}$; $k_{+5} = 10 \text{ с}^{-1}$.

ходный, или предстационарный, период позволяют определить константы скорости многих стадий изучаемой реакции.

На рис. 4.67 показаны изменения концентраций интермедиатов односубстратной реакции в период времени перед достижением стационарного состояния; они свидетельствуют о возможности получения прямой информации об образовании и распаде различных интермедиатов, в том числе тех, стационарная концентрация которых очень мала.

Для регистрации процессов, происходящих в предстационарной фазе, используются несколько методов. Исторически первым из них был метод непрерывной струи, разработанный Хартриджем и Роутоном [1809]. В этом методе два раствора продавливаются через смеситель, а затем через трубку, в которой регистрируется состояние реакционной смеси (рис. 4.68). Зная скорость жидкости и расстояние между смесителем и точкой наблюдения, можно найти время, прошедшее после смешивания, для раствора в любой точке трубки. Таким образом, измерения в различных точках трубки (при постоянной скорости жидкости) позволяют определять параметры системы через различные интервалы времени после смешивания. В другом варианте измерения производят в одной и той же точке, но изменяют скорость жидкости, что также дает информацию о состоянии системы через различные промежутки времени после смешивания.

Позже был предложен метод, в котором реакционная смесь выдавливается из отверстия трубки в виде тонкой струи в ор-

ганический растворитель при столь низкой температуре, что она практически мгновенно замерзает, и состав смеси фиксируется в тот момент, когда она выходит из трубки. До тех пор пока реакционная смесь находится при низкой температуре, ее состав остается постоянным, и определение содержания интермедиатов может быть проведено без ограничений во времени. Эта методика была разработана Брейем и др. [539, 541, 3594]; она использовалась, например, для детальных исследований интермедиатов в реакциях, катализируемых ксантиноксидазой. Интермедиаты регистрировали с помощью ЭПР-спектроскопии после фиксации реакционной смеси путем впрыскивания ее в изопентан при температуре -145°C .

Следует отметить, что метод непрерывной струи не требует использования безынерционного способа регистрации, поскольку «возраст» струи, протекающей около детектора, остается постоянным. Это позволяет применять относительно медленные системы детектирования; например, за ходом реакции, сопровождающейся выделением CO_2 [4005], можно следить с помощью CO_2 -электрода, хотя время регистрации при этом значительно больше, чем продолжительность протекания изучаемой реакции.

Недостаток метода непрерывной струи состоит в том, что он требует относительно больших количеств фермента, поэтому при исследовании ферментов чаще применяют метод остановленной струи, который был разработан Чансом и Гибсоном (см. [1438]) на основе метода непрерывной струи.

Устройство, использующееся в методе «остановленной струи», схематически изображено на рис. 4.69. Как и в рассмотренном выше случае, растворы выдавливаются из двух шприцев через смеситель в камеру наблюдения. Затем смесь попадает в стоп-шприц, с помощью которого поток жидкости резко останавливается, и немедленно начинается регистрация (в течение определенного периода времени) соответствующих

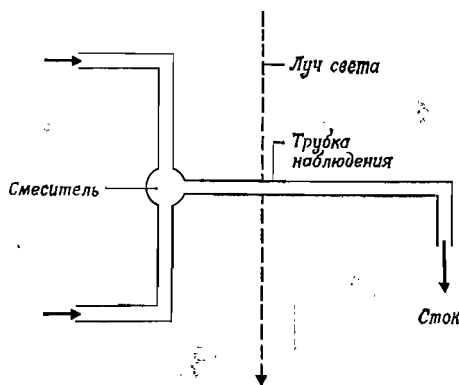


Рис. 4.68. Схема устройства, применяемого в методе непрерывной струи. Систему быстрой регистрации использовать нет необходимости.

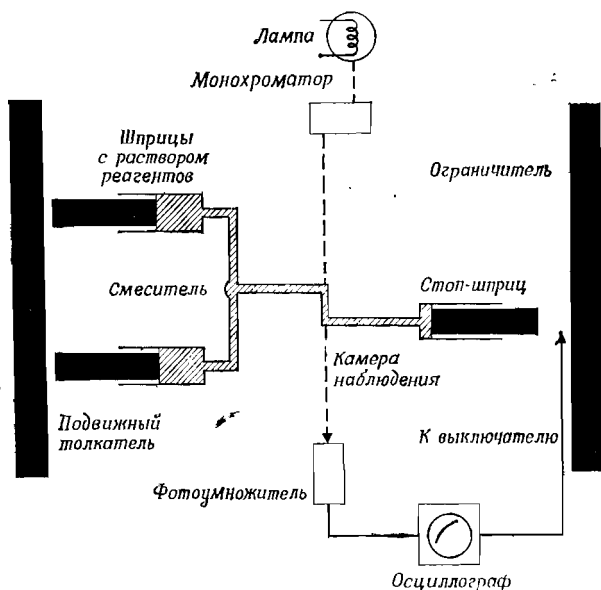


Рис. 4.69. Схема устройства, используемого в методе «остановленной струи»; изменение поглощения света регистрируется на осциллографе [1751]. Камера наблюдения сконструирована так, чтобы длина оптического пути была оптимальной.

параметров стационарной смеси в зоне наблюдения. Ограничитель, который останавливает поток жидкости, одновременно включает регистрирующий прибор, так что измерения параметров реакционной смеси (обычно с помощью осциллографа) могут быть сделаны с того момента, когда она остановилась в зоне наблюдения. Контролировать скорость вытекания жидкости из шприцев нет необходимости, однако время между моментом смешивания и поступления жидкости в зону регистрации должно быть гораздо меньше времени протекания исследуемой реакции, в противном случае начальную часть кривой хода реакции получить не удастся. Все это требует быстрого смешивания реагентов; в некоторых случаях поршни шприцев перемещают вручную, однако в более сложных приборах используется автоматическая система перемещения, например с помощью сжатого воздуха. Методы регистрации также должны быть достаточно быстрыми; часто для этой цели используют спектрофотометрию или флуориметрию.

При исследовании предстационарной фазы ферментативных реакций наиболее часто применяют струевые методы; они позволяют регистрировать процессы, происходящие за время порядка миллисекунд. Иногда удается исследовать кинетику процесса в предстационарном состоянии, не прибегая к относитель-

но сложным струевым методам, а иницируя реакцию вспышкой света. Такой метод был использован Гибсоном [1559] при изучении связывания окиси углерода с миоглобином после предварительной фотодиссоциации комплекса, а также при исследовании функционирования химотрипсина; в последнем случае очень плохой субстрат, *n*-нитрофениловый эфир *n*-нитро-*цис*-коричной кислоты, превращался в гораздо более эффективно атакуемый *транс*-изомер при облучении фермент-субстратного комплекса вспышкой ультрафиолетового света [365].

Совершенно другой подход для изучения промежуточных соединений в предстационарной фазе был предложен в работе [1146]: автор проводил исследования при очень низкой температуре, чтобы замедлить процессы. Используя смеси органический растворитель — вода, можно проводить опыты при температуре -50°C , при которой продолжительность предстационарной фазы значительно увеличивается. Однако такое изменение условий функционирования фермента может существенно повлиять на кинетический механизм, поэтому трактовать получаемые результаты нужно с осторожностью, если речь идет о действии фермента в «нормальных» условиях. К сожалению, до настоящего времени не проведено детального сопоставления результатов, полученных низкотемпературными и струевыми методами.

Особый случай представляют системы, в которых фермент действует на очень плохой субстрат и стадии реакции столь

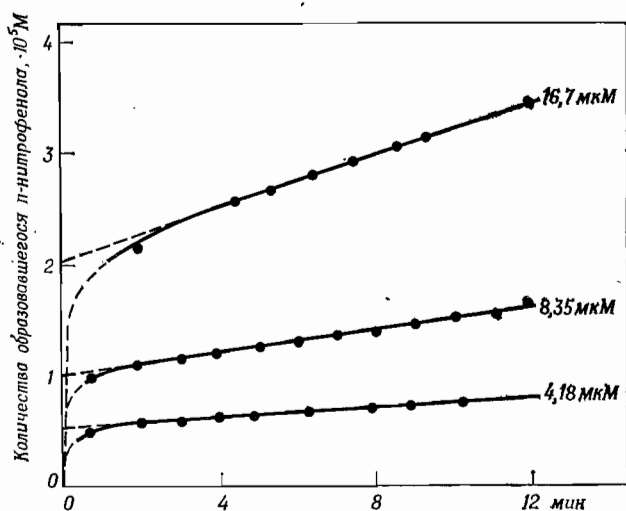
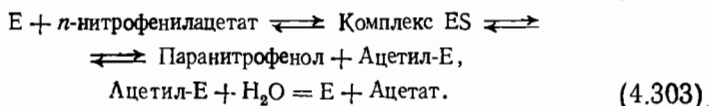


Рис. 4.70. Гидролиз *n*-нитрофенилэтилкарбоната при различных концентрациях химотрипсина, которые указаны справа от кривых [1801]. Концентрация субстрата $5 \cdot 10^{-4}$ М, рН 7,6, 20°C .

медленны, что можно регистрировать образование промежуточных соединений без применения специальных методов. Такая картина наблюдается при гидролизе *n*-нитрофенилацетата химотрипсином [1801]:



Стадию образования ацетил-E можно исследовать, регистрируя спектрофотометрически при щелочных рН освобождение *n*-нитрофенолят-иона, придающего раствору желтую окраску. Временной ход такой реакции при различных концентрациях химотрипсина показан на рис. 4.70 (медленно реагирующим субстратом здесь является *n*-нитрофенилэтилкарбонат) (ср. с рис. 4.73). Сначала наблюдается быстрое освобождение *n*-нитрофенола, соответствующее образованию ацилфермента (в приведенном случае около 1,2 моль на моль фермента), затем следует медленная стационарная фаза, соответствующая лимитирующей стадии — гидролизу ацилфермента.

Анализ результатов исследований быстрых реакций

Используя адекватные методы регистрации, можно изучать изменение концентраций либо фермент-субстратных комплексов, либо свободного или входящего в состав комплекса продукта; анализ этих данных позволяет определить константы скорости отдельных стадий суммарной реакции. Для интерпретации результатов следует использовать кинетические уравнения для зависящих от времени процессов. Ранее в этой главе мы занимались в основном анализом влияния различных факторов на начальную скорость реакции; в этом разделе будут рассмотрены кривые, характеризующие временной ход реакции, для анализа которых применимы некоторые хорошо известные уравнения физической химии.

Для простой реакции



являющейся реакцией первого порядка (т. е. реакцией, скорость которой пропорциональна первой степени концентрации А), имеет место соотношение

$$-\frac{da}{dt} = k_{+1}a. \quad (4.305)$$

Интегрируя это уравнение и обозначив через a_0 начальную концентрацию А, получим

$$-\ln \frac{a}{a_0} = k_{+1}t = \ln a_0 - \ln a, \quad (4.306)$$

или

$$a = a_0 e^{-k_{+1}t}. \quad (4.307)$$

Обозначив через b концентрацию В, имеем $a = a_0 - b$, так что

$$a_0 - b = a_0 e^{-k_{+1}t}. \quad (4.308)$$

Если следить за образованием В, то можно записать

$$\ln a_0 - \ln (a_0 - b) = k_{+1}t = \ln b_\infty - \ln (b_\infty - b), \quad (4.309)$$

полагая, что концентрация В равна нулю при $t=0$ и b_∞ при $t \rightarrow \infty$.

Известны несколько методов графического анализа систем первого порядка; многие из них рассмотрены Лайдлером [2685]. Наиболее простой метод состоит в построении графика зависимости $\ln a$ от t ; если имеет место кинетика первого порядка, то получается прямая с наклоном $-k_{+1}$. В координатах $\{t; \lg a\}$ наклон прямой будет равен $-2,303 k_{+1}$. Если регистрируется образование В, для построения рассмотренного выше графика необходимо знать либо b_∞ , либо a_0 , однако определить эти величины с достаточной точностью не всегда удастся. Полезный метод построения графиков первого порядка для случаев, когда не известны ни начальные, ни конечные концентрации компонентов, был предложен Гуггенгеймом [1701]. Сначала определяют b при значениях t , лежащих в достаточно широком интервале. Затем проводят вторую серию опытов, определяя b' при временах $t+t'$, где t' — постоянный интервал времени. В случае кинетики первого порядка график зависимости $(b-b')$ от t будет прямой с наклоном $-k_{+1}$.

Для обратимой реакции первого порядка



скорость образования В равна

$$\frac{db}{dt} = k_{+1}a - k_{-1}b = k_{+1}(a_0 - b) - k_{-1}b. \quad (4.311)$$

В равновесии

$$k_{+1}a_{\text{eq}} = k_{-1}b_{\text{eq}}, \quad \text{или} \quad k_{+1}(a_0 - b_{\text{eq}}) = k_{-1}b_{\text{eq}}. \quad (4.312)$$

Исключая a из двух последних уравнений, получаем

$$\frac{db}{dt} = (k_{+1} + k_{-1})(b_{\text{eq}} - b). \quad (4.313)$$

Это выражение по виду есть уравнение первого порядка, но кажущаяся константа скорости первого порядка является суммой двух констант скорости первого порядка. Поскольку, однако, отношение этих констант равно константе равновесия, можно найти значение каждой константы в отдельности.

В другом варианте, если величина a_0 установлена достаточно точно, из уравнений (4.311) и (4.312) можно исключить k_{-1} ; тогда

$$\frac{db}{dt} = \frac{k_{+1}a_0}{b_{eq}} (b_{eq} - b). \quad (4.314)$$

Если в момент времени $t=0$ концентрация В равна нулю, после интегрирования получаем

$$\frac{b_{eq}}{a_0} \ln \frac{b_{eq}}{b_{eq} - b} = k_{+1}t. \quad (4.315)$$

Таким образом, если известны b_{eq} и a_0 , то по изменению b во времени можно рассчитать k_{+1} .

Рассмотрим теперь реакцию второго порядка



Скорость образования Р равна

$$\frac{dp}{dt} = k_{+1}ab. \quad (4.317)$$

[Вместо В в реакции может участвовать вторая молекула А; в этом случае в (4.317) ab нужно заменить на a^2 .] Константа скорости второго порядка k_{+1} имеет размерность концентрация⁻¹·время⁻¹ (обычно М⁻¹·с⁻¹), в то время как размерность константы скорости первого порядка — время⁻¹ (обычно с⁻¹).

Если в реакции участвуют две молекулы А, то интегрирование уравнения $dp/dt = k_{+1}a^2$ дает

$$\frac{1}{a} - \frac{1}{a_0} = k_{+1}t. \quad (4.318)$$

Таким образом, график зависимости $1/a$ от t будет прямой с наклоном k_{+1} . Однако, когда А и В различны, интегрирование (4.317) приводит к более сложному уравнению:

$$\frac{1}{a_0 - b_0} \ln \frac{b_0a}{a_0b} = k_{+1}t. \quad (4.319)$$

Если a_0 и b_0 известны и регистрируется образование Р, то k_{+1} можно определить по графику зависимости p от t , поскольку $a = a_0 - p$, а $b = b_0 - p$. Обычно, однако, условия проведения опытов выбирают таким образом, что система упрощается. Одно

из таких условий — равенство начальных концентраций реагентов: если $a_0 = b_0$, то, очевидно, (4.319) упрощается до (4.318). При другом подходе используют очень высокую концентрацию одного из реагентов; например, если в (4.316) $a \gg b$, то за время протекания реакции концентрацию А можно считать постоянной. Тогда после интегрирования уравнения (4.319) получаем выражение

$$\ln b_0 - \ln b = a_0 k_{+1} t = k'_{+1} t, \quad (4.320)$$

которое есть уравнение псевдопервого порядка: константа скорости k'_{+1} , определяемая по полулогарифмическому графику, является произведением константы скорости второго порядка k_{+1} на a_0 .

Если реакция второго порядка обратима,



то при условии, что $a_0 = b_0$, находим следующее выражение для скорости (в интегральной форме):

$$\frac{p_{eq}}{a_0^2 - p_{eq}^2} \ln \frac{p_{eq}(a_0^2 - p_{eq})}{a_0^2(p_{eq} - p)} = k_{+1} t. \quad (4.322)$$

Если в результате реакции образуются два продукта,



то, принимая, что для любого момента времени $a_0 = b_0$, $p = q$ и $p = 0$ при $t = 0$, находим, что

$$\frac{p_{eq}}{2a_0(a_0 - p_{eq})} \ln \frac{p(a_0 - 2p_{eq}) + a_0 p_{eq}}{a_0(p_{eq} - p)} = k_{+1} t. \quad (4.324)$$

Как обсуждалось выше, ферментативные реакции часто подчиняются кинетике первого порядка, но в тех условиях, при которых определяется скорость, их можно считать реакциями псевдонулевого порядка. Концентрация фермента-катализатора во время реакции остается постоянной, и если концентрация субстрата велика по сравнению с K_M , то уравнение Михаэлиса (4.16) упрощается до $v = k_{+2}e$, которое является уравнением нулевого порядка. При низкой концентрации субстрата

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V}{K_M} s, \quad (4.325)$$

т. е. выражение для скорости является уравнением первого порядка. Поскольку, однако, начальная скорость определяется в течение малого интервала времени, так что s можно считать постоянной, реакция оказывается «линейной» (псевдонулевого порядка).

Следует учитывать и реакции, значительно более сложные, чем реакции второго порядка. Для реакции n -го порядка типа



уравнение скорости имеет вид

$$\frac{dp}{dt} = k_{+1}(a_0 - p)^n. \quad (4.327)$$

После интегрирования получаем

$$\frac{1}{n-1} \left(\frac{1}{(a_0 - p)^{n-1}} - \frac{1}{a_0^{n-1}} \right) = k_{+1}t. \quad (4.328)$$

Столь сложные уравнения, однако, вряд ли можно применять при анализе реальных ферментных систем; чаще всего при использовании методов регистрации быстрых реакций приходится проводить разграничение между реакциями первого и второго порядков и определять соответствующие константы скорости. Различить реакции первого и второго порядков позволяют рассмотренные выше графические методы, поскольку линейность соответствующего графика является указанием на определенный порядок реакции.

Этой же цели может служить и еще один метод — определение полупериода реакции, т. е. времени превращения половины исходного количества реагента(ов). В случае реакций первого порядка полупериод ($t_{1/2}$) можно определить, подставив $a_0/2$ вместо a в уравнение (4.306). Тогда

$$t_{1/2} = \ln 2/k_{+1} = 0,69/k_{+1}. \quad (4.329)$$

В данном случае полупериод не зависит от исходной концентрации A . Для реакции второго порядка $2A \rightarrow P$, подставляя $a_0/2 = a$ в уравнение (4.318), находим

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_{+1}a_0}; \quad (4.330)$$

в этом случае полупериод тем больше, чем меньше a_0 .

Ситуации, рассмотренные выше, однако, значительно проще, чем те, которые встречаются при исследовании ферментативных реакций, проходящих чаще всего через ряд последовательных стадий. Простой двухстадийный процесс был рассмотрен Гутфрейндом [1721] и Халфордом [1751]. Для системы



можно записать уравнение, аналогичное (4.307):

$$[a = a_0 e^{-k_{+1}t}, \quad (4.332)$$

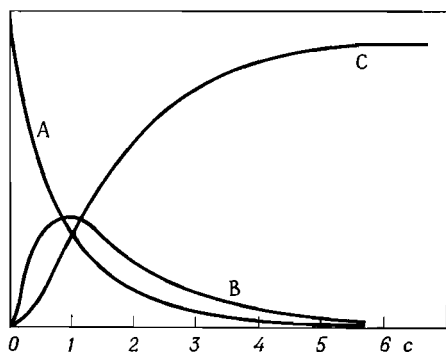


Рис. 4.71. Изменение концентраций компонентов в системе $A \rightarrow B \rightarrow C$. Кривые построены с помощью ЭВМ [1721]. Константы скорости обеих стадий равны 1 с^{-1} ; стадии считаются необратимыми.

и поскольку

$$\frac{db}{dt} = k_{+1}a - k_{+2}b, \quad (4.333)$$

то

$$\frac{db}{dt} = k_{+1}a_0 e^{-k_{+1}t} - k_{+2}b. \quad (4.334)$$

После интегрирования получаем

$$b = k_{+1}a_0 \frac{e^{-k_{+1}t} - e^{-k_{+2}t}}{k_{+2} - k_{+1}}. \quad (4.335)$$

Если исходные концентрации b_0 и c_0 равны нулю и, следовательно, $a_0 = a + b + c$, можно записать

$$c = a_0 \left[1 + \frac{1}{k_{+1} - k_{+2}} (k_{+2}e^{-k_{+1}t} - k_{+1}e^{-k_{+2}t}) \right]. \quad (4.336)$$

Таким образом, уравнения (4.332), (4.335) и (4.336) описывают изменение во времени концентрации всех трех реагентов; полный анализ системы для определенных значений k_{+1} и k_{+2} проведен с помощью ЭВМ Гутфрейндом [1721] (см. рис. 4.71). Распад А представляет собой простой процесс первого порядка, и, следовательно, k_{+1} легко определить из (4.332). Начальный наклон кривой, соответствующей образованию В, определяется той же самой константой скорости, однако ход кривой отличается от такового для простой реакции первого порядка: концентрация В достигает максимума при $k_{+1}a = k_{+2}b$. Таким образом, если регистрировать одновременно изменения a и b , то нетрудно найти k_{+1} и k_{+2} .

При максимальном значении b

$$\frac{db}{dt} = 0 = k_{+1}a - k_{+2}b. \quad (4.337)$$

Следовательно, скорость убыли А равна скорости образования С. Далее имеем

$$\frac{b}{a} = \frac{k_{+1}}{k_{+2}} \quad (4.338)$$

и из (4.332) получаем

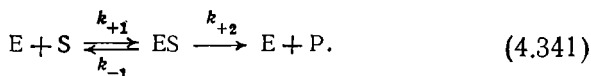
$$b = a_0 \frac{k_{+1}}{k_{+2}} e^{-k_{+1}t}, \quad (4.339)$$

так что

$$c = a_0 \left[1 - e^{-k_{+1}t} \left(1 + \frac{k_{+1}}{k_{+2}} \right) \right]. \quad (4.340)$$

Рассмотренное на рис. 4.71 стационарное состояние является относительно короткоживущим, хотя, конечно, можно подобрать такие константы скорости, что время его жизни будет больше. Кривые, описывающие изменение концентрации реагентов системы (4.331), упрощаются, если одна из констант скорости значительно больше, чем другая; в таком случае образование С будет описываться кривой первого порядка, определяемой только меньшей из двух констант, или другими словами, скоростью лимитирующей стадией.

Гутфрейнд [1721] и Роутон [4004] рассмотрели простую ферментативную реакцию



Скорость образования фермент-субстратного комплекса (концентрация которого обозначена через x) определяется уравнением

$$\frac{dx}{dt} = k_{+1}es - (k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})x. \quad (4.342)$$

Обозначив через p концентрацию продукта, запишем

$$v = \frac{dp}{dt} = k_{+2}x, \quad (4.343)$$

тогда

$$\frac{d^2p}{dt^2} = k_{+2} \frac{dx}{dt}. \quad (4.344)$$

Из (4.342) и (4.344) получим

$$\frac{d^2p}{dt^2} + \frac{dp}{dt} (k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2}) - k_{+1}k_{+2}es = 0. \quad (4.345)$$

Решение этого уравнения, которое применимо как к начальному периоду, так и к стационарному состоянию до тех пор, по-

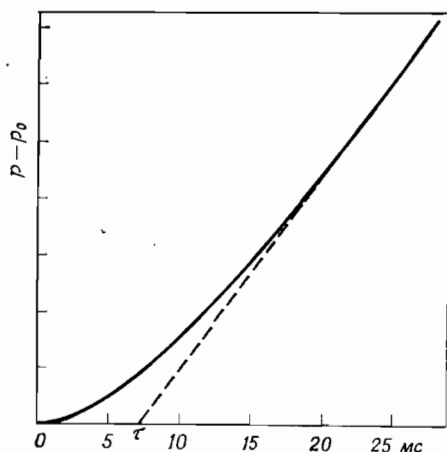


Рис. 4.72. Кинетика предстационарного состояния — метод определения k_{+1} [1718].

ка изменение s можно считать малым по сравнению с его начальной величиной s_0 , имеет следующий вид:

$$p = p_0 + \frac{k_{+2}s_0 e t}{s_0 + \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}} + \frac{k_{+1}k_{+2}s_0 e}{(k_{+1}s_0 + k_{-1} + k_{+2})^2} \left(e^{-(k_{+1}s_0 + k_{-1} + k_{+2})t} - 1 \right), \quad (4.346)$$

где p_0 — начальная концентрация продукта (эта величина входит в уравнение, так как определявшийся Гутфрейндом продукт представлял собой ион водорода). Разлагая экспоненциальный член в ряд, в котором при очень малых t всеми членами после третьего можно пренебречь, получаем более простое уравнение, применимое только к начальной фазе ускорения реакции:

$$p - p_0 = \frac{k_{+1}k_{+2}e s_0 t^2}{2}. \quad (4.347)$$

Таким образом, измеряя p в течение этой начальной фазы реакции, можно найти величину $k_{+1}k_{+2}e$. Определив V , мы в соответствии с уравнением (4.17) получим значение $k_{+2}e$ и далее сможем вычислить величину k_{+1} ; в то же время, определив K_M , мы найдем величину $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$. Зная эти величины и концентрацию фермента, можно рассчитать все три константы скорости.

Уравнение (4.346) можно использовать и другим путем [1718]. Если построить график зависимости $p - p_0$ от t , то получится определенной формы кривая, приведенная на рис. 4.72. Кривизна ее является следствием наличия экспоненциального члена; когда t становится достаточно большим, так что этим членом можно пренебречь кривая приближается к пунктирной

прямой (см. рис. 4.72), описываемой уравнением

$$p - p_0 = \frac{k_{+2}s_0 e t}{s_0 + K_M} - \frac{k_{+2}s_0 e}{k_{+1}(s_0 + K_M)^2}. \quad (4.348)$$

Если концентрация субстрата достаточно высока для насыщения фермента (s_0 велико по сравнению с K_M), то данное уравнение сводится к

$$p - p_0 = k_{+2} e t - \frac{k_{+2} e}{k_{+1} s_0}. \quad (4.349)$$

Длина отрезка, отсекаемого прямой от оси абсцисс (τ), которую можно получить в результате подстановки $p - p_0 = 0$, равна

$$\tau = \frac{1}{k_{+1} s_0} \quad (4.350)$$

Таким образом, измерение τ позволяет непосредственно определить k_{+1} .

Применимость рассмотренных выше уравнений связана с допущением, что K_M определяется выражением (4.19) Бриггса—Холдейна. Эти уравнения применимы к системам с одним промежуточным комплексом ES, в которых k_{+1} представляет собой константу скорости образования этого комплекса, распадающегося с образованием продукта реакции, и неприменимы к системам, в которых имеются два или более промежуточных комплекса. В таких случаях комплекс ES, образующийся в результате реакции с константой скорости k_{+1} , отличается от комплекса, в результате распада которого образуется продукт реакции. Скорость образования продукта реакции при этом не обязательно пропорциональна концентрации комплекса ES, а выражение для K_M имеет более сложный вид. Скорость образования продукта может лимитироваться одной из промежуточных стадий, например реакцией с константой скорости k_{+3} . В этом случае величина $1/\tau$ не будет являться мерой k_{+1} , а будет зависеть от k_{+3} и, возможно, также от других констант.

Это, однако, легко проверить, так как свободный субстрат не участвует в последующих стадиях и соответствующие выражения не содержат s_0 . Таким образом, если установлено, что τ пропорционально $1/s_0$, то уравнение (4.349) можно считать применимым и с его помощью можно определить k_{+1} ; если же τ не зависит от s_0 , то тогда оно зависит от одной из промежуточных констант (однако не всегда известно, от какой именно).

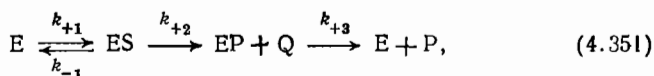
Гутфрейнд [1717, 1718] исследовал ряд реакций гидролиза синтетических эфиров аминокислот, катализируемых протеолитическими ферментами. При гидролизе этилового эфира бензол-L-аргинина трипсином (КФ 3.4.21.4) было найдено, что $k_{+1} > 4 \cdot 10^6$, а $k_{+2} = 15 \text{ с}^{-1}$. Так как $K_M = 10^{-5}$ [393], k_{-1} должно быть больше 25 с^{-1} ; но это только минимальное значение, и,

возможно, что в действительности величина k_{-1} значительно превышает его. При гидролизе этилового эфира ацетил-L-фенилаланина химотрипсином (КФ 3.4.21.1) k_{+1} оказалось больше 10^6 , k_{+2} было равно примерно 10 с^{-1} , а $K_M = 10^{-4}$; поэтому k_{-1} должно быть больше 90 с^{-1} [1722]. При гидролизе этилового эфира бензоил-L-аргинина фицином (КФ 3.4.22.3) k_{+1} составляла $5 \cdot 10^2$, $K_M = 1,5 \cdot 10^{-2}$ и $k_{+2}' = 1,5 \text{ с}^{-1}$; отсюда k_{-1} должно быть равно 6 с^{-1} (k_{+2}' здесь по-прежнему есть константа скорости, определяющая скорость распада ES; в кавычки же эта величина взята потому, что в присутствии фицина расщепление, вероятно, осуществляется в две стадии, и скорость распада может определяться второй из них, так как k_{+2}' имеет одинаковое значение для гидролиза амидов и гидролиза эфиров [1760]).

Во всех этих случаях k_{+2} значительно меньше k_{-1} , так что K_M практически равно K_S . Совпадение может быть даже более полным, чем это явствует из приведенных выше данных, так как, за исключением гидролиза под действием фицина, для k_{-1} были определены только минимальные значения. Отсюда можно заключить, что для действия этих ферментов, особенно химотрипсина, справедливо первоначальное допущение Михаэлиса.

Следует отметить, что начальная фаза ускорения реакции, которую исследуют данным методом, столь кратковременна, что она не может быть обнаружена обычными способами. Выражение «начальная скорость», которым мы пользовались до сих пор, относится не к этой фазе, а к стационарной скорости, устанавливающейся после образования комплекса ES.

В ряде случаев, например при гидролизе *n*-нитрофенилacetата, катализируемом химотрипсином (с. 264), наблюдается начальный всплеск образования продукта, затем следует начальная фаза ускорения, далее реакция замедляется и достигается стационарная скорость. Как отмечалось выше, такое поведение может наблюдаться в системах типа

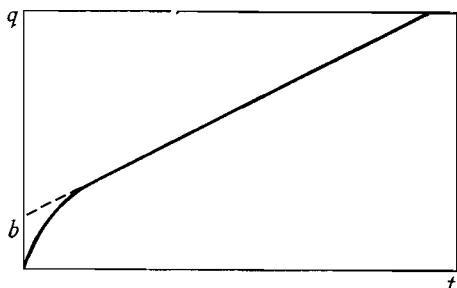


если регистрируют образование Q, а освобождение P является лимитирующей стадией. Оно свойственно некоторым гидролитическим ферментам; соответствующие уравнения приведены в ряде работ (см., например, [1721, с. 199 и далее, 1751, 5290, с. 74 и далее]).

Уравнение для образования Q в интегральной форме имеет вид

$$q = e \left[\frac{k_{+2}k_{+3}}{k_{+2} + k_{+3}} t + \left(\frac{k_{+2}}{k_{+2} + k_{+3}} \right)^2 \left(1 - e^{-(k_{+2} + k_{+3})t} \right) \right]. \quad (4.352)$$

Рис. 4.73. Динамика образования Q в системе (4.351). b — количество Q , высвобождающегося при всплеске.



Кривая, отвечающая такому уравнению (при допущении, что образование ES является быстрой стадией), приведена на рис. 4.73. Ее можно представить в виде суммы двух кривых, соответствующих двум членам, находящимся в квадратных скобках [уравнение (4.352)]. Линейная часть соответствует первому члену, который отражает освобождение P из EP ; на эту часть кривой налагается начальный экспоненциальный всплеск, соответствующий второму члену и отражающий начальное связывание фермента с субстратом, которое сопровождается освобождением эквивалентного количества Q . Это количество можно определить путем экстраполяции линейной части кривой к нулевому моменту времени; таким образом можно выразить концентрацию фермента через концентрацию функционально активных центров. Подставляя $t = \infty$ во второй член, находим, что

Количество освобождающегося при всплеске продукта =

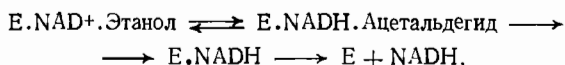
$$= e \left(\frac{k_{+2}}{k_{+2} + k_{+3}} \right)^2. \quad (4.353)$$

Если третья стадия реакции является гораздо более медленной, чем вторая, то количество продукта оказывается равным e .

Для рассмотренной выше системы предполагалось, что образование ES происходит очень быстро и что концентрация субстрата является насыщающей, так что фактически весь фермент вначале находится в составе комплекса ES. Следует также отметить, что молярная концентрация фермента во всех рассматриваемых случаях сравнительно велика, так что изменение измеряемых параметров оказывается достаточно большим. Продукт, образование которого исследуется, не обязательно должен быть свободным, регистрироваться может и связанный с ферментом продукт, причем эта форма продукта может присутствовать в значительном количестве.

В качестве примера можно привести работу Шора и Гутфрейнда [4260], в которой изучали образование NADH, катализируемое алкогольдегидрогеназой печени лошади. Испол-

зую очень высокие концентрации NAD^+ и этанола, авторы могли пренебречь стадией связывания, протекающей в соответствии с кинетикой второго порядка, и исследовать реакцию



регистрируя образование NADH спектрофотометрически по методу остановленной струи. Результаты показали, что за начальным всплеском образования NADH следует более медленная стационарная стадия (рис. 4.73). Это объясняется тем, что спектрофотометрический метод регистрирует как свободный, так и связанный с ферментом NADH , а также тем, что высвобождение NADH является лимитирующей стадией; в результате система оказывается аналогичной системе (4.351). Анализ обеих участков кривой позволяет определить скорость образования и распада комплексов фермент — NADH .

Если вместо образования продукта реакции (4.351) можно регистрировать образование ES , то, определяя скорость образования ES в предстационарном периоде, мы увидим, что концентрация этого комплекса увеличивается, достигая стационарного уровня, который сохраняется в течение той «линейной» фазы, на которой определяется начальная скорость реакции. Концентрацию x комплекса ES для предстационарного периода можно найти с помощью уравнений (4.14) и (4.15); обозначив через x_0 стационарную концентрацию ES , имеем

$$x_0 = \frac{e}{1 + \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \cdot \frac{1}{s}} = \frac{e}{1 + \frac{K_M^S}{s}} \quad (4.354)$$

Изменение концентрации ES в предстационарном периоде описывается уравнением

$$x = \frac{e}{1 + \frac{K_M^S}{s}} \left(1 - e^{-k_{+1}t (K_M^S + s)} \right). \quad (4.355)$$

Следовательно, концентрация x при больших значениях t примерно равна x_0 ; вклад экспоненциального члена существен только при очень малых t .

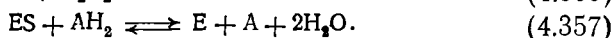
В литературе опубликованы результаты анализа более сложных односубстратных реакций. Общие уравнения для таких систем суммированы в работах Хаммеса и Шиммеля [1755], а также Лайдлера и Бантинга [2686].

Методы исследования быстрых реакций могут, конечно, привлекаться и для изучения ферментативных реакций, в которых участвует более одного субстрата, как это видно на примере рассмотренной выше реакции, катализируемой алкогольдегид-

рогеназой. Фактически впервые этот метод был использован для исследования ферментативных реакций Чансом [726], который работал с пероксидазой (КФ 1.11.1.7) — двухсубстратным ферментом, функционирующим по упорядоченному кинетическому механизму. Пероксидаза является гемсодержащим ферментом, спектр поглощения которого, как известно, изменяется при связывании с субстратом, H_2O_2 . Этот объект обладает еще одним преимуществом, которое состоит в том, что в отсутствие донора водорода комплекс ES может образоваться и существовать без протекания пероксидазной реакции. Благодаря этому комплекс ES можно изучать как в условиях равновесия, так и по ходу реакции. Более того, в присутствии такого донора, как лейкомалахитовый зеленый, пероксидазную реакцию можно исследовать спектрофотометрически по появлению у раствора зеленой окраски. Применение струевого метода позволяет измерить концентрацию комплекса ES и количество образовавшегося продукта в течение очень короткого периода времени (около 2 с) после смешивания; при работе с очень малыми количествами реагентов реакция за это время обычно завершается.

Смешивание фермента с H_2O_2 в отсутствие донора водорода и определение изменения x во времени показали, что связывание происходило очень быстро и практически полностью. Константа скорости бимолекулярной реакции k_{+1} оказалась равной $1,2 \cdot 10^7$ л/(моль·с). Максимальное значение константы равновесия K_s было равно $2 \cdot 10^{-8}$ моль/л; следовательно, k_{-1} составляло $0,2$ с $^{-1}$ или меньше.

Если в смеси присутствуют одновременно фермент, субстрат и донор водорода, то имеют место следующие реакции:



Скорость реакции (4.357) будет, следовательно, пропорциональна концентрации b донора AH_2 . При данной концентрации донора удобно анализировать реакцию, считая ее мономолекулярной реакцией с константой скорости k_{+2} ; следовательно, k_{+2} зависит от концентрации донора, так что

$$k_{+2} = k'_{+2}b, \quad (4.358)$$

где k'_{+2} — истинная константа скорости бимолекулярной реакции.

Величину k_{+2} можно найти двумя разными способами. Если скорость окисления донора (v) и концентрацию комплекса ES

¹ В более поздних работах было показано, что в реакции участвуют два различных комплекса фермента с перекисью водорода и что активный комплекс образуется в результате двух последовательных реакций, которые, однако, могут рассматриваться как одна реакция. Механизм реакции обсуждается детально в гл. 7.

(х) определять одновременно, то k_{+2} может быть вычислена из уравнения

$$v = k_{+2}x. \quad (4.359)$$

Типичный результат опыта с пероксидазой представлен на рис. 4.74. Кривые А и Б были сняты одновременно. Из рис. 4.74, Б видно, что комплекс образуется быстро и что концентрация его в течение непродолжительного времени остается постоянной, а затем падает по мере исчерпания субстрата. Скорость образования продукта, которая определяется наклоном кривой на рис. 4.74, А, изменяется, как это можно видеть, пропорционально концентрации комплекса. Она увеличивается в период образования комплекса, достигает максимума ко времени, соответствующему максимуму кривой на рис. 4.74, Б, и затем медленно спадает до нуля. Определив v из кривой рис. 4.74, А и x из кривой рис. 4.74, Б для данного момента времени, можно найти k_{+2} из уравнения (4.359).

Второй метод определения k_{+2} состоит в измерении площади, ограниченной кривой рис. 4.74, Б и осями координат. Так как количество донора водорода, окисляемого за короткий промежуток времени dt , равно, согласно уравнению (4.359), $k_{+2}xdt$, то полное количество окисленного донора будет равно $k_{+2} \int_0^{\infty} xdt$. Этот интеграл равен площади под кривой на рис. 4.74, Б. Считая, что полное количество окисленного донора равно s_0 , т. е. исходному количеству перекиси водорода, которое нам известно, имеем

$$s_0 = k_{+2} \int_0^{\infty} xdt, \quad (4.360)$$

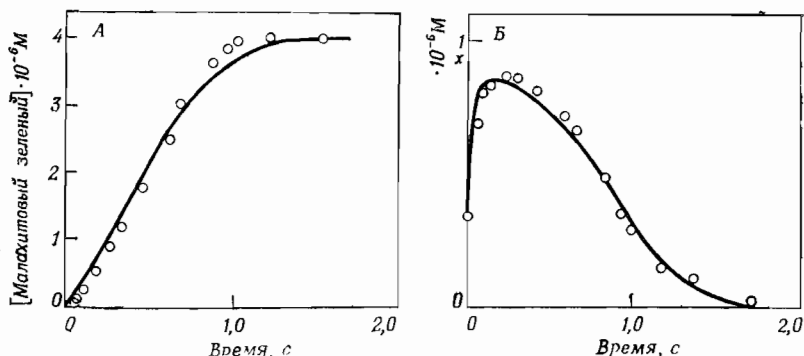


Рис. 4.74. Кривые, описывающие кинетику действия пероксидазы (КФ 1.11.1.7), полученные по методу Чанса [726]. Начальные концентрации: 10^{-6} М пероксидазы хрена, $4 \cdot 10^{-6}$ М H_2O_2 , $15 \cdot 10^{-6}$ М лейкомалахитового зеленого. Ацетатный буфер, рН 4,0. А. Количество образовавшегося продукта. Б. Изменение концентрации комплекса пероксидаза—перекись водорода. Кружки — экспериментальные точки; кривые построены по расчетным данным.

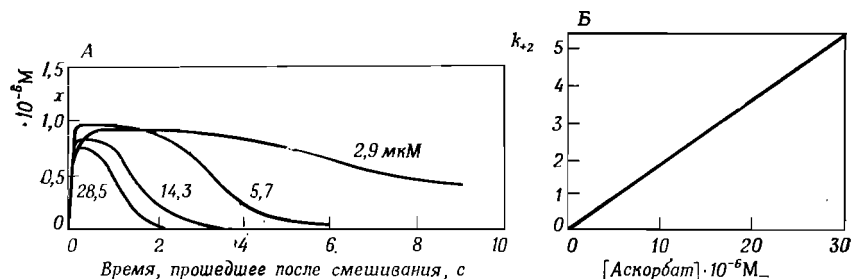


Рис. 4.75. Кривые, описывающие кинетику действия пероксидазы [726]. Начальные концентрации: 10^{-6} M пероксидазы хрена, $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ H_2O_2 . Ацетатный буфер, pH 4,2. А. Экспериментальные кривые (числа у кривых указывают концентрацию аскорбата). Б. Определение величин k_{+2} по второму из двух методов, описанных в тексте.

откуда можно определить k_{+2} . Этот метод не связан с измерением количества продукта окисления и может применяться и в том случае, если доноры водорода дают бесцветные продукты. На рис. 4.75, А представлены данные нескольких типичных опытов с аскорбиновой кислотой в качестве донора водорода, а на рис. 4.75, Б приведена прямая, связывающая рассчитанные значения k_{+2} с концентрацией донора водорода; величина k'_{+2} , согласно этим данным, равна $1,8 \cdot 10^5 \text{ л/ (моль} \cdot \text{с)}$.

Зная три константы скорости, k_{+1} , k_{-1} и k_{+2} , можно рассмотреть значение K_M для данного фермента. Подставляя в уравнение (4.19) значения соответствующих величин, полученные из опыта, результаты которого представлены на рис. 4.74, находим $K_M = (0,2 + 4,2)/1 \cdot 10^7$, или $4,4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. Это значение близко к величине $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, рассчитанной для этих условий по данным Манна [2963] в предположении, что K_M пропорциональна концентрации донора водорода, как это и должно быть в том случае, когда величиной k_{-1} вследствие малости можно пренебречь.

K_M можно также определить по максимальному значению величины x с помощью уравнения (4.15). Преобразуя это уравнение и обозначив максимальное значение x , которое соответствует стационарному состоянию, через x_{max} , имеем

$$K_M = \frac{(e - x_{\text{max}}) a_m}{x_{\text{max}}} \quad (4.361)$$

Величина a_m , т. е. концентрация перекиси водорода при $x = x_{\text{max}}$, равна площади под участком кривой зависимости x от t , ограниченным слева временем смешивания реагирующих веществ, а справа — временем, соответствующим достижению максимального значения x . Подобные расчеты для опыта, результаты которого представлены на рис. 4.74, приводят к зна-

чению $K_M = 4,1 \cdot 10^{-7}$. Эти выводы подтверждаются также совпадением экспериментальных кривых с кривыми, полученными расчетным путем из уравнений при следующих значениях констант: $k_{+1} = 0,9 \cdot 10^7$ л/(моль·с), $k_{-1} = 0$, $k_{+2} = 4,5$ с $^{-1}$ (рис. 4.74). Совпадение значений K_M , определенных различными способами, свидетельствует о правильности результатов.

Полученные данные ясно показывают, что в рассматриваемых условиях K_M для пероксидазы практически равно k_{+2}/k_{+1} , так что эта константа характеризует динамическое состояние, а не термодинамическое равновесие. K_s вносит лишь малый вклад в K_M . Однако k_{+2} зависит от концентрации донора и при уменьшении последней может стать равной или даже меньшей, чем k_{-1} . Таким образом, для одного и того же фермента K_M может принимать значения от $K_M = K_s$ до $K_M = k_{+2}/k_{+1}$. Величина K_s представляет собой результат экстраполяции K_M при k_{+2} , стремящейся к нулю.

В случаях, подобных рассмотренному выше, когда можно изменять k_{+2} независимо от k_{+1} и k_{-1} , например путем изменения концентрации второго реагента, участвующего в реакции распада, можно определить K_s и три константы скорости. Слейтер и Боннер [4321] высказали предположение, что если построить график независимости K_M от V , то он будет представлять собой прямую, отсекающую от оси ординат и оси абсцисс отрезки, равные K_s и $-k_{-1}e$ соответственно (рис. 4.76). В этом легко убедиться следующим образом. Согласно уравнению (4.19), $K_M = K_s + k_{+2}e/k_{+1}e$. Подставляя $V = k_{+2}e$ [уравнение (4.17)], получим

$$K_M = K_s + \frac{V}{k_{+1}e}. \quad (4.362)$$

Для определения абсолютных значений констант скоростей необходимо знать концентрацию фермента, но даже если она неизвестна, можно найти отношение этих констант.

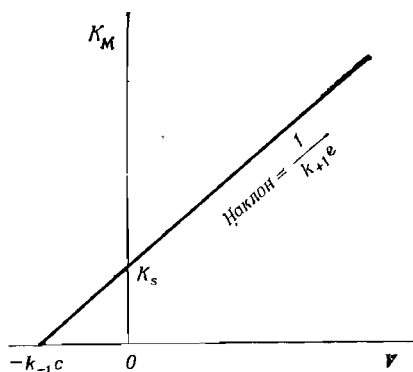


Рис. 4.76. Экстраполяция K_M для определения величины K_s .

Во многих случаях с помощью методов исследования быстрых реакций удается изучать отдельные стадии суммарной реакции. Так, при наличии удобного метода регистрации образования комплекса можно изучать связывание аналогов субстрата, которые действуют как конкурентные ингибиторы. Например, Халфорд и др. [1752] исследовали связывание с щелочной фосфатазой (КФ 3.1.3.1) ингибитора 2-гидрокси-5-нитробензолфосфоната, регистрируя изменения спектра поглощения ингибитора, которые происходят при его связывании. Результаты, полученные методом остановленной струи, показали, что связывание является двухстадийным процессом; после образования комплекса происходит медленное конформационное изменение. Другой подход при изучении связывания состоит в регистрации процесса вытеснения одного субстрата другим. Было показано, что конкурентный ингибитор химотропсина профлавин изменяет свой спектр поглощения при связывании с ферментом; используя это обстоятельство, за связыванием субстрата следили спектрофотометрически по вытеснению связанного красителя [530]. Аналогичная методика применялась в случае алкогольдегидрогеназы печени: регистрировалось вытеснение связанного с ферментом NADH избытком NAD^+ [4260]. Результаты исследования показали, что диссоциация NADH из комплекса является лимитирующей стадией, поскольку рассчитанное значение константы скорости стадии диссоциации оказалось близким к тому, которое было получено для константы скорости стационарной стадии суммарной реакции в тех же самых условиях. Вопросы, касающиеся методов исследования парциальных реакций, детально рассмотрены Гутфрейндом [1721, с. 203].

Релаксационные методы

Как упоминалось выше, разрешаемое время быстрых струевых методов ограничено скоростью смешивания двух реагентов; по техническим причинам время смешивания оказывается не меньшим, чем примерно 1 мс. Таким образом, для исследования более быстрых реакций необходимо использовать другие методы. Когда реакции инициируются светом, разрешаемое время существенно уменьшается, однако этот подход применим только в ограниченном числе случаев. Более общим подходом является регистрация перехода системы в состояние равновесия после относительно небольшого возмущения. С помощью релаксационных методов можно регистрировать скорости реакций, на 7 порядков более быстрых, чем те, которые регистрируются струевыми методами [1212].

Возмущение может быть либо одиночным, либо периодическим; в настоящее время значительно чаще используется первый вариант, на нем мы и остановимся.

Возмущение может быть создано разными способами, но наиболее широко используют два из них. Первый состоит в быстром изменении температуры (температурный скачок), а второй — в быстром изменении давления (скачок давления). Устройство прибора, обычно используемого в методе температурного скачка, схематически изображено на рис. 4.77. Температуру раствора повышают, пропуская через него электрический разряд; при этом необходимо использовать растворы с относительно высокой ионной силой (больше чем примерно 10^{-2} М), поскольку нагревание происходит в результате трения между заряженными частичками, ориентирующимися в поле. В таком аппарате температуру раствора можно повысить на 5° в течение 10 мкс. Поскольку время регистрации относительно невелико (обычно меньше 1 с), последующим охлаждением раствора можно пренебречь. В случае растворов с низкой проводимостью можно использовать другие методы нагревания, например вспышку лазерного излучения.

Для создания скачка давления либо резко снижают давление в системе примерно от 50 атм до атмосферного, либо создают ударную волну давления 500—1000 атм (см. [1847]). Ясно, что температурный скачок сопровождается изменением давления и наоборот, однако при сравнительно небольших изменениях параметров эти вторичные эффекты обычно оказываются несущественными.

Для системы, находящейся в равновесии, например

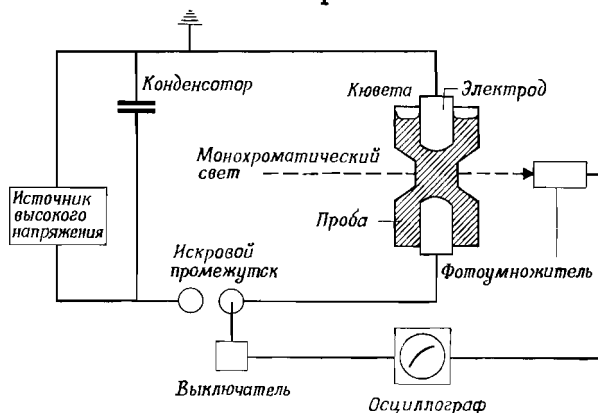


Рис. 4.77. Схема устройства, используемого в методе температурного скачка; нагрев осуществляется за счет джоулева тепла [1751]. Более детально изображена кювета, в которой содержится проба. Релаксационный процесс регистрируется спектрофотометрически с выводом данных на осциллограф. Специальный выключатель позволяет начать регистрацию в тот момент времени, когда через раствор проходит электрический разряд.

имеет место следующее соотношение между константой равновесия реакции и температурой:

$$\frac{d \ln K_s}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}, \quad (4.364)$$

где ΔH^0 — стандартное изменение энтальпии в результате реакции. В случае возмущения, вызываемого скачком давления, соотношение между константой равновесия и давлением имеет вид

$$\frac{d \ln K_s}{dP} = - \frac{\Delta V^0}{RT}, \quad (4.365)$$

где P — давление, ΔV^0 — изменение объема в ходе реакции.

Далее мы остановимся только на регистрации изменений, сопровождающих температурный скачок, однако все приведенные уравнения применимы и к процессам релаксации, которые следуют за скачком давления или другим кратковременным возмущением.

После кратковременного возмущения, которое вызывает небольшое смещение химического равновесия, изменение концентрации каждого из реагентов подчиняется простой экспоненциальной зависимости, каков бы ни был порядок реакции. Например, для системы (4.363) изменение концентрации В описывается уравнением

$$\frac{db}{dt} = k_{+1}(a_0 - b) - k_{-1}b = k_{+1}a_0 - (k_{+1} + k_{-1})b, \quad (4.366)$$

где a_0 — суммарная концентрация А плюс В. Если обозначить равновесную концентрацию В через b_{eq} , то можно записать для состояния равновесия

$$k_{+1}(a_0 - b_{eq}) = k_{-1}b_{eq}. \quad (4.367)$$

Рассматриваемое положение равновесия — это то новое равновесие, которое устанавливается после скачка, а не исходное равновесие (до скачка), и величины k_{+1} и k_{-1} (которые изменились при изменении температуры) также относятся к новым условиям.

Отклонение b от конечной равновесной величины равно $\Delta b = b_{eq} - b$; тогда

$$-\frac{d\Delta b}{dt} = \frac{db}{dt} = k_{+1}a_0 - (k_{+1} + k_{-1})(b_{eq} - \Delta b). \quad (4.368)$$

Из двух последних уравнений следует, что

$$\frac{d\Delta b}{dt} = -(k_{+1} + k_{-1})\Delta b. \quad (4.369)$$

Проинтегрировав это уравнение и подставив $\Delta b = \Delta b_0$ при $t=0$, получим

$$\ln \frac{\Delta b_0}{\Delta b} = (k_{+1} + k_{-1})t, \quad (4.370)$$

или

$$\ln \frac{\Delta b_0}{\Delta b} = \frac{t}{\tau}, \quad (4.371)$$

где τ — константа, называемая временем релаксации, которая в данном случае определяется соотношением

$$\frac{1}{\tau} = k_{+1} + k_{-1}. \quad (4.372)$$

Уравнение (4.369) можно, следовательно, записать в виде

$$\frac{d\Delta b}{dt} = -\frac{\Delta b}{\tau}, \quad (4.373)$$

или в интегральной форме

$$\Delta b = \Delta b_0 e^{-t/\tau}. \quad (4.374)$$

Следовательно, τ можно определить таким же путем, как константу скорости первого порядка, по наклону графика зависимости $\ln(\Delta b_0/\Delta b)$ от времени [уравнение (4.371)]. Такой подход справедлив только при условии, когда $\Delta b_0 \ll b$, т. е. когда возмущение очень мало.

Рассмотрим реакцию связывания субстрата



Обозначим через e_{eq} , s_{eq} и x_{eq} равновесные концентрации фермента, субстрата и комплекса ES, устанавливающиеся после возмущения. Отклонения измеряемых концентраций от равновесных значений определим следующим образом:

$$\Delta e = e_{eq} - e; \quad \Delta s = s_{eq} - s; \quad \Delta x = x_{eq} - x. \quad (4.376)$$

Как и в простом рассмотренном выше случае, можно записать:

$$\frac{dx}{dt} = k_{+1}es - k_{-1}x, \quad (4.377)$$

или

$$\frac{d(x_{eq} - \Delta x)}{dt} = k_{+1}(e_{eq} - \Delta e)(s_{eq} - \Delta s) - k_{-1}(x_{eq} - \Delta x). \quad (4.378)$$

В равновесии

$$k_{+1}e_{eq}s_{eq} = k_{-1}x_{eq}, \quad (4.379)$$

так что

$$\frac{d\Delta x}{dt} = k_{+1}(e_{eq}\Delta s + s_{eq}\Delta e - \Delta e\Delta s) - k_{-1}\Delta x. \quad (4.380)$$

Если член $\Delta e\Delta s$ настолько мал, что им можно пренебречь, и если, кроме того, заменить Δe и Δs на $-\Delta x$ (поскольку $\Delta e = \Delta s = -\Delta x$), то мы получим

$$\frac{d\Delta x}{dt} = -k_{+1}(e_{eq} + s_{eq})\Delta x - k_{-1}\Delta x. \quad (4.381)$$

Сравнение этого уравнения с (4.369) показывает, что оба они имеют одинаковую форму и после их интегрирования получается выражение вида (4.371), но в данном случае

$$\frac{1}{\tau} = k_{-1} + k_{+1}(e_{eq} + s_{eq}). \quad (4.382)$$

Следовательно, для данной системы время релаксации можно определить таким же путем, как и для рассмотренной выше системы; в обоих случаях, если известна константа равновесия K_s реакции, то, зная τ , можно определить константы скорости. Кроме того, для систем, подчиняющихся уравнению (4.382), обе константы скорости можно определить непосредственно по графику зависимости $1/\tau$ от $(e_{eq} + s_{eq})$: наклон прямой равен k_{+1} , а длина отсекаемого отрезка составляет k_{-1} .

Выражения для времен релаксации ряда процессов были суммированы Хофсти [1847]; они приведены в табл. 4.13.

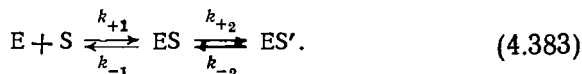
Релаксационные методы могут быть использованы для определения времен релаксации не только одностадийных реакций, но и более сложных систем. В этих случаях анализ экспериментальных данных может оказаться весьма сложным, так как процесс релаксации системы, включающей ряд стадий, не всегда представляет собой простую совокупность независимых процессов релаксации, каждый из которых соответствует опре-

Таблица 4.13

Реакция	Величина, обратная времени релаксации
$A \rightleftharpoons B$	$k_{+1} + k_{-1}$
$A + C \rightleftharpoons B + C$	$k_{+1}c_{eq} + k_{-1}c_{eq}$
$2A \rightleftharpoons A_2$	$4k_{+1}a_{eq} + k_{-1}$
$A + B \rightleftharpoons C$	$k_{+1}(a_{eq} + b_{eq}) + k_{-1}$
$A + B \rightleftharpoons C + D$	$k_{+1}(a_{eq} + b_{eq}) + k_{-1}(c_{eq} + d_{eq})$
$A + B + C \rightleftharpoons D$	$k_{+1}(a_{eq}b_{eq} + a_{eq}c_{eq} + b_{eq}c_{eq}) + k_{-1}$

деленной стадии, поскольку изменения, происшедшие на одной из стадий, могут сказываться на концентрации компонентов, участвующих в других стадиях.

Анализ систем, включающих более одной стадии, можно проиллюстрировать на примере простой двухстадийной реакции



Такие системы анализируются в ряде работ; приведенное ниже рассмотрение основано главным образом на работе Хаммеса и Шиммеля [1755] и Халфорда [1751].

Уравнения скорости для этой системы можно записать в виде

$$\frac{de}{dt} = k_{-1}x - k_{+1}es, \quad (4.384)$$

$$\frac{dy}{dt} = k_{+2}x - k_{-2}y, \quad (4.385)$$

где x и y — концентрации комплексов ES и ES' соответственно. Запишем также два уравнения материального баланса для изменений, которые происходят после возмущения:

$$\Delta e + \Delta x + \Delta y = 0, \quad (4.386)$$

$$\Delta e = \Delta s. \quad (4.387)$$

Подстановка их в (4.384) и (4.385) дает

$$\frac{d\Delta e}{dt} = [k_{+1}(e_{eq} + s_{eq}) + k_{-1}] \Delta e - k_{-1} \Delta y, \quad (4.388)$$

$$\frac{d\Delta y}{dt} = k_{+2} \Delta e + (k_{-2} + k_{+2}) \Delta y. \quad (4.389)$$

Правые части обоих уравнений представляют собой линейные комбинации двух (концентрационных) переменных, т. е.

$$\frac{d\Delta e}{dt} = a_1 \Delta e + a_2 \Delta y, \quad (4.390)$$

$$\frac{d\Delta y}{dt} = a_3 \Delta e + a_4 \Delta y, \quad (4.391)$$

где a_1 — a_4 — константы (при данных условиях), определяемые уравнениями (4.388) и (4.389). Общие решения этих двух линейных дифференциальных уравнений имеют вид

$$\Delta e = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}, \quad (4.392)$$

$$\Delta y = B_1 e^{-t/\tau_1} + B_2 e^{-t/\tau_2}. \quad (4.393)$$

Эти уравнения являются более сложной формой простого уравнения (4.374), где A_1, A_2, B_1 и B_2 — постоянные. Получить решение уравнений (4.390) и (4.391) в виде (4.392) и (4.393) можно с помощью теории матриц, найдя такие τ_1 и τ_2 , которые удовлетворяют условию

$$\begin{vmatrix} a_1 - 1/\tau & a_2 \\ a_3 & a_4 - 1/\tau \end{vmatrix} = 0, \quad (4.394)$$

или

$$\left(\frac{1}{\tau}\right)^2 - (a_1 + a_4) \frac{1}{\tau} + a_1 a_4 - a_2 a_3 = 0. \quad (4.395)$$

Решение этого квадратного уравнения дает

$$\frac{1}{\tau_1}, \quad \frac{1}{\tau_2} = \frac{a_1 + a_4}{2} \left(1 \pm \left[1 - \frac{4(a_1 a_4 - a_2 a_3)}{(a_1 + a_4)^2} \right]^{1/2} \right), \quad (4.396)$$

где τ_1 отвечает положительный, а τ_2 — отрицательный знак перед квадратными скобками. Полное решение можно получить, подставив выражения для a_1 — a_4 из уравнений (4.390) и (4.391). Часто оказывается более удобным использовать выражения для суммы и произведения величин, обратных временам релаксации; эти выражения менее сложны, чем для значений времен релаксации как таковых:

$$\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} = k_{-1} + k_{+1}(e_{eq} + s_{eq}) + k_{+2} + k_{-2}, \quad (4.397)$$

$$\frac{1}{\tau_1} \cdot \frac{1}{\tau_2} = k_{-1} k_{-2} + k_{+1}(k_{+2} + k_{-2})(e_{eq} + s_{eq}). \quad (4.398)$$

Из этих соотношений видно, что все четыре константы скорости для рассматриваемой системы можно определить из графиков зависимости суммы и произведения величин, обратных временам релаксации, от $(e_{eq} + s_{eq})$.

Если два рассматриваемых времени релаксации значительно различаются (на порядок или больше), то систему называют несопряженной; в таком случае можно отнести время релаксации к определенной стадии. Например, если $\tau_1 \ll \tau_2$, то установление нового равновесия на стадии связывания завершится до того, как на следующей стадии произойдут существенные изменения. В этом случае стадия связывания может рассматриваться как изолированная стадия со временем релаксации, определяемым по уравнению (4.382). В выражение для времени релаксации второй стадии входит концентрационный член, поскольку эта стадия связана с предыдущей:

$$\frac{1}{\tau_2} = k_{-2} + \frac{k_{+2}}{1 + \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \cdot \frac{1}{e_{eq} + s_{eq}}} = k_{-2} + \frac{k_{+2}}{1 + \frac{K_s}{e_{eq} + s_{eq}}}. \quad (4.399)$$

Таким образом, при низкой концентрации реагента, когда $(e_{eq} + s_{eq}) \ll K_s$, $1/\tau_2 = k_{-2}$, а при высокой концентрации, когда $(e_{eq} + s_{eq}) \gg K_s$, $1/\tau_2 = k_{-2} + k_{+2}$. Следовательно, $1/\tau_2$ увеличивается при увеличении концентрации реагента, достигая предела при $1/\tau_2 = k_{-2} + k_{+2}$, в то время как $1/\tau_1$ увеличивается с увеличением концентрации реагента линейно.

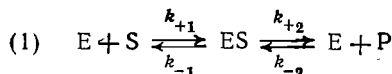
Аналогичным образом можно вывести уравнения для времен релаксации реакций с большим числом стадий, хотя необходимый для этого математический аппарат может быть весьма сложным. Уравнения для ряда систем, которые могут встретиться при исследовании ферментов, суммированы Япелем и Ламри [5225], а также другими авторами; некоторые из этих уравнений приведены в табл. 4.14.

Следует подчеркнуть, что каждой стадии реакции соответствует одно время релаксации. Это правило часто формулируют следующим образом: если в системе имеется n интермедиатов, то она характеризуется $n+1$ временами релаксации.

Анализ результатов при определении времен релаксации обычно проводят, используя стандартные полулогарифмические графики первого порядка. Очевидно, что для системы с несколькими временами релаксации (значительно различающимися по величине) индивидуальные значения этих величин могут быть определены путем проведения серии определений при разных временных масштабах. Если система является сопряженной, то полулогарифмические графики не будут прямолинейными. При относительно очень большой продолжительности опыта кривая будет переходить в прямую, соответствующую наибольшему времени релаксации, с наклоном $1/\tau_n$ (для n -го времени релаксации). Если эту прямолинейную часть экстраполировать «обратно» к началу координат и «вычесть» из исходной кривой, то получим кривую, характеризующую остальные $n-1$ времен релаксации. Повторение этой процедуры позволяет определить все времена релаксации. Этот метод детально обсуждается Френчем и Хаммесом [1411], которые отмечают, что значения последовательных времен релаксации должны отличаться по крайней мере в два раза, чтобы можно было получить достаточно точные результаты. Другие методы анализа таких кривых, в том числе метод моделирования с помощью ЭВМ, обсуждаются в работе [1212]. Если система является очень сильно сопряженной, т. е. времена релаксации очень близки, то последние трудно разграничить. В таких случаях весьма полезным оказывается метод моделирования с помощью ЭВМ; метод получения двух «средних» времен релаксации рассматривается Шварцем [4160].

После определения индивидуальных времен релаксации нужно установить, к каким стадиям исследуемой реакции они относятся. Как отмечалось выше, определенную информацию о

**Сводка уравнений для времен релаксации (двухстадийные
и многостадийные системы)**



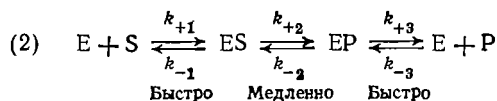
$$\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} = k_{+1}(e_{eq} + s_{eq}) + k_{-2}(e_{eq} + p_{eq}) + k_{-1} + k_{+2}$$

$$\frac{1}{\tau_1} \times \frac{1}{\tau_2} = e_{eq} [k_{+1}k_{-2}(e_{eq} + s_{eq} + p_{eq}) + k_{+1}k_{+2} + k_{-1}k_{-2}]$$

Если $1/\tau_1 \gg 1/\tau_2$, то

$$\frac{1}{\tau_1} \approx k_{+1}(e_{eq} + s_{eq}) + k_{-2}(e_{eq} + p_{eq}) + k_{-1} + k_{+2}$$

$$\frac{1}{\tau_2} \approx \frac{e_{eq} [k_{+1}k_{-2}(e_{eq} + s_{eq} + p_{eq}) + k_{+1}k_{+2} + k_{-1}k_{-2}]}{k_{+1}(e_{eq} + s_{eq}) + k_{-2}(e_{eq} + p_{eq}) + k_{-1} + k_{+2}}$$



$$\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} = (k_{+1} + k_{-3})e_{eq} + k_{+1}s_{eq} + k_{-3}p_{eq} + k_{-1} + k_{+3} =$$

$$= (k_{+1} + k_{-3})e_{eq} + \left(k_{+1} + k_{-3} \frac{p_{eq}}{s_{eq}}\right)s_{eq} + k_{-1} + k_{-3}$$

$$\frac{1}{\tau_1} \times \frac{1}{\tau_2} = k_{+1}k_{-3}(e_{eq})^2 + k_{+1}k_{-3} \left(1 + \frac{p_{eq}}{s_{eq}}\right)e_{eq}s_{eq} + (k_{+1}k_{+3} + k_{-1}k_{-3})e_{eq} +$$

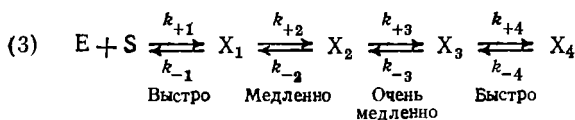
$$+ \left(k_{+1}k_{+3} + k_{-1}k_{-3} \frac{p_{eq}}{s_{eq}}\right)s_{eq} + k_{-1}k_{+3}$$

$$\frac{1}{\tau_3} = \frac{k_{+2}}{1 + \frac{k_{+1}}{k_{-1}} \frac{F_y}{e_{eq}}} + \frac{k_{-2}}{1 + \frac{k_{+2}}{k_{-2}} \frac{F_x}{e_{eq}}},$$

где

$$F_x = \frac{k_{+1}/k_{-1} + e_{eq} + s_{eq} + p_{eq}k_{+1}k_{-2}/k_{-1}k_{+2}}{k_{+1}/k_{-1} + e_{eq} + p_{eq} + s_{eq}},$$

$$F_y = \frac{k_{+2}/k_{-2} + e_{eq} + p_{eq} + s_{eq}k_{-1}k_{+2}/k_{+1}k_{-2}}{k_{+2}/k_{-2} + e_{eq} + p_{eq} + s_{eq}}.$$



$$\frac{1}{\tau_1} = k_{+1}(e_{eq} + s_{eq}) + k_{-1}$$

$$\frac{1}{\tau_2} = k_{-2} + \frac{k_{+2}}{1 + \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \frac{1}{e_{eq} + s_{eq}}}$$

Продолжение

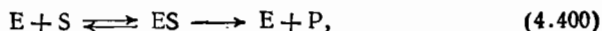
$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{k_{+3}}{1 + \frac{k_{-2}}{k_{+2}} \frac{1}{1 + \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \frac{1}{e_{eq} + s_{eq}}}} + \frac{k_{-2}}{1 + \frac{k_{+4}}{k_{-4}}}$$

$$\frac{1}{\tau_4} = k_{+4} + k_{-4}$$

характере стадии может дать зависимость времени релаксации от концентрации реагентов; дополнительные данные могут быть получены, если известны спектральные свойства интермедиатов системы. Кроме того, могут быть использованы данные о скоростях некоторых специфических процессов в ферментных системах [1214].

Следует отметить, что трудности при определении абсолютного числа стадий в реакционной системе могут быть обусловлены не только тем, что некоторые стадии являются слишком быстрыми и не могут быть обнаружены, но также и особенностями используемого метода детектирования. Так, если в системе, подчиняющейся уравнению (4.383), для которой $\tau_1 \ll \tau_2$, стадия связывания не сопровождается спектральными изменениями, а вторая стадия сопровождается ими, то спектрофотометрически будет выявляться только стадия с временем релаксации τ_2 . Однако, если спектральные изменения относятся только к стадии связывания, то в силу сопряжения двух стадий удастся зарегистрировать каждую из них.

Метод релаксации применим только к последовательности обратимых реакций, и, таким образом, система типа



в которой имеется практически необратимая стадия, не может быть исследована с помощью простого метода возмущений. Если, однако, необратимая стадия является медленной по сравнению с предыдущей, то можно использовать метод возмущений в сочетании с методом остановленной струи, при этом изменения, происходящие на обратимых стадиях, будут зарегистрированы прежде, чем вклад необратимой стадии станет существенным [940, 1213, 1280]. Комбинированный метод остановленной струи и температурного скачка был применен Хаммесом [1046, 1279] для изучения фермент-субстратных взаимодействий между рибонуклеазой (КФ 3.1.27.5) и рядом субстратов.

Глава 5

Классификация ферментов

В связи с быстрым темпом развития энзимологии и значительным увеличением числа известных ферментов возникла настоятельная необходимость в какой-либо систематизированной классификации и номенклатуре ферментов, при помощи которой любой фермент можно было бы точно идентифицировать. Номенклатура, которой пользовались до сих пор, была весьма далека от совершенства. Исследователи, открывая новый фермент, присваивали ему обычно название по своему собственному усмотрению, что неизбежно вело к путанице и всевозможным противоречиям. Некоторые названия оказались определенно ошибочными, другие не говорят ничего или почти ничего о природе катализируемой реакции, как, например, названия «диафораза», «каталаза», «промежуточный фермент» и «старый желтый фермент». Сплошь и рядом исследователи разных школ употребляли разные названия для одного и того же фермента или, наоборот, одно и то же название для нескольких разных ферментов.

Время от времени отдельные лица или группы исследователей предпринимали попытки навести в этой области порядок; однако, как правило, дело ограничивалось при этом отдельными классами ферментов. В последние годы было предложено несколько общих схем классификации и соответствующие им номенклатуры. Одну из них предложил Гофман-Остенгоф [1984], другую — авторы настоящей книги (см. первое издание), но эти схемы не получили официального признания. Международная Комиссия по ферментам, созданная в 1956 г., предложила в 1961 г. новую схему классификации и номенклатуры ферментов [3900], которая была принята Международным биохимическим союзом. Второе издание этой «Номенклатуры ферментов» было опубликовано в 1965 г. [4617]. Последующая работа по пересмотру предложенной системы классификации и внесению дополнительных ферментов была проведена Объединенной комиссией по биохимической номенклатуре под эгидой Международного биохимического союза и Международного

союза теоретической и прикладной химии. Следующее издание «Номенклатуры ферментов» было опубликовано в 1973 г. [1266]; оно основывалось на прежней системе номенклатуры, но включало значительно большее число ферментов. Последний вариант «Номенклатуры ферментов» [1266а], подготовленный под эгидой Комиссии по номенклатуре МБС (IUB), приведен в конце книги¹.

Катализируемая химическая реакция представляет тот специфический признак, по которому один фермент отличается от другого; поэтому естественно и логично, чтобы классификация и номенклатура ферментов основывались именно на этом признаке. Ферменты делят на группы в зависимости от типа катализируемой реакции и на подгруппы, более точно характеризующие эту реакцию. Каждый фермент получает название, состоящее из а) названия субстрата и б) слова, имеющего окончание *-аза* и определяющего тип реакции, катализируемой всеми ферментами той группы, к которой принадлежит данный фермент (например, аланинрацемаза). При таком способе обозначения ферменты получают систематические и более точные названия, однако некоторые из них оказываются слишком длинными (в силу того, что многие субстраты представляют собой сложные соединения).

Комиссия по ферментам учла эти трудности и предлагает в дополнение к систематическим названиям установить также и тривиальные названия, удобные для повседневного употребления. В тех случаях, когда общеупотребительные названия не вызвали возражений, они были сохранены Комиссией как узаконенные тривиальные названия. В последнем варианте эти тривиальные названия используются более широко и приведены под рубрикой «Рекомендуемые названия»; в то же время, однако, сохранены и систематические названия, поскольку они ясно отражают основу использованной классификации ферментов.

Принятый метод классификации удобен еще и потому, что химические реакции, катализируемые ферментами, можно разбить на сравнительно небольшое число типов; наличие большого числа ферментов связано с высокой специфичностью по отношению к тем частям молекулы субстрата, которые не претерпевают истинного превращения. В первом издании нашей книги был приведен список известных в то время ферментов. Ферменты в этом списке подразделены на три основные группы, а именно ферменты гидролиза, ферменты переноса и другие ферменты (в последний раздел включены синтетазы, сте-

¹ В настоящем издании Список ферментов опущен, так как в 1979 г. в русском переводе вышла «Номенклатура ферментов» под ред. акад. А. Е. Браунштейна, составленная по рекомендациям МБС (с дополнениями по 1975 г.). — *Прим. ред.*

реоизомеразы и ферменты, катализирующие присоединение групп по двойным связям). Окислительные ферменты, которые катализируют перенос водорода и которые были поэтому отнесены к ферментам переноса, образовали при этом большую подгруппу. Было признано, что деление на ферменты гидролиза и ферменты переноса несколько произвольно, так как гидролиз можно рассматривать как перенос одной части молекулы субстрата от другой его части к молекуле воды; к тому же многие ферменты гидролиза катализируют также и другие реакции переноса.

В принятой схеме окислительные ферменты ввиду их особой важности объединены в отдельную группу. Все известные ферменты разбиты на шесть главных классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы, или синтетазы.

СХЕМА НУМЕРАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Комиссия по ферментам в своем докладе 1961 г. разработала основанную на классификации систему присвоения кодовых чисел (шифров) индивидуальным ферментам; эти кодовые числа широко используются [со стоящими перед ними двумя буквами КФ (ЕС)]. Шифр каждого фермента содержит четыре числа, разделенных точками, и составляется по следующему принципу.

1. Первое число указывает, к какому из шести главных подразделений (классов) Списка ферментов принадлежит данный фермент: к 1) оксидоредуктазам, 2) трансферазам, 3) гидролазам, 4) лиазам, 5) изомеразам или 6) лигазам.

Лиазы — это ферменты, которые отщепляют от субстрата ту или иную группу (не путем гидролиза) с образованием двойных связей (в первом издании данной книги мы называли их ферментами, катализирующими реакции присоединения по двойным связям). Лигазами называют ферменты, которые катализируют присоединение друг к другу двух молекул, сопряженное с расщеплением пирофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата (эти ферменты известны также как синтетазы).

2. Второе число обозначает подкласс. У оксидоредуктаз оно указывает природу той группы в молекуле донора, которая подвергается окислению (1 обозначает —СН—ОН-группу, 2 — альдегидную или кетонную группу и т. д.); у трансфераз — природу транспортируемой группы; у гидролаз — тип гидролизуемой связи; у лиаз — тип связи, подвергающейся разрыву (между отщепляемой группой и остатком молекулы); у изомераз — тип катализируемой реакции изомеризации; у лигаз — тип вновь образуемой связи.

3. Третье число обозначает подподкласс. У оксидоредуктаз оно указывает для каждой группы доноров тип участвующего в реакции акцептора: 1 — обозначает кофермент NAD или NADP, 2 — цитохром, 3 — молекулярный кислород и т. д. Таким образом, первые три числа шифра точно определяют тип фермента; так, например, 1.2.3 обозначает оксидоредуктазу, для которой донором водорода служит альдегид, а акцептором O_2 . У трансфераз третье число указывает тип транспортируемой группы (оно указывает, например, является ли одноуглеродная группа метилом или карбоксилем и т. д.); только в случае фосфотрансфераз оно обозначает тип акцептора, как у оксидоредуктаз. У гидролаз это число уточняет тип гидролизуемой связи, а у лиаз — тип отщепляемой группы. У изомераз оно уточняет характер превращения субстрата, а у лигаз — природу образующегося соединения.

4. Четвертое число обозначает порядковый номер фермента в данном подподклассе.

В некоторых случаях оказалось необходимым применить слово «прочие» при описании подклассов и подподклассов. Соответствующие разделы обозначены числом 99, а оставшиеся перед ним вакантные цифры предназначены для новых подразделений.

Помимо уже указанных выше преимуществ этот десятичный способ нумерации имеет и еще одно: он позволяет обойти главное неудобство сквозной нумерации ферментов по всему Списку, а именно необходимость при включении в Список вновь открытого фермента изменять номера всех последующих. Новый фермент может быть помещен в конце соответствующего подподкласса без нарушения всей остальной нумерации. Точно так же при выделении классов, подклассов или подподклассов их можно добавлять без нарушения порядка нумерации ранее установленных подразделений. Большинство ферментов, вошедших в Список 1961 г. [3900], сохранили свои первоначальные шифры в самом последнем списке [1266a]; когда после получения новой информации возникла необходимость перенумеровать ферменты, прежние номера не присваивали новым ферментам, чтобы избежать недоразумений. В небольшом числе случаев подгруппы были полностью переклассифицированы, и для них были введены совершенно новые серии номеров подподклассов. Например, гидролитические ферменты, действующие на пептиды и белки, находившиеся в подподклассах 3.4.1—3.4.3 в [3900] и 3.4.1—3.4.4 в [4617], имеют шифры 3.4.11—3.4.24 и 3.4.99 в [1266a]. Все шифры, начинающиеся с 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3. или 3.4.4, сейчас не используются и не будут использоваться в будущем для каких-либо новых ферментов. Большие изменения, связанные с введением новых шифров, произведены также в подклассах 1.13 и 1.14.

Ключ к нумерации и классификации ферментов

1. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ**1.1 Действуют на СН — ОН-группу доноров**

- 1.1.1. Акцептором служит NAD^+ или NADP^+
- 1.1.2. Акцептором служит цитохром
- 1.1.3. Акцептором служит кислород
- 1.1.99. Используют другие акцепторы

1.2. Действуют на альдегидную или кетонную группу доноров

- 1.2.1. Акцептором служит NAD^+ или NADP^+
- 1.2.2. Акцептором служит цитохром
- 1.2.3. Акцептором служит кислород
- 1.2.4. Акцептором служит дисульфидное соединение
- 1.2.7. Акцептором служит железосеропроteid
- 1.2.99. Используют другие акцепторы

1.3. Действуют на СН — СН-группу доноров

- 1.3.1. Акцептором или NADP^+ служит NAD^+
- 1.3.2. Акцептором служит цитохром
- 1.3.3. Акцептором служит кислород
- 1.3.7. Акцептором служит железосеропроteid
- 1.3.99. Используют другие акцепторы

1.4. Действуют на СН — NH_2 -группу доноров

- 1.4.1. Акцептором или NADP^+ служит NAD^+
- 1.4.2. Акцептором служит цитохром
- 1.4.3. Акцептором служит кислород
- 1.4.4. Акцептором служит дисульфидное соединение
- 1.4.7. Акцептором служит железосеропроteid
- 1.4.99. Используют другие акцепторы

1.5. Действуют на СН — NH-группу доноров

- 1.5.1. Акцептором или NADP^+ служит NAD^+
- 1.5.3. Акцептором служит кислород
- 1.5.99. Используют другие акцепторы

1.6. Действуют на NADH или NADPH

- 1.6.1. Акцептором или NADP^+ служит NAD^+

1.6.2. Акцептором служит цитохром

1.6.4. Акцептором служит дисульфидное соединение

1.6.5. Акцептором служит хинон или родственное ему соединение

1.6.6. Акцептором служит азотистая группировка

1.6.7. Акцептором служит железосеропроteid

1.6.99. Используют другие акцепторы

1.7. Действуют на другие азотистые соединения в качестве доноров

1.7.2. Акцептором служит цитохром

1.7.3. Акцептором служит кислород

1.7.7. Акцептором служит железосеропроteid

1.7.99. Используют другие акцепторы

1.8. Действуют на серосодержащие группы доноров1.8.1. Акцептором или NADP^+ служит NAD^+

1.8.2. Акцептором служит цитохром

1.8.3. Акцептором служит кислород

1.8.4. Акцептором служит дисульфидное соединение

1.8.5. Акцептором служит хинон или родственное соединение

1.8.7. Акцептором служит железосеропроteid

1.8.99. Используют другие акцепторы

1.9. Действуют на группы гемадоно-ров

1.9.3. Акцептором служит кислород

1.9.6. Акцептором служит азотистая группировка

1.9.99. Используют другие акцепторы

1.10. Действуют на дифенолы и родственные им соединения в качестве доноров1.10.1. Акцептором или NADP^+ служит NAD^+

1.10.2. Акцептором служит цитохром

1.10.3. Акцептором служит кислород

1.11. Действуют на перекись водорода в качестве акцептора**1.12. Действуют на водород в качестве донора**1.12.1. Акцептором или NADP^+ служит NAD^+

- 1.12.2. Акцептором служит цитохром
1.12.7. Акцептором служит железосеропротейд

1.13. Действуют на одиночный донор с включением в него молекулярного кислорода (оксигеназы)

- 1.13.11. Включают два атома кислорода
1.13.12. Включают один атом кислорода («внутренние» монооксигеназы или «внутренние» оксидазы со смешанной функцией)
1.13.99. Разные (требуют дальнейшего изучения)

1.14. Действуют на пару доноров, катализируя включение молекулярного кислорода

- 1.14.11. С 2-оксоглутаратом в качестве одного из доноров и включением одного атома кислорода в состав каждого из двух доноров
1.14.12. С NADH или NADPH в качестве одного из доноров и включением двух атомов кислорода в состав одного донора
1.14.13. С NADH или NADPH в качестве одного из доноров и с включением одного атома кислорода
1.14.14. С восстановленным флавином или флавопротеидом в качестве одного из доноров и с включением одного атома кислорода
1.14.15. С восстановленным железосеропротейдом в качестве одного из доноров и с включением одного атома кислорода
1.14.16. С восстановленным птерицином в качестве одного из доноров и с включением одного атома кислорода
1.14.17. С аскорбатом в качестве одного из доноров и с включением одного атома кислорода
1.14.18. С другим соединением в качестве одного из доноров и с включением одного атома кислорода
1.14.99. Разные (нуждаются в дальнейшем изучении)

1.15. Действуют на перекисные радикалы в качестве акцептора

1.16. Окисляют ноны металлов

- 1.16.3 Кислород в качестве акцептора

1.17. Действуют на —CH₂—группы

- 1.17.1. Акцептором служит NAD⁺ или NADP⁺
1.17.4. Акцептором служит дисульфидное соединение

1.18. Действуют на восстановленный ферредоксин в качестве донора

- 1.18.1. Акцептором служит NAD⁺ или NADP⁺
1.18.2. Акцептором служит N₂
1.18.3. Акцептором служит H⁺

1.19. Действуют на восстановленный флаводоксин в качестве донора

- 1.19.2. Акцептором служит N₂
1.97. Другие оксидоредуктазы

2. ТРАНСФЕРАЗЫ

2.1. Переносят одноуглеродные остатки

- 2.1.1. Метилтрансферазы
2.1.2. Трансферазы гидроксиметильных, формильных и родственных групп
2.1.3. Карбоксил- и карбамоилтрансферазы
2.1.4. Амидинотрансферазы

2.2. Переносят альдегидные и кетонные остатки

2.3. Переносят ацильные остатки

- 2.3.1. Ацилтрансферазы
2.3.2. Аминоацилтрансферазы

2.4. Переносят гликозильные остатки

- 2.4.1. Гексозилтрансферазы
2.4.2. Пентозилтрансферазы
2.4.99. Переносят другие гликозильные группы

2.5. Переносят алкильные (отличающиеся от метильных) или арильные группы

2.6. Переносят азотистые группы

- 2.6.1. Аминотрансферазы
2.6.3. Оксиминотрансферазы

Продолжение таблицы 5.1

2.7. Переносят группы, содержащие фосфор

- 2.7.1. Фосфотрансферазы со спиртовой группой в качестве акцептора
- 2.7.2. Фосфотрансферазы с карбоксильной группой в качестве акцептора
- 2.7.3. Фосфотрансферазы с азотистой группой в качестве акцептора
- 2.7.4. Фосфотрансферазы с фосфатной группой в качестве акцептора
- 2.7.5. Фосфотрансферазы, действующие с регенерацией доноров (катализируют реакции кажущегося внутримолекулярного переноса)
- 2.7.6. Дифосфотрансферазы
- 2.7.7. Нуклеотидилтрансферазы
- 2.7.8. Трансферазы других замещенных фосфатных группировок
- 2.7.9. Фосфотрансферазы со спаренными акцепторами

2.8. Переносят группы, содержащие серу

- 2.8.1. Сульфидтрансферазы
- 2.8.2. Сульфотрансферазы
- 2.8.3. CoA-трансферазы

3. ГИДРОЛАЗЫ

3.1. Действуют на сложнэфирные связи

- 3.1.1. Гидролазы эфиров карбоновых кислот
- 3.1.2. Гидролазы тиоловых эфиров
- 3.1.3. Гидролазы фосфомоноэфиров
- 3.1.4. Гидролазы фосфодифэфиров
- 3.1.5. Гидролазы моноэфиров трифосфорных кислот
- 3.1.6. Гидролазы эфиров серной кислоты
- 3.1.7. Гидролазы дифосфомоноэфиров
- 3.1.11. Экзодезоксирибонуклеазы, образующие 5'-фосфомоноэфиры
- 3.1.13. Экзорибонуклеазы, образующие 5'-фосфомоноэфиры
- 3.1.14. Экзорибонуклеазы, образующие другие (не 5'-) фосфомоноэфиры

- 3.1.15. Экзонуклеазы, действующие как на рибо-, так и на дезоксирибонуклеиновые кислоты с образованием 5'-фосфомоноэфиров
- 3.1.16. Экзонуклеазы, действующие как на рибо-, так и на дезоксирибонуклеиновые кислоты с образованием других (не 5'-) фосфомоноэфиров
- 3.1.21. Эндодезоксирибонуклеазы, образующие 5'-фосфомоноэфиры
- 3.1.22. Эндодезоксирибонуклеазы, образующие другие (не 5'-) фосфомоноэфиры
- 3.1.23. Эндодезоксирибонуклеазы сайт-специфичные; специфичны к последовательности
- 3.1.24. Эндодезоксирибонуклеазы сайт-специфичные; неспецифичны к последовательности
- 3.1.25. Эндодезоксирибонуклеазы сайт-специфичные; специфичны к измененным основаниям
- 3.1.26. Эндорибонуклеазы, образующие 5'-фосфомоноэфиры
- 3.1.27. Эндорибонуклеазы, образующие другие (не 5'-) фосфомоноэфиры
- 3.1.30. Эндонуклеазы, действующие как на рибо-, так и на дезоксирибонуклеиновые кислоты с образованием 5'-фосфомоноэфиров
- 3.1.31. Эндонуклеазы, действующие как на рибо-, так и на дезоксирибонуклеиновые кислоты с образованием других (не 5'-) фосфомоноэфиров

3.2. Действуют на гликозильные соединения

- 3.2.1. Гидролизуют O-гликозильные соединения
- 3.2.2. Гидролизуют N-гликозильные соединения
- 3.2.3. Гидролизуют S-гликозильные соединения

3.3. Действуют на простые эфирные связи

- 3.3.1. Гидролазы тиоэфиров
- 3.3.2. Гидролазы простых эфиров
- 3.4. Действуют на пептидные связи (пептид-гидролазы)
- 3.4.11. α -Аминоацилпептид — гидролазы

Продолжение таблицы 5.1

- 3.4.12. Гидролазы пептидиламино-кислот или гидролазы ацила-минокислот
- 3.4.13. Дипептид — гидролазы
- 3.4.14. Дипептидилпептид — гидро-лазы
- 3.4.15. Пептидилдипептид — гидро-лазы
- 3.4.16. Сериновые карбоксипептида-зы
- 3.4.17. Металлокарбоксипептидазы
- 3.4.21. Сериновые протеиназы
- 3.4.22. Тиоловые протеиназы
- 3.4.23. Кислые протеиназы
- 3.4.24. Металлопротеиназы
- 3.4.99. Протеиназы с неизвестным механизмом катализа

3.5. Действуют на С — N-связи, отличающиеся от пептидных связей

- 3.5.1. Действуют на линейные ами-ды
- 3.5.2. В циклических амидах
- 3.5.3. В линейных амидинах
- 3.5.4. В циклических амидинах
- 3.5.5. В нитрилах
- 3.5.99. В других соединениях

3.6. Действуют на ангидриды кислот

- 3.6.1. В фосфорилсодержащих ан-гидридах
- 3.6.2. В сульфонилсодержащих ан-гидридах

3.7. Действуют на С — С-связи

- 3.7.1. В кетосоединениях

3.8. Действуют на галондные связи

- 3.8.1. В С-галоидных соединениях
- 3.8.2. В Р-галоидных соединениях

3.9. Действуют на Р — N-связи

3.10. Действуют на S — N-связи

3.11. Действуют на С — Р-связи

4. ЛИАЗЫ

4.1. Углерод — углерод лиазы

- 4.1.1. Карбокси-лиазы
- 4.1.2. Альдегид — лиазы
- 4.1.3. Лиазы оксокислот
- 4.1.99. Прочие углерод — углерод лиазы

4.2. Углерод — кислород лиазы

- 4.2.1. Гидро-лиазы
- 4.2.2. Действуют на полисахариды
- 4.2.99. Прочие углерод — кислород лиазы

4.3. Углерод — азот лиазы

- 4.3.1. Аммиак-лиазы
- 4.3.2. Амидин-лиазы

4.4. Углерод — сера лиазы

4.5. Углерод — галоид лиазы

4.6. Фосфор — кислород лиазы

4.99. Прочие лиазы

5. ИЗОМЕРАЗЫ

5.1. Рацемазы и эпимеразы

- 5.1.1. Действуют на аминокислоты и их производные
- 5.1.2. Действуют на гидроксикисло-ты и их производные
- 5.1.3. Действуют на углеводы и их производные
- 5.1.99. Действуют на прочие соеди-нения

5.2. Цис-транс-изомеразы

5.3. Внутримолекулярные оксидоре-дуктазы

- 5.3.1. Взаимопревращают альдозы и кетозы
- 5.3.2. Катализируют взаимопревра-щения кетонных и енольных групп
- 5.3.3. Перемещают С=С-связи
- 5.3.4. Перемещают S—S-связи
- 5.3.99. Другие внутримолекулярные оксидоредуктазы

5.4. Внутримолекулярные трансфе-разы

- 5.4.1. Перемещают ацильные груп-пы
- 5.4.2. Перемещают фосфоэфирные группы
- 5.4.3. Перемещают аминогруппы
- 5.4.99. Перемещают другие группы

5.5. Внутримолекулярные лиазы

5.99. Прочие изомеразы

Продолжение таблицы 5.1

6. ЛИГАЗЫ (синтетазы)	6.3.1. Кислота — аммиак (или амин) лигазы (амид-синтетазы)
6.1. Образуют С — О-связи	6.3.2. Кислота — аминокислота лигазы (пептид-синтетазы)
6.1.1. Лигазы, образующие аминоксил-тРНК и родственные соединения	6.3.3. Цикло-лигазы
6.2. Образуют С — S-связи	6.3.4. Прочие С — N лигазы
6.2.1. Кислота-тиол лигазы	6.3.5. С — N лигазы с глутамином в роли амидо-N-донора
6.3. Образуют С — N-связи	6.4. Образуют С — С-связи
	6.5. Образуют фосфоэфирные связи

В табл. 5.1 дан ключ к системе нумерации и классификации ферментов. Все четырехкомпонентные коды и соответствующие названия официально приняты Международным биохимическим союзом.

ПРАВИЛА КЛАССИФИКАЦИИ И НОМЕНКЛАТУРЫ

В [1266] приведена сводка правил для построения рекомендуемых, а также систематических названий. Комиссия по биохимической номенклатуре следовала этим правилам при составлении названий, приведенных в Списке ферментов; они могут быть использованы для построения названий новых ферментов. Эти правила приведены ниже полностью.

а) ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ И ПРАВИЛА¹

Общие указания относительно рекомендуемых названий

Правила для систематической номенклатуры, на которой основана классификация

1. В названиях ферментов допустимо употребление общепринятых тривиальных названий субстратов. Буквы D у обычных сахаров и L у обычных аминокислот опускаются (если это не приводит к неоднозначности). Для обозначения положения заместителей вместо номеров можно использовать буквы α , β , γ ...

1. Чтобы систематические наименования ферментов не были излишне громоздкими, допускается использование в них общепринятых тривиальных названий субстратов. В случаях, где не существует принятых и удобных тривиальных названий, субстраты должны обозначаться согласно официальным правилам но-

¹ В некоторых правилах приведены дополнения, обусловленные правилами написания ферментов на русском языке. — *Прим. перев.*

там, где в настоящее время принят этот способ обозначения. Как правило, в рекомендуемых названиях нет необходимости указывать положение заместителей (если это не требуется во избежание обозначения разных ферментов одним названием).

менклатуры МСТПХ (IU-RAC). Для указания положения заместителей следует применять номерную систему (1,2,3...), а не буквенную (α , β , γ ...). Буквы α и β используются для обозначения конфигураций, хотя допустимы такие обозначения групп, как β -аспартил, γ -глутамил, β -аланин. Остатки нуклеотидов обозначаются наименованиями типа аденилил (не аденил) и т. д. Название *оксокислоты* (не *кетокислоты*) применяется как общее для всего класса соединений. В названиях отдельных соединений, в которых группа $-\text{CH}_2-$ заменена группой $-\text{CO}-$, следует употреблять префикс *оксо*; префикс *кето* применяется для производных сахаров, у которых на месте группы $-\text{CHOH}-$ стоит $-\text{CO}-$.

2. В тех случаях, когда субстрат в нормальных условиях находится в форме аниона, в наименовании фермента указывается анион (его название с окончанием *ат*, а не *ико*), например «лактатдегидрогеназа», а не «лактодегидрогеназа» или «дегидрогеназа молочной кислоты».

3. Общепринятые сокращенные названия субстратов, например АТР, могут применяться в названиях ферментов, однако следует воздерживаться от введения новых сокращений, не вошедших в число рекомендованных КБН (Комиссией IU-RAC—IUB по биохимической номенклатуре). Химические формулы (например, O_2) не должны применяться вместо названий субстратов (например, кислород). Не следует пользоваться сокращениями вместо рекомендуемых названий ферментов; так, нельзя писать ГД или ГДГ вместо глутаматдегидрогеназа или глюкозодегидрогеназа и т. п.

4. (Применительно к номенклатуре на русском языке необходимы дополнения даны А. Браунштейном.) Часть систематического названия, которая включает в себя названия субстратов и может содержать разделительные знаки (дефисы, знаки деления и т. п.), пишется отдельно от второй части наименования, указывающей тип реакции, или же соединяется с

ней знаком связи (длинной черточкой), но не дефисом; пример: глюкозо-6-фосфат: NADP^+ оксидоредуктаза или глюкозо-6-фосфат: NADP^+ — оксидоредуктаза. В тривиальной номенклатуре название субстрата и тип фермента можно писать слитно, если в первой или второй части термина нет разделительных знаков; в противном случае между ними ставится дефис или (для ясности) знак связи, например: глюкозодегидрогеназа, но глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназа; ацетил- CoA — синтетаза и ацетат — CoA -трансфераза; гистидиндекарбоксилаза, но аспарат — β -декарбоксилаза. Дефис и знак связи допустимо применять и в других случаях для расчленения громоздких, труднопроизносимых или неоднозначных наименований.

5. Использование в качестве названий ферментов таких описательных терминов, как конденсирующий фермент, рН-5-фермент, ацетатактивирующий фермент, промежуточный фермент, «яблочный» фермент (*malic enzyme*), должно прекращаться с момента установления природы катализируемой реакции. Слово «активирующий» не должно употребляться в смысле «превращающий субстрат в вещество, участвующее в дальнейшей реакции», поскольку действие всех ферментов включает активирование соответствующих субстратов, и применение этого слова в упомянутом смысле дает повод к недоразумениям.

6. Там, где этого можно избежать, не следует строить рекомендуемое название фермента, исходя из названия вещества, не являющегося его истинным субстратом: например, фермент КФ 4.2.1.17 нельзя называть кротонойазой, так как он не действует на кротоат.

7. Если общепринятое название фермента дает представление о реакции и не является ошибочным или двусмысленным, можно рекомендовать его сохранение. В других случаях рекомендуемое название базируется на тех же общих принципах, что и систематическое название (см. рядом), но с минимальной детализацией, чтобы получить название, достаточно краткое

7. Систематические названия составляют из двух частей. Первая содержит название субстрата или в случае бимолекулярной реакции названия двух субстратов, разделенные знаком деления (двоеточие без предшествующего и последующего интервалов). Вторая часть названия, с окончанием *аза*, указывает природу реакции. Если для ясности требуется допол-

для повседневного употребления. Сохраняются некоторые старые названия протеолитических ферментов с окончанием *ин*; прочие названия ферментов должны оканчиваться на *аза*. (Окончание *еза* не должно употребляться.)

нительная информация о реакции, то после второй части названия добавляют в скобках термин, обозначающий превращение или продукт, например: (образующая ADP), (димеризующая), (ацилирующая CoA).

8. В рекомендуемых и систематических названиях могут употребляться специальные термины, обозначающие определенный тип реакции: оксидоредуктаза, оксигеназа, трансфераза (с префиксом, указывающим природу переносимой группы), гидролаза, лиаза, рацемаза, эпимераза, изомераза, мутаза, лигаза, синтетаза.

9. При образовании рекомендуемых названий (но не в систематической номенклатуре) могут употребляться дополнительные видовые термины, в том числе дегидрогеназа, редуктаза, оксидаза, пероксидаза, киназа, таутомераза, дезаминаза, дегидратаза и др.

10. Прямое присоединение окончания *аза* к названию субстрата означает, что фермент осуществляет гидролиз.

11. Термин «дегидраза», которым прежде обозначали как дегидрогенизирующие, так и дегидратирующие ферменты, не должен применяться. Для первого типа ферментов употребляется термин «дегидрогеназа», для второго — «дегидратаза».

12. Рекомендуемые названия, как правило, базируются на фактически установленном направлении реакции, например дегидрогеназа или редуктаза, декарбоксилаза или карбоксилаза.

10. Суффикс *аза* никогда не присоединяется прямо к названию субстрата.

12. В случае обратимых реакций направление реакции, избранное для составления названия, должно быть одинаковым для всех ферментов данного класса, даже если это направление не во всех случаях было показано в эксперименте. Таким образом, систе-

матические названия могут быть основаны на написанном уравнении реакции даже тогда, когда фактически была установлена лишь обратная реакция.

13. Когда суммарная реакция включает два различных превращения, например состоит в окислительном деметилировании, классификация фермента и его систематическое название должны базироваться по возможности на том (или на первом) превращении, которое катализирует фермент; другую(ие) функцию(и) следует указывать, добавляя в круглых скобках соответствующее причастие, например саркозин: кислород оксидоредуктаза (деметилюющая) (КФ 1.5.3.1); D-аспартат: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (КФ 1.4.3.1); L-серин — гидролиаза (присоединяющая индол (КФ 4.2.1.20). Другие примеры таких добавочных определений в форме причастий: (декарбоксилирующая), (циклизующая), (ацилирующая акцептор), (изомеризующая).

14. Когда фермент катализирует реакции нескольких типов, в названии обычно указывается только одна реакция. Каждый случай требует особого рассмотрения, и выбор названия в известной мере произволен. Другие важные функции ферментов могут быть указаны в Списке в рубриках «Реакция» или «Замечания».

Точно так же, если фермент действует более чем на один субстрат (одну пару субстратов), в названии обычно указывают только один субстрат (одну пару субстратов), но в отдельных случаях допустимо использование собирательного термина, охватывающего целую группу субстратов, или упоминание альтернативного субстрата в скобках.

15. Группа близко сходных по специфичности ферментов, как правило, вносится в Список под одним кодовым номером и названием, основанным на типе реакции. Однако если два фермента, катализирующие одинаковые реакции, в достаточной мере различаются по специфичности, то они могут быть включены в Список каждый в отдельности; например, КФ 1.2.1.4 и КФ 1.2.1.7. Степень требуемых для этого различий устанавливается произвольно. Раздельные позиции в Списке уместны и для ферментов, имеющих подобные каталитические функции, но заведомо различающихся фундаментально по механизму реакции, которые они катализируют, или по природе каталитических групп; например, аминоксидаза (содержащая флаavin) (КФ 1.4.3.4) и аминоксидаза (содержащая пиридоксаль) (КФ 1.4.3.6).

6) УКАЗАНИЯ И ПРАВИЛА, КАСАЮЩИЕСЯ ОТДЕЛЬНЫХ КЛАССОВ ФЕРМЕНТОВ

Класс 1

16. В основном применяют по-прежнему термины «дегидрогеназа» и «редуктаза». Последний уместно использовать, когда перенос водорода от вещества, указанного в систематическом названии в качестве донора, трудно доказать. Для нескольких ферментов сохраняется установившееся название «трансгидрогеназа». Термин «оксидаза» применяется только в случаях, где акцептором служит O_2 , а «оксигеназа» — в случаях, где молекула O_2 прямо включается в состав субстрата. Термин «пероксидаза» относится к ферментам, использующим H_2O_2 в качестве акцептора. Название «каталаза» приходится рассматривать как исключение. Второй участник реакции в рекомендуемых названиях обычно не фигурирует, если это не приводит к неоднозначности;

16. Все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, в систематической номенклатуре называются оксидоредуктазами; наименования их составляются по форме «донор: акцептор оксидоредуктаза».

но в случаях, где это требуется, чтобы избежать неопределенности, его можно указать в скобках; например, КФ 1.1.1.1, алкогольдегидрогеназа, и КФ 1.1.1.2, алкогольдегидрогеназа (NADP⁺).

17. В названиях оксидоредуктаз, использующих NAD⁺ или NADP⁺, кофермент всегда указывается как акцептор, за исключением подкласса 1.6, представляющего собой особый случай (ферменты, физиологической функцией которых считается реокисление восстановленных коферментов). В случаях, когда фермент может реагировать с обоими коферментами, это обозначают при помощи написания NAD(P)⁺.

18. Когда истинный акцептор не установлен и известны только реакции оксидоредуктазы с искусственными акцепторами, в название включают слово «акцептор» в круглых скобках, например КФ 1.3.99.1, сукцинат: (акцептор) оксидоредуктаза.

19. Оксидоредуктазы, осуществляющие включение молекулярного кислорода в один донор, или в любой из пары доноров или в оба, получают название «оксигеназы». Если включается только один атом кислорода, то употребляется термин «монооксигеназа», а если включаются оба атома кислорода, употребляют термин «диоксигеназа». Применяется также термин «гидроксилаза» (если кислород включается в виде гидроксильной группы).

19. Для оксидоредуктаз, осуществляющих сопряженное окисление двух доноров с включением кислорода в молекулу одного из доноров, название строится по типу «донор, донор:кислород оксидоредуктаза (гидроксилирующая)».

Класс 2

20. В рекомендуемых названиях обычно указывается только один специфический субстрат или продукт реакции наряду с названием транспортируемой группы.

В этих названиях взамен формы «аминотрансфераза» и т. п. могут по желанию употребляться соответственно формы «трансаминаза» и т. п.

Для обозначения отдельных типов реакций применяется ряд специальных терминов; так, киназа (не фосфокиназа) обозначает перенос фосфатного остатка от АТР, пиррофосфокиназа — аналогичную реакцию переноса пиррофосфатного остатка, фосфомутаза — перенос фосфата по кажущемуся внутримолекулярному механизму.

20. Ферменты, катализирующие реакции переноса групп, называют трансферазами; их названия составляют по форме донор:акцептор (транспортируемая группа) трансфераза, например КФ 2.7.2.1, АТР:ацетат фосфотрансфераза. Можно пользоваться цифрами для обозначения положения, в которое переносится группа, например КФ 2.7.1.3, АТР:D-фруктоза 1-фосфотрансфераза. Название трансфераза не применяется. В наименованиях фосфотрансфераз как донор всегда указывается АТР. В названиях аминотрансфераз, одним из субстратов которых является 2-оксоглутарат, это соединение всегда указывается как акцептор.

21. Префикс, обозначающий переносимую группу, по возможности не должен подразумевать определенный механизм переноса, например фосфо- (не фосфат- или фосфорил-).

Класс 3

22. Прямое присоединение окочания аза к названию субстрата обозначает как общее правило гидролазу. Там, где это представляет затруднения, например в случае фермента КФ 3.1.2.1, можно использовать слово «гидролаза».

Не следует, как правило, давать ферментам отдельные названия на основании оптимальных для их действия усло-

22. Систематические названия гидролитических ферментов составляются по форме субстрат — гидролаза. У гидролаз, специфически отщепляющих определенную группу, эта группа может быть названа в виде префикса, например аденозин — аминогидролаза (КФ 3.5.4.4). В ряде случаев фермент способен также переносить эту группу на другие

вий: такого рода названия для кислых и щелочных фосфатаз (КФ 3.1.3.1—2) следует рассматривать как исключение, а не как образец для подражания. Рекомендованное название лизоцим (КФ 3.2.1.17) также представляет собой исключение.

Класс 4

23. Сохраняются существующие термины «декарбоксилаза», «альдолаза» и т. п.; для гидролиаз используется термин «дегидратаза» (не «дегидраза»). Слово «синтетаза» для ферментов этого класса не должно употребляться; для них (и для ферментов других классов, кроме класса 6) можно использовать термин «синтаза», чтобы подчеркнуть элемент синтеза в катализируемой реакции.

24. Там, где это подсказывается положением равновесия или где традиционное название фермента базировалось на определенном субстрате, за основу названия может быть принята обратная реакция с применением терминов «гидратаза», «карбоксилаза» и т. п., например для фермента КФ 4.2.1.2 — фумаратгидратаза (лучше, чем фумараза, что означает фермент, гидролизующий фумарат).

молекулы, и сама реакция гидролиза может рассматриваться как перенос такой группы на молекулы воды.

23. Ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путем определенную группу с образованием двойной связи (или присоединяющие группу к двойной связи), в систематической номенклатуре обозначаются термином «лиазы». Чтобы указать тип реакции, используют префиксы: *гидро*, *аммиак* и др., например КФ 4.2.1.2, L-малат — гидро-лиаза. Декарбоксилазы рассматриваются как карбоксилиазы. Перед словом «лиаза» всегда ставится дефис, во избежание смешения с терминами «гидролаза», «карбоксилаза» и т. п.

24. В качестве субстрата указывается молекула целиком, а не одна из частей, на которые она расщепляется. В виде префикса к термину «-лиаза» указывают более характерный и обычно (но не всегда) менее крупный из двух продуктов реакции. Это может быть либо удаляемый (насыщенный) фрагмент молекулы субстрата, например у аммиак-, гидро-, тиол-лиаз и т. п., либо остающийся ненасыщенный фрагмент, как, например, в случае карбокси-, альдегид- или оксокислотных лиаз.

25. В различные подклассы лиаз входит ряд строго специфичных или группоспецифичных пиридоксаль-5'-фосфатзависимых ферментов, которые катализируют у β - и γ -замещенных α -аминокислот реакции элиминирования. Некоторые близкородственные 5'-фосфопиридоксальные ферменты, например КФ 4.2.1.20, триптофансинтаза, и КФ 4.2.1.22, цистатионин- β -синтаза, катализируют реакции замещения, в которых β - или γ -заместитель замещается другой группой (за счет второго субстрата) без образования двойной связи. Формально эти ферменты могут рассматриваться скорее как трансферазы, чем как лиазы. Однако и в этих случаях первая стадия реакции состоит обычно в элиминировании β - или γ -заместителя и образовании ненасыщенного промежуточного продукта. Ввиду этого такие ферменты в соответствии с правилом 13 с полным основанием классифицируются как лиазы.

Класс 5

26. В этом классе большинство рекомендуемых названий подобны (с некоторыми упрощениями) систематическим названиям, на которых базируется классификация.

27. Как общее название ферментов этого класса используется термин «изомеразы». Типы реакций изомеризации указываются при помощи префиксов, примеры: КФ 5.2.1.1, малеинат — *цис-транс*-изомеразы; КФ 5.3.3.1, 3-оксостероид Δ^4 — Δ^5 -изомеразы; КФ 5.3.2.1, фенилпируват кетонен-изомеразы. Ферменты, катализирующие взаимные превращения альдоз и кетоз, получают название «кетол-изомеразы», например КФ 5.3.1.4, L-арабиноза кетол-изомеразы. Когда изомеризация состоит во внутримолекулярном переносе группы, фермент называют мутазой, например фермент КФ 5.4.1.1; когда она заключается во внутримолекулярной реакции лиазного типа, как, например, у фермента КФ 5.5.1.1, применяется термин «лиаза» (дециклизующая).

28. Изомеразы, катализирующие реакции инверсии при центрах асимметрии, называют рацемазами или эпимеразами в зависимости от наличия в молекуле субстрата одного или более центров асимметрии; ср., например, КФ 5.1.1.5 и КФ 5.1.1.7. Чтобы указать положение атома, при котором происходит инверсия, используют цифру перед словом эпимераза.

Класс 6

29. Поскольку ферменты этого класса широко известны как синтетазы, это обозначение сохраняется в рекоменду-

29. Класс ферментов, катализирующих присоединение друг к другу двух молекул, сопряженное с разрывом пи-

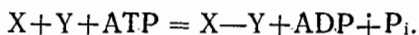
мых названиях, чтобы избежать обширных изменений в существующей номенклатуре. Термин «синтетаза» не должен применяться для ферментов, в действии которых не участвуют нуклеозидтрифосфаты (см. правило 23).

30. Рекомендуемые названия составляются по форме $X-Y$ — синтетаза, где через $X-Y$ обозначено вещество, образующееся в результате соединения X с Y . В реакциях, где Y представляет собой CO_2 , в порядке исключения можно использовать термин « X -карбоксилаза». Не должны употребляться названия типа « X -активирующий фермент» (см. правило 5).

31. В специальном случае, когда глутамин выступает в роли донора аммиака, это можно пояснить, добавляя в скобках указание (гидролизующая глутамин).

рофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата, обозначается термином «лигазы». Такие ферменты прежде называли синтетазами. Однако такая терминология отстает от всех остальных систематических наименований ферментов, поскольку она базируется на продукте реакции, а не на субстрате. Кроме того, термином «синтетаза» стали в последнее время пользоваться неправомерно для синтезирующих ферментов, действующих без участия нуклеозидтрифосфатов (см. правило 23). В силу этих причин возникла необходимость в новом систематическом названии для этого класса ферментов.

30. Систематическое название составляется по форме $X:Y$ лигаза (образующая ADP), где X и Y обозначают соединяющиеся молекулы. Выражение в круглых скобках указывает на то, что в качестве трифосфата фермент использует АТФ и что расщепление идет по концевой пиррофосфатной связи. Таким образом реакция протекает по уравнению:



31. В этом случае в систематической номенклатуре следует пользоваться термином «амидо-лигаза».

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

Остальная часть этой главы посвящена рассмотрению химических реакций, катализируемых ферментами различных классов. Ферменты приводятся в том порядке, в котором они расположены в Списке.

1. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

К этому классу принадлежат все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Субстрат, подвергающийся окислению, рассматривается как донор водорода. Систематическое название составляется по типу «донор: акцептор оксидоредуктаза». Это ферменты, участвующие в биологическом окислении и восстановлении и, следовательно, связанные с дыханием и процессами брожения. Рекомендованное название включает, там где это возможно, термин «дегидрогеназа»; в качестве альтернативы можно использовать термин «редуктаза». Термин «оксидаза» употребляется только в тех случаях, когда акцептором является кислород. Однако этот класс включает не только дегидрогеназы и оксидазы (1.1—1.10, 1.12, 1.16 и 1.17), но также пероксидазы (1.11), которые используют в качестве окислителя H_2O_2 , а также оксигеназы и гидроксилазы (1.13 и 1.14), которые катализируют включение молекулярного кислорода в окисляемую молекулу (молекулы).

Дегидрогеназы и оксидазы

Следует отметить, что типы реакций, катализируемых ферментами подгрупп 1.1 и 1.4, очень сходны. Основное отличие заключается в том, что вместо атома $-O-$, имеющегося в субстратах ферментов подгруппы 1.1, в субстратах ферментов подгруппы 1.4 содержится химически сходная группа $-NH-$. Полагают, что первой стадией при окислении аминокислот является образование иминокислоты, которая затем распадается с образованием кетокислоты. Такой ход реакции был подтвержден с помощью изотопов при действии оксидазы из змееного яда (КФ 1.4.3.2) [1426]. Если, как полагают, альдегиды окисляются в форме гидратов или в виде комплексов с веществами, содержащими тиоловые группы, то ферменты подгруппы 1.2 также в конечном счете окисляют $CH-OH$ -группу. Эти три подгруппы насчитывают не менее 306 ферментов.

Особенный интерес представляет тот факт, что среди ферментов этих подгрупп встречаются несколько пар ферментов, катализирующих одни и те же реакции окисления, но переносящих водород на разные акцепторы. Таковы, например, пары, в которых одни ферменты переносят водород на NAD, а другие — на NADP (1.1.1.1 и 2; 1.1.1.32 и 33; 1.1.1.38 и 40; 1.1.1.41 и 42; 1.1.1.63 и 64; 1.1.1.6 и 72; 1.2.1.3 и 4; 1.2.1.12 и 13); пары, в которых одни ферменты используют в качестве акцепторов кофермент, а другие — цитохром (1.1.1.27 и 1.1.2.3; 1.1.1.28 и 1.1.2.4; 1.1.1.138 и 1.1.2.2; 1.2.1.2 и 1.2.2.1) или одни — кофермент, а другие — O_2 (1.1.1.47 и 1.1.3.4; 1.1.1.37 и 1.1.3.3; 1.1.1.65 и 1.1.3.12; 1.2.1.37 и 1.2.3.2; 1.3.1.14 и 1.3.3.1). Имеются также пары, в которых оба фермента действуют на одно и то же ве-

щество, но так, что в результате реакции образуются разные продукты окисления (1.1.1.9 и 10; 1.1.1.12 и 13; 1.1.1.37 и 38; 1.1.1.43 и 44; 1.1.1.123 и 124; 1.1.1.126 и 127; 1.1.2.3 и 1.1.3.12.4; 1.2.1.3 и 1.2.1.10; 1.2.1.9 и 1.2.1.13; 1.2.2.2 и 1.2.3.3; 1.2.1.17 и 1.2.3.5; 1.5.1.1 и 2; 1.5.1.7 и 9; 1.5.1.8 и 10). Это часто связано с тем, что один из членов такой пары ферментов катализирует какую-нибудь сопряженную реакцию, например декарбоксилирование.

В подгруппу 1.1 входят ферменты, которые катализируют превращение CH—OH -группы многих спиртов, сахароспиртов, оксикислот, сахаров и оксистероидов в C=O -группу.

В подгруппу 1.2 помимо нескольких неспецифических ферментов катализирующих реакции окисления альдегидов, входят несколько специфичных ферментов, действие которых связано с аккумулярованием энергии; процессы окисления, катализируемые этими ферментами, ведут к образованию таких «богатых энергией» соединений, как тиоловые эфиры или смешанные ангидриды. Поскольку глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.12) играет важную роль в обмене углеводов, она была тщательно исследована. Дегидрогеназы 1.2.4.1 и 2, нуждающиеся в тиаминпирофосфате и использующие в качестве акцептора водорода и ацетильных групп липоат, также играют важную роль в обмене углеводов; они подробно обсуждаются в гл. 9.

В подгруппу 1.3 входят ферменты, катализирующие реакции переноса двух атомов водорода от CH—CH -групп с образованием C=C -групп, т. е. эти ферменты катализируют образование ненасыщенных соединений. Сукцинатдегидрогеназа — хорошо известный фермент, играющий важную роль в цикле лимонной кислоты; она стоит под номером 1.3.99.1, поскольку неизвестна природа акцептора в катализируемых ею реакциях. Ферменты 1.3.99.2 и 3 играют ключевую роль в метаболизме жиров; в соответствующих реакциях цитохром *c* может действовать как акцептор, если в системе имеется другой флавопротеид, «электронпереносящий флавопротеид».

В подгруппу 1.4 входят ферменты, катализирующие реакции окислительного дезаминирования; исключение составляют ферменты 1.4.1.6 и 1.4.4.1, катализирующие процесс циклизации 5-аминовалерианата. Ферменты подгруппы 1.5 катализируют окисление замещенных аминов без освобождения аммиака.

Ферменты подгруппы 1.6 необычны в том отношении, что донором водорода служат для них восстановленные формы коферментов. Большая часть этих ферментов функционирует как «коферментдегидрогеназы», и в клетке они действуют как часть цепи переноса водорода, связывающей восстановленные коферменты с O_2 . Они мало специфичны в отношении акцепторов, поэтому нецелесообразно построение классификации, рассмат-

ривающей коферменты как акцепторы. Ферменты 1.6.6.1—4 катализируют реакцию восстановления нитрата до аммиака или аминокрупп у растений и бактерий.

В подгруппы 1.9 и 1.10 объединены важные ферменты, которые действуют на конечных стадиях в цепи реакций, связанных с переносом водорода. Очень важную роль в дыхании большого числа аэробных организмов играет фермент КФ 1.9.3.1, который подробно рассматривается в гл. 9. Многие ферменты этой подгруппы содержат в своем составе медь.

Подгруппы 1.15 и 1.16 содержат по одной дегидрогеназе; субстратами являются соединения, совершенно отличные от тех, которые были рассмотрены выше.

Пероксидазы

В подгруппу 1.11 входит целый ряд ферментов, использующих в качестве окислителя H_2O_2 . Классические пероксидазы (КФ 1.11.1.7), представляющие собой гемопротеиды, специфичны только в отношении акцептора водорода, т. е. перекиси, а в качестве доноров они могут использовать различные соединения. Каталаза (КФ 1.11.1.6), которая разрушает H_2O_2 , включена в эту группу ферментов по той причине, что она в общем подобна им по структуре и свойствам и способна окислять ряд субстратов с участием перекиси водорода. Разрушение H_2O_2 может рассматриваться как окисление одной молекулы другой. Эта реакция широко распространена в аэробных клетках и, возможно, имеет какое-то еще не выясненное значение. Пероксидазы коферментов (ферменты 1.11.1.1 и 2) не являются гемопротеидами; по крайней мере одна из них представляет собой флавопротеид. Другие флавопротеиды, такие, как ксантиноксидаза (КФ 1.2.3.2), также используют H_2O_2 , но наряду с другими акцепторами. Пероксидазы коферментов более похожи на эту группу ферментов, чем на классические пероксидазы, поскольку они, как и эти ферменты, не специфичны в отношении H_2O_2 .

Оксигеназы

В подгруппы 1.13 и 1.14 входят ферменты, открытые в основном в последние несколько лет; эти ферменты катализируют включение в свои субстраты атомов кислорода из O_2 . Ферменты подгруппы 1.13 функционируют с одной молекулой донора; при этом происходит включение либо двух атомов кислорода, обычно с раскрытием кольца донора по двойной связи (диоксигеназы 1.13.11), либо одного атома кислорода (с одновременным образованием молекулы воды) (монооксигеназы

1.13.12). В реакциях последней группы происходит также декарбоксилирование (по крайней мере во всех исследованных до настоящего времени случаях).

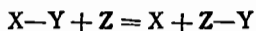
Ферменты подгруппы 1.14 катализируют более сложную реакцию, в которой два различных донора водорода взаимодействуют с O_2 . Атом кислорода внедряется либо в одну молекулу донора, либо в обе молекулы. Большинство этих ферментов, обычно известных под названием гидроксилаз, осуществляют введение гидроксильной группы в один из субстратов; другой субстрат — донор (им может быть восстановленная форма одного из коферментов, флавопротеид, птеридин, 2-оксоглутарат) — должен присутствовать в стехиометрических количествах. Разделение на подгруппы основано на природе второго донора, а также на характере процесса включения кислорода; в зависимости от того, происходит ли включение атомов кислорода в молекулы обоих доноров или в молекулу одного донора (и в том, и в другом случае ферменты называют диоксигеназами), либо происходит включение одного атома кислорода в молекулу одного донора (монооксигеназы).

Комиссия по биохимической номенклатуре включила фенолоксидазы в Список 1974 г. под названием монофенол-монооксигеназы (КФ 1.14.18.1). Основанием для этого явились наблюдения, показавшие, что действие этих медьсодержащих ферментов на монофенолы катализируется следовыми количествами дифенолов; кроме того, эксперименты с использованием изотопов показали, что происходит прямое внедрение кислорода из O_2 в образующийся дифенол. Однако эта группа включала неоднотипные ферменты, так как по крайней мере некоторые из них катализируют прямой перенос водорода; в настоящее время в Списке ферментов представители этой группы возвращены на «исходные» места (КФ 1.10.3.1 — катехиноксидаза и КФ 1.10.3.2 — лакказа).

2. ТРАНСФЕРАЗЫ

Трансферазы — это ферменты, переносящие ту или иную группу, например метильную или гликозильную, от одного соединения (которое рассматривается как донор группы) к другому соединению (которое рассматривается как акцептор). Систематическое название образуется по схеме донор:акцептор — (группа)трансфераза. Рекомендуемые названия обычно составляют по типу акцептор — (группа)трансфераза или донор — (группа)трансфераза. Во многих случаях донором является кофактор (кофермент), присоединивший переносимую группу. Аминотрансферазы представляют собой особую группу (см. ниже).

Некоторые трансферазные реакции могут рассматриваться с различных точек зрения. Так, например, ферментативную реакцию



можно трактовать либо как перенос группы Y от X к Z , либо как разрыв связи $X-Y$ путем внедрения Z . Если Z является фосфатом или арсенатом, процесс часто называют «фосфоролизом» или «арсенолизом» соответственно; поэтому в названиях ряда ферментов появился термин «фосфорилаза». Такие названия не подходят для систематической номенклатуры, так как нет оснований выделять данную группу ферментов из числа других трансфераз; лучше просто рассматривать их как Y -трансферазы.

Метилтрансферазы

Биологическое метилирование осуществляется путем переноса метильных групп ферментами подгруппы 2.1.1. Для многих ферментов этой подгруппы донором метильных групп служит S -аденозилметионин, образующийся при действии фермента КФ 2.5.1.6.

Другие переносчики одноуглеродных групп

В гл. 9 указывается, что тетрагидрофолат служит переносчиком $-CH_3$ -, $-CH_2OH$ -, $-CHO$ - или $-CH-NH$ -групп. Ферменты, которые катализируют перенос этих групп и играют важную роль в биосинтезе пуринов и т. п., объединены в подгруппу 2.1.2. Реакции карбоксилирования также играют важную роль в процессах биосинтеза, а образующиеся карбоксильные или карбамоильные группы переносятся ферментами подгруппы 2.1.3.

Трансальдолаза и транскетолаза

Эти два фермента объединены в подгруппу 2.2.1. Транскетолазу можно рассматривать как фермент, осуществляющий перенос гликолевого альдегида от одного альдегида на другой; трансальдолаза переносит дигидроксиацетон от одного альдегида на другой путем образования промежуточного комплекса дигидроксиацетон—фермент [4891]. Таким образом, в одном случае в реакции происходит соединение типа альдегид—альдегид, а в другом—соединение типа спирт—альдегид. Первый фермент (но не второй) нуждается в тиаминпирофосфате. Оба фермента играют важную роль в фотосинтезе и в системе окислительного превращения пентозофосфатов.

Ацилтрансферазы

Почти все ферменты подгруппы 2.3.1 катализируют перенос ацильных групп при участии кофермента А (Co A). Co A, следовательно, занимает такое же положение при переносе ацильных групп, какое занимает АТФ в реакциях переноса фосфата, хотя не все транспортируемые ацильные группы одинаковы. Интересно отметить, что и здесь также участвуют богатые энергией связи; карбоксильная группа кислоты связывается с SH-группой Co A, образуя тиоловый эфир, и свободная энергия гидролиза этой связи в тиоловом эфире составляет величину того же порядка, что и свободная энергия гидролиза пирофосфатной связи в АТФ. Ацилтрансферазы играют важную роль в ряде различных процессов обмена веществ, особенно в обмене жиров. В синтезе жирных кислот участвует другая группа ацилтрансфераз, использующая в качестве переносчика ацилпереносящий белок. Фосфат-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.8), встречающаяся только у бактерий, играет роль связующего звена между макроэргическими связями тиоловых эфиров и макроэргическими фосфатными связями. Фермент 2.3.1.12 образует часть пируватоксидазной системы.

Гликозилтрансферазы

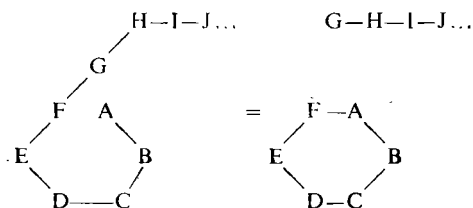
Ферменты подгруппы 2.4 катализируют реакции переноса остатков сахаров на различные акцепторы, особенно на —ОН-группы другого сахара, на свободный фосфат или на атом азота в гетероциклическом кольце. Большинство реакций, которые здесь рассматриваются, протекают без участия богатых энергией связей, и в ряде случаев они легко обратимы. Гексозилтрансферазы — это в основном бактериальные и растительные ферменты, хотя имеются и некоторые важные исключения.

Данная группа включает фосфорилазы, которые катализируют реакции переноса гликозильных групп от углеводнофосфорных эфиров и реакции переноса этих групп на свободный фосфат; ферменты 2.4.1.1; 2.4.1.8; 2.4.1.30—31; 2.4.1.49; 2.4.1.97; 2.4.2.1—4; 2.4.2.15—16 и 2.4.2.23 представляют собой истинные фосфорилазы, поскольку в катализируемых ими реакциях переноса гликозильных групп всегда участвует фосфат. Фермент 2.4.1.7, хотя и может действовать как фосфорилаза, тем не менее не является истинной фосфорилазой, так как он способен катализировать реакцию и без участия фосфата; скорее его следует рассматривать как трансгликозилазу, для которой фосфат играет роль одного из нескольких возможных акцепторов.

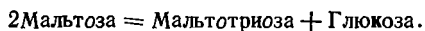
Наиболее известная фосфорилаза (КФ 2.4.1.1) обратимо переносит глюкозу из соединения с фосфатом на нередуцирующий конец цепи полисахарида. Поэтому для начала реакции не-

обходимо присутствие полисахарида, на основе которого она и строит длинные неразветвленные цепи. Фосфат не вовлекается в реакцию, катализируемую ферментом 2.4.1.18. Этот фермент образует разветвленные структуры гликогена и амилопектина из неразветвленных цепей. При этом какую-то часть имеющейся цепи он переносит в положение 6 одного из промежуточных глюкозных остатков другой части цепи, в результате чего образуется так называемая Т-образная структура. Фермент 2.4.1.2 осуществляет почти такой же перенос, с тем отличием, что он переносит только концевой глюкозный остаток. При повторении переносов этого остатка строится цепь, содержащая исключительно 1,6-связи.

Фермент 2.4.1.19 переносит часть цепи на нeredуцирующий конец той же цепи, удаляя таким образом часть молекулы в форме кольца



Здесь буквы означают глюкозные остатки, расположенные друг за другом, если считать с нeredуцирующего конца. Редуцирующая группа F переносится из положения 4 остатка G в положение 4 остатка A; при этом образуется нeredуцирующий циклический декстрин, обычно содержащий 6 или 7 глюкозных остатков. Данный фермент катализирует также реакции, подобные реакциям, катализируемым ферментом КФ 2.4.1.25, а именно перенос одного глюкозного остатка одной из двух молекул мальтозы, участвующих в реакции, в положение 4 концевого глюкозного остатка другой молекулы мальтозы:



Однако фермент КФ 2.4.1.25, насколько известно, не образует циклических декстринов. Ферменты 2.4.1.4—5 и 2.4.1.9—10 строят различного типа полисахаридные цепи, перенося гликозильные группы, не от фосфатсодержащих соединений, как фосфорилаза, а от таких соединений, как дисахариды, например сахароза. Фермент 2.4.1.4 осуществляет перенос глюкозных остатков из их соединения с фруктозой в положение 4 концевого глюкозного остатка; фермент 2.4.1.5 осуществляет ту же реакцию, но переносит глюкозу в положение 6 концевого остат-

ка (даже самой сахарозы — с образованием лейкозы); ферменты 2.4.1.9—10 осуществляют перенос фруктозных остатков с одних молекул сахарозы в положения соответственно 1 и 6 других молекул сахарозы, что сопровождается выраженным гидролизом.

Интересно, что в процессе переноса, осуществляемого мальтозофосфорилазой (КФ 2.4.1.8), происходит оптическая инверсия с образованием β -формы глюкозы; это обусловлено механизмом реакции (гл. 7).

Следует отметить, что ряд ферментов этой подгруппы (КФ 2.4.1.11—17; 2.4.1.21—23; 2.4.1.29; 2.4.1.32—48; 2.4.1.50—63; 2.4.1.65—66; 2.4.1.68—74) действует на производные нуклеозиддифосфатов, особенно на уридиндифосфатсахара. Эти ферменты участвуют в синтезе олиго- и полисахаридов, например гликогена и крахмала (КФ 2.4.1.11 и 2.4.1.21), альгината (КФ 2.4.1.33) и липополисахаридов (КФ 2.4.1.44, 2.4.1.56 и 2.4.1.58). Фермент КФ 2.4.99.1 катализирует весьма сходный процесс, но с участием производных цитидинмонофосфата. Сахароза образуется в растениях ферментом КФ 2.4.1.13; фосфорилаза (КФ 2.4.1.7) в растениях отсутствует. Лактозосинтаза (КФ 2.4.1.22) является комплексом двух белковых компонентов А и В. Белок В — это лактальбумин, он не обладает ферментативной активностью; в отсутствие белка В белок А катализирует галактозилтрансферазную реакцию с UDP-галактозы на N-ацетилглюкозамин.

Ферменты 2.4.2.1—6; 2.4.2.15 и 2.4.2.23 могут образовывать нуклеозиды; в этих соединениях сахар связан непосредственно с атомом N, а не с атомом O.

Ферменты КФ 2.4.2.7—14 и 17—20 подобны фосфорилазам, но в реакциях, катализируемых ими, участвует пиродифосфат, а не ортофосфат. Эти ферменты часто называют пиродифосфорилазами; однако они, по существу, представляют собой транскрибозилазы, и их не следует путать с пиродифосфорилазами, осуществляющими реакцию транскрибирования, которые помещены в подгруппу 2.7.7. Пиродифосфорилазы в подгруппе 2.4.2 катализируют реакцию образования мононуклеотидов, тогда как ферменты, включенные в подгруппу 2.7.7, — реакцию образования динуклеотидов.

Алкилтрансферазы

Подгруппа 2.5 — весьма гетерогенная группа ферментов, переносящих R_3C -группы, т. е. замещенные или незамещенные алкильные группы. Многие из этих ферментов участвуют в различных синтетических процессах. Ферменты 2.5.1.1; 2.5.1.8 и 2.5.1.10—11 участвуют в биосинтезе изопреноидных соединений,

в том числе стероидов, терпеноидов, каротиноидов, убихинона и др.; ферменты 2.5.1.2 и 2.5.1.9 участвуют в синтезе тиамина и рибофлавина соответственно. Ферменты 2.5.1.4 и 2.5.1.5 катализируют внутримолекулярный алкильный перенос; в результате образуются циклические соединения.

КФ 2.5.1.6 — важный фермент, который превращает метионин в источник активных метильных групп. Основной особенностью реакции является превращение соединения $S-CH_2R$ в со-

единение $R'-CH_2\overset{\overset{CH_3}{|}}{\overset{+}{S}}-CH_2R$, из которого затем после удаления

метильной группы ферментом трансметилазой образуется $R'CH_2SCH_2R$.

Ферменты, переносящие азотистые группировки

Трансаминазы (подгруппа 2.6.1) образуют большую группу ферментов, важных для метаболизма аминокислот. Классификация этих ферментов как простых трансфераз в известной мере условна. В процессе катализируемой реакции происходит перенос пары электронов и протона вместе с NH_2 -группой от первичного амина на оксосоединение по общему уравнению:



Реакцию можно формально трактовать как окислительное дезаминирование донора (аминокислоты), сопряженное с восстановительным аминированием акцептора (оксокислоты), и, следовательно, рассматриваемые ферменты можно было бы классифицировать как оксидоредуктазы. Однако уникальной чертой реакции является перенос аминогруппы путем механизма (который хорошо изучен), включающего образование ковалентных субстрат-коферментных интермедиатов. [Большинство этих ферментов (если не все) являются пиридоксальфосфат-протеидами.] Эта черта оправдывает отнесение рассматриваемых ферментов к подгруппе 2.6.1.

Во многих трансаминазных реакциях участвует глутамат; в результате сопряженного действия трансаминаз с глутаматдегидрогеназами (КФ 1.4.1.2—4) из оксокислот и аммиака образуются различные аминокислоты, при этом глутамат выступает как переносчик аммиака.

Ферменты 2.6.1.11, 13, 18, 19, 29, 36 и 46 переносят ω -аминогруппу, образуя альдегиды.

КФ 2.6.3.1 является уникальным ферментом, переносящим $=NOH$ -группу.

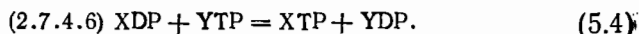
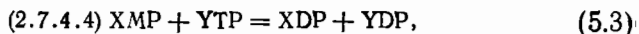
Ферменты, переносящие фосфатные группы

Большинство реакций переноса фосфатных групп протекает с участием АТФ и ферментов, известных под названием киназ (подгруппы 2.7.1—4). Эти реакции имеют большое значение, ибо благодаря им осуществляется перенос энергии от одной системы к другой в форме богатых энергией фосфатных связей. В большинстве случаев, однако (см. подгруппу 2.7.1), фосфат переносится на гидроксильную группу спирта или сахара с образованием связи, бедной энергией. В этих случаях с точки зрения обычных критериев реакция необратима, так как в результате ее протекания происходит превращение богатой энергией связи АТФ в бедную энергией связь. В реакциях, катализируемых киназами подгрупп 2.7.2—4, богатые энергией связи имеются как в исходных, так и в конечных продуктах реакции; поэтому данные реакции легко обратимы. Ферменты подгруппы 2.7.2 образуют ацилфосфаты, а подгруппы 2.7.3 — амидофосфаты.

Необходимо отметить, что большинство ферментов, фосфорилирующих сахара, осуществляют фосфорилирование специфически у одного из концевых углеродов, если оба они не блокированы, как в случае NAD (КФ 2.7.1.23) и дефосфокофермента А (КФ 2.7.1.24). Образуются преимущественно эфиры по концевой первичной спиртовой группе (положение 5 или 6, а также положение 1 в кетосахарах). Однако некоторые ферменты составляют исключение, так как в результате их действия образуются гликозидфосфаты.

Используя меченую АТФ, Бублиц и Кеинеди [602] показали, что фермент 2.7.1.30 всегда фосфорилирует один и тот же конец молекулы глицерина, хотя эта молекула симметрична.

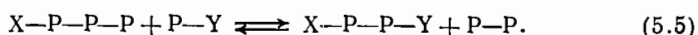
Подгруппа 2.7.4 включает ферменты, катализирующие реакции переноса от нуклеозидполифосфатов. Установлено существование двух главных ферментов или групп ферментов, а именно КФ 2.7.4.4 и 2.7.4.6. Главное отличие между этими двумя ферментами иллюстрируется следующими реакциями:



Аденилаткиназа (КФ 2.7.4.3) катализирует реакцию того же типа, что и фермент (КФ 2.7.4.4), но действует только на производные аденозина. Фермент (КФ 2.7.4.1) катализирует обмен пирофосфата между АТФ и неорганическим полифосфатом.

В подгруппе 2.7.6 имеются три фермента, расщепляющие вторую пирофосфатную связь в АТФ, так что переносится не фосфат, а пирофосфат. Фермент 2.7.6.1 образует специфичный гликозилпирофосфат, который играет важную роль в синтезе нуклеотидов ферментами 2.4.2.7—14 и 2.4.2.18—20 [2439].

Подгруппа 2.7.7 содержит ряд важных ферментов, которые осуществляют перенос группировок, связанных с пирофосфатом, на другие молекулы, освобождая неорганический пирофосфат



Реакция состоит в переносе замещенной фосфатной группы $\text{X}-\text{P}$ от пирофосфата на другую замещенную фосфатную группу; при этом образуется новая пирофосфатная связь в продукте $\text{X}-\text{P}-\text{P}-\text{Y}$. Таким образом, эти ферменты играют важную роль в синтезе динуклеотидов и других аналогичных молекул. Опыты с ферментом КФ 2.7.7.1, проведенные при помощи изотопных методов, показали, что освобождаемый при реакции пирофосфат образуется за счет двух концевых фосфатных групп трифосфата; это подтверждает правильность приведенного выше механизма [2548]. Реакция, катализируемая ферментами 2.7.7.4—5, хотя и близка по своему типу, но не вполне точно соответствует уравнению (5.5); в этом случае вместо фосфата акцептором служит сульфат и в результате реакции образуется смешанный кислотный ангидрид.

Ферменты данной группы катализируют реакции трансфосфорилирования особого типа. Между тем название «пирофосфорилаза» применяется также для обозначения другой группы ферментов, участвующих в образовании пирофосфата, а именно ферментов, которые катализируют не реакцию трансфосфорилирования, а реакцию трансгликозилирования. Эти ферменты представлены в подгруппе 2.4.2.

Фосфомутазы (подгруппа 2.7.5) не вовлекают в реакцию АТФ или другие нуклеотидполифосфаты. Одно время полагали, что они катализируют внутримолекулярный перенос фосфата, перемещая фосфатную группу из одного положения в другое внутри самой молекулы субстрата; считалось, например, что фосфоглюкомутаза (КФ 2.7.5.1) катализирует перенос фосфата в молекуле глюкозы из положения 1 в положение 6. Теперь нам известно, что это не так: перенос осуществляется из положения 1 в одной молекуле в положение 6 в другой молекуле, как это отмечено в Списке ферментов.

Данная реакция может начаться только в том случае, если в среде присутствуют хотя бы следы глюкозобисфосфата. На каждую вновь появившуюся молекулу глюкозобисфосфата одна молекула его исчезает, так что количество глюкозобисфосфата все время остается постоянным; глюкозобисфосфат действует в этом случае каталитически как кофермент реакции. По-видимому, все фосфомутазы, за исключением одной, действуют подобным образом; в каждом случае катализируемый процесс представляет собой акт переноса, в котором «кофермент» превращается в продукт, а субстрат в «кофермент». Это очень интересный тип реакции. Только фосфоглицерат-фосфомутаза

(КФ 5.4.2.1) из семян злаков не нуждается в кофакторе, и поэтому она помещена в раздел изомераз.

КФ 2.7.9.1 — уникальный фермент, найденный в растениях; можно считать, что он одновременно переносит две фосфатные группы от молекулы АТР — одну на пируват, а другую на ион фосфата с образованием пирофосфата.

Сульфид- и сульфотрансферазы

Фермент 2.8.1.1 осуществляет катализ при участии входящей в состав его молекулы дисульфидной группы, которая, по-видимому, переносит S от тиосульфата на цианид [1648, 4406].

Сульфотрансферазы подгруппы 2.8.2 катализируют образование ряда органических сульфатов; во всех случаях в качестве промежуточного «активного» сульфата в реакции участвует 3'-фосфоаденилсульфат [3938, 3939, 4013].

СоА-трансферазы

Эти ферменты (подгруппа 2.8.3), подобно трансацилазам, действуют на ацильные производные кофермента А, но отличаются от трансацилаз тем, что переносят не ацильную группу, а кофермент А.

3. ГИДРОЛАЗЫ

Эстеразы

В эту подгруппу (3.1) включены несколько ферментов, обладающих сравнительно широкой специфичностью. Эти ферменты, катализируя разрыв эфирных связей, гидролизуют очень большое число различных эфиров, хотя и не с одинаковой скоростью. Некоторые из них в известной мере действуют также и на лактоны. В эту же группу входят и три истинные лактоназы, т. е. ферменты, действующие только на внутренние эфиры.

Тиолэстеразы

Эти ферменты очень важны, поскольку тиоэфирная связь играет большую роль в обмене ацильных групп. «Глиоксалаза II» (КФ 3.1.2.6) действует на лактилглутатион, образуемый «глиоксалазой I» (КФ 4.4.1.5), и обе они вместе составляют глиоксалазную систему, с помощью которой метилглиоксаль превращается в лактат.

Фосфатазы

Фосфомоноэстеразы и фосфодиэстеразы (КФ 3.1.3—4) относятся к числу ферментов со сравнительно широкой специфичностью. Однако в этой группе имеются и ферменты, отличающиеся узкой специфичностью, в первую очередь ферменты, действующие на фосфорные производные сахаров. Раньше нуклеазы включали в число фосфодиэстераз с широкой и перекрывающейся специфичностью; сейчас нуклеазы выделены в 14 новых подгрупп (3.1.11—16 и 3.1.21—31) в соответствии с положением расщепляемой связи в нуклеиновой кислоте.

Гликозидазы

В подгруппу 3.2 входят ферменты, гидролизующие не только истинные гликозиды (3.2.1), но и N-гликозильные соединения (3.2.2), а также S-гликозильные соединения (3.2.3.1). В подгруппу истинных гликозидаз (подгруппа 3.2.1) включены ферменты, действующие на простые гликозиды, и такие ферменты, как амилазы, которые расщепляют гликозидные связи в полисахаридах. По аналогии с пептидазами α -амилазы могут быть названы эндоамилазами, а β -амилазы — экзоамилазами, так как α -амилаза может расщеплять гликозидные связи в середине полисахаридных цепей, тогда как β -амилаза действует на нередуцирующий конец цепи, последовательно отщепляя остатки мальтозы. Мальтоза отщепляется в β -форме, так что в точке гидролиза имеет место оптическая инверсия. Фермент КФ 3.2.1.3 отщепляет одиночные остатки глюкозы от нередуцирующего конца цепей крахмала и гликогена; при этом в точке гидролиза также происходит оптическая инверсия.

Известны следующие ферменты, действующие на различные гликозидные связи. Ферменты 3.2.1.1—3, 20, 54, 60—61 и 98 действуют на α -1,4-гликозидные связи; 3.2.1.10—11, 33, 41, 57, 68, 94 и 95 — на α -1,6-гликозидные связи; 3.2.1.75 — на β -1,6-гликозидные связи; 3.2.1.4, 74, 86 и 91 — на β -1,4-гликозидные связи; 3.2.1.59 и 84 — на α -1,3-гликозидные связи; 3.2.1.6, 39 и 58 — на β -1,3-гликозидные связи; 3.2.1.71 — на β -1,2-гликозидные связи; 3.2.1.7 и 80 на β -1,2-фруктозидные связи; 3.2.1.85 и 89 на β -1,4-галактозидные связи; 3.2.1.87 на α -1,3-галактозидные связи; 3.2.1.90 — на β -1,3-галактозидные связи; 3.2.1.32 и 72 — на β -1,3-связи ксилозы; 3.2.1.8 и 37 — на β -1,4-связи ксилозы; 3.2.1.14, 30, 35, 52 и 96 — на β -1,4-связи 2-ацетилглюкозамина; 3.2.1.15, 67 и 82 — на α -1,4-связи галактуроната; 3.2.1.44 и 63 — на α -1,2-связи фукозы; 3.2.1.28 и 93 — на $\alpha\alpha$ -дигликозидные связи. КФ 3.2.1.17 — хорошо известный фермент лизоцим, вы-

зывающий лизис бактериальных клеток, особенно *M. lysodeikticus*.

Расщепление нуклеотидов и нуклеозидов в животных тканях осуществляется главным образом с помощью фосфоролитического механизма. Известны также некоторые гидролитические ферменты, специфически настроенные на расщепление нуклеозидных связей; они отнесены в подгруппу 3.2.2.

Пептидазы и другие сходные по действию ферменты

За последние годы значительно изменились представления о протеолитических ферментах (подгруппа 3.4). Раньше считали, что одни ферменты — «протеиназы» — приспособлены к расщеплению только крупных молекул, тогда как другие гидролизуют молекулы небольшого размера. В настоящее время выяснилось, что для расщепления субстрата важен не размер молекул этого субстрата, а специфичность фермента. Ни одна из пептидаз не может гидролизовать все пептидные связи белковой молекулы; будет ли данный фермент действовать или нет, это зависит от природы химических групп, расположенных поблизости от рассматриваемой пептидной связи. Одни ферменты для своего действия не нуждаются в присутствии примыкающих концевых карбоксильных или аминных групп; более того, наличие этих групп может даже препятствовать действию такого фермента; другим, напротив, необходимо присутствие свободных концевых групп. Ферменты первой группы (Бергман назвал их «эндопептидазами») могут действовать на центральные участки пептидной цепи и расщеплять молекулу белка на более мелкие фрагменты; небольшие пептиды они обычно расщепляют только тогда, когда их концевые группы искусственно, химическим путем блокированы. Ферменты второй группы («экзопептидазы» по классификации Бергмана) не могут гидролизовать пептидные связи, находящиеся в середине цепи, и действуют (либо с карбоксильного, либо с аминного конца цепи), отщепляя последовательно одну за другой концевые аминокислоты.

Эндо- и экзопептидазы действуют при расщеплении белка удивительно согласованно; первые образуют большое число свободных концов, а вторые воздействуют на образовавшиеся фрагменты. Те же два типа действия можно наблюдать у ферментов, расщепляющих полисахариды, например у α - и β -амилаз.

Как обсуждалось на с. 294, классификация этих ферментов представляет значительные трудности, и принятая в настоящее время система в ряде отношений отличается от той, которая используется для других групп. Пептидазы, или экзопептидазы,

разделены на подгруппы (3.4.11—17); при этом учтены особенности действия: отщепление одиночных аминокислот (с N- или C-конца пептидной цепи), специфичность к дипептидным субстратам, отщепление дипептидных фрагментов с N- или C-конца. Это обычный тип классификации, основанный на специфичности. Вместе с тем эндопептидазы разделены на подгруппы (начинающиеся с подгруппы 3.4.21) в первую очередь на основании каталитического механизма; особенности специфичности используются только для идентификации индивидуальных ферментов в пределах подгрупп. Важная подгруппа протеиназ, в активном центре которых функционируют серин и гистидин («сериновые протеиназы»), имеет шифр 3.4.21; подгруппа 3.4.22 включает «тиоловые протеиназы» с цистеином в активном центре; «кислые протеиназы» подгруппы 3.4.23 имеют оптимум pH ниже 5, а ферменты подгруппы 3.4.24 содержат связанный металл, важный для каталитической активности. Некоторые из тех пептидаз, которые были очищены или даже закристаллизованы, мало охарактеризованы в отношении специфичности; иногда было установлено только, что рассматриваемая пептидаза гидролизует какой-либо индивидуальный белок. Группа протеиназ, о механизме действия которых ничего не известно, отнесена к подгруппе 3.4.99.

В подгруппы 3.5.1—2 включены ферменты, гидролизующие —CO—NH—связи, но не имеющие отношения к расщеплению белка: эти ферменты катализируют другие реакции обмена. Как будет видно ниже, некоторые из них катализируют расщепление гетероциклического кольца.

Ферменты подгрупп 3.5.3—4 гидролизуют C—N-связь в структуре =N—CH=N— . В зависимости от природы групп, присоединенных к атомам азота, реакция ведет к освобождению либо NH_3 , либо мочевины или же к раскрытию кольца. Целый ряд этих ферментов участвует в образовании конечных продуктов азотистого обмена. Следует отметить, что в биологических системах дезаминирование в большинстве случаев осуществляется не при помощи обсуждаемых здесь гидролитических механизмов, а окислительным путем или путем переноса аминогруппы на другие молекулы.

Пирофосфатазы и другие сходные по действию ферменты

Эта подгруппа ферментов (3.6), гидролизующих (за двумя исключениями — КФ 3.6.1.7 и 24) кислотные ангидриды, катализирует расщепление пирофосфатных связей. Обычно при классификации ферментов пирофосфатазы помещают в одну группу с фосфатазами, но в действительности они не являются эсте-

разами и образуют совершенно особый класс. В состав этой группы входит ряд важных ферментов, действующих на нуклеотиды. Особенно важен миозин (КФ 3.6.1.3) вследствие той роли, которую он играет при мышечном сокращении. Нуклеотидпирофосфатаза (КФ 3.6.1.9) расщепляет пирофосфатные связи, в которых обе фосфатные группы замещены: этот фермент широко используется в работах по выяснению структуры коферментов нуклеотидной природы.

4. ЛИАЗЫ

Лиазы — это ферменты, разрывающие $C-C$ -, $C-O$ -, $C-N$ - и другие связи в результате реакции элиминирования (что приводит к образованию двойных связей), или, наоборот, присоединяющие определенные группы по двойным связям. В большинстве случаев в одном из направлений реакции участвуют две молекулы субстрата, а в обратном — только одна молекула. Многие из этих реакций очень важны в процессах биосинтеза, и если биологически важной является именно синтетическая реакция или же если только эта реакция была изучена, то соответствующий фермент называют синтазой. Некоторые суммарные реакции, формально не отнесенные к лиазным, включают, однако, лиазоподобную стадию. Это относится, например, к значительному числу реакций, катализируемых ферментами, содержащими связанный пиридоксальфосфат.

Декарбоксилазы

Суммарную реакцию декарбоксилирования можно рассматривать либо как гидролазную реакцию, приводящую к образованию H_2CO_3 , либо как лиазную реакцию, в результате которой образуется CO_2 . Поскольку между CO_2 и H_2CO_3 быстро устанавливается равновесие, выбор между двумя указанными выше возможностями сделать нелегко. Имеются данные, полученные с помощью изотопов, о том, что при функционировании пиридоксальфосфат-зависимых декарбоксилаз первым продуктом является CO_2 [3999]; это, по-видимому, справедливо и для пируватдекарбоксилазы, требующей тиаминдифосфата [3599]. Для многих других декарбоксилазных реакций данные о механизме отсутствуют, но для удобства все декарбоксилазы объединены в группу карбокси-лиаз.

Пируватдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.1) — фермент, играющий важную роль у дрожжей, — катализирует образование альдегида. Он непосредственно связан с пируватдегидрогеназой (КФ 1.2.4.1), и оба этих фермента обсуждаются в гл. 9 в разделе, посвященном тиаминпирофосфату.

Декарбоксилазы аминокислот (КФ 4.1.1.12—30, 53, 57) чаще всего бывают бактериального происхождения; они играют большую роль при бактериальных инфекциях и в процессах гниения. Эти ферменты отличаются узкой специфичностью и благодаря этому успешно применяются для определения микроколичеств аминокислот. Небольшое число декарбоксилаз встречается в животных тканях, где они принимают участие в обмене некоторых аминокислот.

Некоторые ферменты, помещенные в подгруппу карбокси-лиаз, катализируют вторичные реакции, связанные с декарбоксилированием. Фосфорилирование декарбоксилируемого фрагмента катализируют четыре фермента. Фосфорилирование при декарбоксилировании оксалоацетата с образованием фосфоенолпирувата может осуществляться ортофосфатом (КФ 4.1.1.31), пирофосфатом (КФ 4.1.1.38), АТР (КФ 4.1.1.49) или ГТР (КФ 4.1.1.32). При действии фермента КФ 4.1.1.33 происходит дегидратация и декарбоксилирование субстрата; реакция сопряжена с гидролизом АТР до АДФ и ортофосфата, ее можно рассматривать как обратную лигазную. Фермент КФ 4.1.1.64 катализирует одновременно переаминирование и декарбоксилирование.

Альдегид-лиазы

Эти ферменты (4.1.2) известны главным образом как альдолазы, так как они катализируют реакции, в основе которых лежит альдольная конденсация, или обратные реакции. Подобно всем ферментам подгруппы 4.1, эти ферменты катализируют реакцию образования или расщепления С—С-связи.

Альдолазы играют важную роль в обмене углеводов. Классическая альдолаза — фруктозобисфосфат-альдолаза (КФ 4.1.2.13) катализирует распад гексоз на трехуглеродные фрагменты, которые претерпевают дальнейшие превращения.

Лиазы кетокислот

Ферменты этой подгруппы (4.1.3) катализируют главным образом реакции синтеза ди- и трикарбоновых кислот из двух более мелких фрагментов. Некоторые из них играют важную роль в цикле лимонной кислоты и в глиоксилатном цикле. Классификация этих ферментов наталкивается на известные трудности, так как можно представить себе несколько путей осуществления катализируемых ими суммарных реакций, а данные о механизме их действия пока еще слишком скудны. Однако ферменты, перечисленные в этой подгруппе, имеют много общего, и их, безусловно, можно рассматривать как лиазы, хотя неко-

торые из них вызывают и вторичные реакции — обычно ацилирование кофермента А, связанное с лиазной реакцией.

Гидро-лиазы

В эту большую подгруппу (4.2.1) входят такие хорошо известные и важные ферменты, как фумарат- и аконитатгидратаза. Ферменты 4.2.1.13—16 действуют на оксиаминокислоты; за отщеплением воды следует перегруппировка двойных связей в продукте, а затем гидролитическое отщепление аммиака. Синтазы (КФ 4.2.1.20 и 22) также действуют на оксиаминокислоты, но в этом случае лиазная реакция связана с присоединением к оксиаминокислотам других молекул и суммарная реакция подобна обращению гидролиза; замещение, однако, является, по-видимому, двухстадийной реакцией, включающей образование промежуточного соединения, — связанной с ферментом β , γ -ненасыщенной аминокислоты. Лиазная реакция, катализируемая ферментом 4.2.1.24, протекает с присоединением второй молекулы субстрата и последующей циклизацией образовавшегося продукта.

Полисахарид-лиазы

Ферменты подгруппы 4.2.2 катализируют распад полисахаридов путем реакции элиминирования; в результате на одном из концов продукта образуется ненасыщенное кольцо сахара. Эти ферменты следует противопоставить ферментам подгруппы 3.2.1, которые расщепляют полисахариды путем гидролиза.

Другие лиазы

Небольшие группы лиаз катализируют расщепление связей C—N, C—S, C — галоген, P—O и N—Fe.

Аммиак-лиазы (4.3.1) осуществляют дезаминирование аминокислот, ведущее к образованию ненасыщенных кислот. Амидин-лиазы (4.3.2), наоборот, катализируют реакции аминирования путем присоединения аминокислот и последующего отщепления соответствующей ненасыщенной кислоты от продукта реакции; в результате реакции аминокислотная группа оказывается связанной. Ферменты подгруппы 4.4 катализируют реакции отщепления H_2S или его производных. Нуклеотидил-циклазы (КФ 4.6.1.1—2) можно было бы классифицировать по-разному, но они рассматриваются как лиазы, поскольку первичной реакцией является элиминирование пирофосфата из АТР или GTP с одновременной циклизацией. Феррохелатаза (КФ 4.99.1.1) — фермент, катализирующий внедрение железа в молекулу гема.

5. ИЗОМЕРАЗЫ

Рацемазы и эпимеразы

Рацемизация часто осуществляется парами ферментов, соответственно специфичных относительно двух изомеров и образующих вместе симметричный продукт; однако имеются доказательства, что в реакциях, представленных в подгруппе 5.1, прямая рацемизация катализируется одним ферментом. Эти ферменты осуществляют рацемизацию аминокислот или эпимеризацию сахаров. Фермент КФ 5.1.3.3 катализирует реакцию мутаротации.

цис-транс-Изомеразы

Действие этих ферментов не связано с оптической активностью; они вызывают изменение геометрической конфигурации у двойной связи. Превращение может осуществляться через образование симметричного промежуточного продукта в результате реакции присоединения по месту двойной связи; в двух случаях известно, что SH-группа глутатиона действует таким путем.

Внутримолекулярные оксидоредуктазы

Изомеразы, катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз (5.3.1), осуществляют окисление СНОН-группы с одновременным восстановлением соседней С=О-группы. Таутомеразы 5.3.2 и Δ -изомеразы 5.3.3 также могут рассматриваться как внутримолекулярные оксидоредуктазы.

Внутримолекулярные трансферазы

Эти ферменты (5.4), известные как мутазы, осуществляют перенос группы с одной части молекулы субстрата на другую часть той же молекулы. Фермент 5.4.2.1 должен быть противопоставлен фосфомутазам подгруппы 2.7.5, которые переносят фосфатные группы с одной молекулы на другую. Действие ферментов 5.4.99.1 и 2 зависит от присутствия кобамидных коферментов, которые обсуждаются в гл. 9.

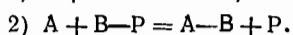
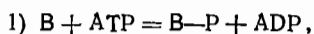
Внутримолекулярные лиазы

Реакции, катализируемые ферментами подгруппы 5.5, можно рассматривать как элиминирование группы в одной части молекулы с образованием двойной связи; при этом, однако, элиминируемая группа остается ковалентно связанной с дру-

гой частью молекулы. Такая реакция может приводить к дециклизации или к превращению одного типа кольца в другой (например, в случае действия ферментов КФ 5.5.1.3 и 4).

6. ЛИГАЗЫ

Лигазы катализируют присоединение друг к другу двух молекул. Процесс этот сопряжен с разрывом пирофосфатной связи в молекуле АТР; энергия, освобождаемая при расщеплении АТР, используется для синтеза. Одно время предполагали, что синтез подобного рода осуществляется путем совместного действия фосфокиназ и трансфераз, так что процесс можно было бы изобразить как



Было показано, например, что крахмал может быть синтезирован в результате именно такого процесса. В настоящее время, однако, известно, что большинство синтетазных реакций осуществляются одиночными ферментами (механизмы этих реакций обсуждаются в гл. 7).

Аминоацил-тРНК — синтетазы (подгруппа 6.1.1) осуществляют первую стадию в биосинтезе белков; на этой стадии каждый аминокислотный остаток присоединяется к рибозе концевой аденилатного остатка тРНК, специфичной для данной аминокислоты. Эти ферменты детально обсуждаются в гл. 10.

Ферменты подгруппы 6.2.1 участвуют в образовании ацильных производных СоА, и так как последние представляют собой соединения, богатые энергией, то реакции, катализируемые этими ферментами, легко обратимы. Ферменты подгрупп 6.3.1—2 катализируют реакции образования амидных или пептидных связей; эти реакции сопряжены с распадом АТР или других нуклеозидтрифосфатов.

Карбоксилазы подгруппы 6.4.1 являются биотинилпротеидами, к последним относятся также немногочисленные ферменты подгруппы 6.3.4. Первой стадией катализируемых ими реакций является образование связанного с ферментом 1'-N-карбоксибиотина за счет энергии распада АТР; интермедиат является богатым энергией соединением и легко карбоксилирует специфические субстраты на второй стадии реакции [3500].

Глава 6

Специфичность действия ферментов

Одно из наиболее характерных свойств ферментов — это их высокая специфичность, в силу которой каждый фермент действует строго только на одно вещество или очень небольшое число близкородственных веществ. Специфичность действия ферментов — важнейшее биологическое явление, без которого невозможен упорядоченный обмен в живой природе, а следовательно, и сама жизнь. Гопкинс [2026] в одном из своих выступлений, характеризуя это явление, сказал: «Присущая высокоспецифичным катализаторам организующая способность, как мне кажется, до сих пор еще не была должным образом оценена. Концентрация катализатора — иными словами, размер его активной поверхности — определяет скорость происходящих под его влиянием химических изменений, но высокоспецифичные катализаторы определяют, кроме того, какие именно вещества должны подвергнуться превращению. В этом отношении они подобны живой клетке, потому что они также могут выбирать те или иные вещества из множества присутствующих в окружающей среде соединений. Наконец, специфичный катализатор благодаря своей структуре определяет среди множества возможных путей тот единственный путь, по которому должно пойти превращение веществ. Он обладает способностью направлять реакцию по одному определенному пути...

Быть может, не все согласятся со мной в том, что именно эта направленность, которую придают процессам обмена заключенные в специальном коллоидальном аппарате клетки внутриклеточные ферменты, и составляет основную особенность клетки как системы, поддерживающей динамическое равновесие с окружающей средой. Я отнюдь не отрицаю существования в клетке еще не известных механизмов, обладающих организующим влиянием совершенно другого порядка, на другом (возможно, более высоком) уровне. Однако, очевидно, что взаимосвязанное действие высокоспецифичных катализаторов представляет собой замечательное приспособление природы, сохранившее в ходе эволюции те динамические проявления, которые характеризуют живые существа».

У тех, кто изучает процессы метаболизма, не остается сомнений в том, какую важную роль играет специфичность ферментов в выборе наиболее выгодных направлений процессов обмена, иными словами — в организации этих процессов из химических реакций различных типов, т. е. «организации на основе специфичности». Если бы ферменты не обладали специфичностью, их действие приводило бы к быстрому распаду клеточного материала; при этом не происходило бы ни образования богатых энергией промежуточных продуктов, ни самого биосинтеза.

Степень наблюдаемой специфичности у разных ферментов варьирует. Во многих случаях фермент действует только на одно вещество и катализирует только одну реакцию. В других случаях фермент может действовать на ряд близкородственных веществ, катализируя, однако, всякий раз одну и ту же реакцию. Очень часто при этом в молекулах различных соединений, на которые действует данный фермент, удается обнаружить одну и ту же химическую группировку. Для ферментов с более широкой специфичностью такие химические группировки обычно составляют сравнительно небольшую часть всей молекулы субстрата (примером могут служить альдегидная или эфирная группа), поэтому такие ферменты способны атаковать большое число родственных веществ.

В настоящее время довольно трудно дать удовлетворительное объяснение специфичности действия ферментов. Причины этого заключаются в следующем:

1. Значительное число ферментов обладает, по-видимому, абсолютной специфичностью, т. е. фермент может атаковать только один субстрат или (в случае бимолекулярной реакции) только одну пару субстратов. В отношении таких ферментов анализ практически невозможен. Только при рассмотрении менее специфичных ферментов, действующих на целый ряд родственных субстратов, можно обсуждать влияние модификаций различных частей молекулы субстрата на скорость превращения. В связи с этим, как правило, в публикуемых работах обсуждаются менее специфичные ферменты, а это может приводить к неправильным представлениям.

2. Во многих обстоятельных исследованиях, посвященных выяснению специфичности отдельных ферментов, ферментные препараты не были должным образом очищены, хотя на получение чистых субстратов в тех же исследованиях были затрачены большие усилия. Данные таких работ были тем самым значительно обесценены, ибо нельзя быть уверенным в том, что все наблюдавшиеся реакции катализировались одним и тем же ферментом.

3. В других работах дело обстоит как раз наоборот: исследователи обратили основное внимание на получение чистого

фермента, но при этом не провели надлежащей очистки субстрата. Между тем при использовании некоторых методов изучения ферментативных реакций (например, таких, как наблюдение за появлением полосы поглощения NADH в дегидрогеназных реакциях) незначительные количества примесей, играющих роль субстратов, могут совершенно исказить результат.

4. В некоторых работах, проведенных с кристаллическими ферментами, для опыта брали относительно большие количества фермента. Если в подобных условиях реакция с добавленным веществом протекала медленно, то трудно решить, катализировалась ли она изучаемым ферментом или другими ферментами, присутствовавшими в виде примесей в кристаллическом препарате. Если даже чистота кристаллов составляла 99,99%, то и тогда наличие примеси другого активного фермента в ничтожном количестве (0,01%) могло обусловить достаточную активность, которая и обнаруживалась в опыте.

5. В подавляющем большинстве исследований определяли только скорость реакции с серией субстратов при постоянной концентрации последних. Различия между отдельными субстратами могут касаться либо скорости реагирования комплексов ES, либо величины сродства, т. е. либо V , либо K_s . Только в очень немногих работах специально изучалось влияние структуры субстрата как на V , так и на K_s .

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

При исследовании вопросов о специфичности какого-либо фермента необходимо обращать внимание на ряд обстоятельств. Некоторые из них мы уже упоминали. Фермент должен быть тщательно очищен, лучше всего — несколько раз перекристаллизован. В любом случае он не должен содержать следов другого фермента, действующего на сходные субстраты. Субстраты также должны быть, насколько это возможно, чистыми и не должны содержать веществ, на которые действует исследуемый фермент. Если субстратом для действия фермента служит оптически активное вещество, то надо стараться исследовать действие фермента на оба изомера отдельно, так как вполне возможно, что фермент будет атаковать только один изомер (с. 336) и что присутствие другого будет тормозить реакцию. Известно, например, что D-аспарагин конкурентно подавляет дезаминирование L-аспарагина, происходящее под действием аспарагиназы [1691].

При проведении исследований обычно выбирают наиболее специфичный для данного фермента биологический субстрат и прежде всего определяют оптимальные условия для действия фермента. Затем испытывают ряд других возможных субстратов при тех же значениях pH, температуры и концентрации.

Если один и тот же фермент атакует несколько субстратов, то для получения количественных данных лучше всего для каждого субстрата построить график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата по методу Лайнувер — Бэрка и путем экстраполяции определить величины V и K_m (см. примеры в табл. 6.5). В случае ионизирующихся субстратов следует построить график для нескольких значений pH , так как с различными субстратами оптимум pH для данного фермента может оказаться различным. Это необходимо потому, что различные субстраты могут иметь неодинаковое сродство к ферменту и при стандартной концентрации в разной степени его насыщать. Для таких субстратов кривые pH — активность будут различны, и при стандартном pH скорость реакции для каждого субстрата будет составлять различную долю от максимальной. Во всяком случае, необходимо отдельно определять величины V и K_m , для того чтобы установить, какое влияние оказывает изменение структуры на сродство фермента к субстрату и на лабильность фермент-субстратного комплекса.

Даже если фермент действует только на один субстрат, то можно изучать влияние структуры на сродство, применяя конкурентные ингибиторы, т. е. вещества, для которых $V=0$. В этом случае вместо K_m определяют K_i .

Чтобы избежать реакций, обусловленных возможным присутствием следов других ферментов, изучаемый фермент всегда следует брать для опыта в достаточно низкой концентрации. Побочные реакции возможны даже при использовании сравнительно чистых ферментных препаратов, если эти препараты берутся в большом количестве.

Общий путь исследования специфичности сводится к следующему. Прежде всего находят подходящий для данного фермента субстрат. Затем несколько изменяют отдельные части его молекулы и определяют влияние этих изменений на сродство к ферменту и на реакционную способность комплекса ES . Нередко бывает необходимо проделать это с несколькими субстратами. В большинстве ферментативных реакций участвует более одного субстрата. Так, например, ферменты переноса катализируют реакцию между донором и акцептором, и даже гидролитические ферменты, когда они катализируют обратную реакцию, осуществляют реакцию между двумя различными молекулами. В подобных случаях необходимо изучать два ряда соединений для того, чтобы определить специфичность фермента по отношению к субстратам каждого ряда в отдельности.

На основании полученных результатов можно сформулировать минимальные требования к структуре субстрата, обеспечивающей соединение с ферментом и осуществление реакции, а также произвести количественную оценку влияния дополнительных групп. Эти данные часто позволяют составить представле-

ние о характере образования фермент-субстратного комплекса, о природе участвующих групп и о механизме данной ферментативной реакции.

Если какой-либо ферментный препарат катализирует две различные реакции (или большее их число) и если нет полной уверенности в чистоте и гомогенности препарата, то прежде всего необходимо убедиться в том, что обе обнаруженные активности действительно принадлежат одному и тому же ферменту. Для доказательства того, что реакции осуществляются одним ферментом, был предложен ряд критериев, возможно не абсолютных каждый в отдельности, но очень надежных, если рассматривать их в совокупности. Перечень этих критериев можно найти у Холдейна [1749] и у М. Диксона [1106]. Ниже перечислены только наиболее убедительные критерии идентичности.

1. *Невозможность разделить две активности методами фракционирования.* Это, правда, может свидетельствовать и просто о том, что данные активности принадлежат ферментам, очень сходным по своим физическим свойствам. Однако если отрицательные результаты получаются при использовании целого ряда различных методов фракционирования, то такое доказательство идентичности становится весьма убедительным.

2. *Постоянство отношения величин активности при инактивации ферментного препарата.* При наличии в препарате двух ферментов подобное постоянство было бы возможно лишь в том случае, если бы под влиянием всех воздействий инактивировались равные доли обоих ферментов. Инактивацию можно вызвать контролируемым нагреванием, изменением pH, добавлением необратимо действующих ингибиторов, облучением и некоторыми другими воздействиями. Практически невероятно, чтобы во всех этих случаях инактивация двух различных ферментов протекала совершенно одинаково.

3. *Совпадение величин K_i .* Если обе наблюдаемые активности принадлежат одному и тому же ферменту, то при использовании конкурентного ингибитора величины K_i для любых субстратов должны совпадать.

4. *Доказательство с помощью метода смешанных субстратов.* При одновременном добавлении двух субстратов для двух реакций общая скорость реакции должна быть меньше суммы скоростей реакции, измеренных для каждого субстрата отдельно (если используются концентрации субстратов, достаточные или почти достаточные для насыщения фермента). При этом, однако, следует сделать следующую оговорку. Суммирование скоростей действительно служит хорошим доказательством того, что две реакции катализируются двумя различными ферментами, но если общая скорость реакции меньше суммы скоростей отдельных реакций, то это еще не может служить окон-

чательным доказательством наличия только одного фермента, так как действие каждого из ферментов может конкурентно тормозиться субстратом другого фермента. Результаты количественных измерений для двух реакций, одновременно катализируемых одним и тем же ферментом, обсуждаются на с. 114.

Помимо этих четырех критериев был предложен и ряд других, использовавшихся в отдельных работах. Однако все они менее надежны. Так, например, кривые рН — активность для двух субстратов, на которые действует один и тот же фермент, не обязательно должны совпадать, особенно в том случае, если хотя бы один из субстратов претерпевает ионизацию. Далее, как правило, торможение двух реакций при данной концентрации конкурентного ингибитора не бывает одинаковым, так как торможение зависит от сродства каждого из субстратов к данному ферменту. Кофакторы также не обязательно должны влиять на обе реакции одинаково.

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ О СПЕЦИФИЧНОСТИ

Различные группы ферментов значительно отличаются друг от друга по степени своей специфичности. Среди ферментов, перечисленных в Списке, очень многие обладают высокой специфичностью. Сюда относятся прежде всего дегидрогеназы, киназы и синтазы. В большинстве случаев эти ферменты строго специфичны по отношению к обоим компонентам бимолекулярной реакции (или ко всем трем, если речь идет о тримолекулярных реакциях, катализируемых синтазами) и лишь в немногих случаях — к одному из них. Так, алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1) обладает, например, высокой специфичностью по отношению только к одному из субстратов, а именно к NAD, и незначительной специфичностью по отношению к другому субстрату — спирту. На противоположном конце шкалы находятся несколько гидролитических ферментов. Примерами могут служить эстеразы, действующие на обширный ряд эфиров карбоновых кислот, фосфатазы, действующие на эфиры фосфорной кислоты, и пептидазы, расщепляющие пептиды. Но и среди них имеются ферменты с высокой специфичностью, например фосфолипазы (из группы эстераз), а также некоторые фосфатазы и пептидазы.

В редких случаях обнаружена двойственная специфичность. Так, ксантиноксидаза (КФ 1.2.3.2), весьма специфически настроенная на окисление пуринов, окисляет также альдегиды [1106], а альдегидоксидаза печени (КФ 1.2.3.1) окисляет также производные пиридина и хинолина. В приведенных примерах фермент катализирует реакции одного и того же типа с двумя различными группами субстратов. В то же время известны и несколько случаев, когда фермент действует на один из

тот же субстрат двумя различными путями. В качестве примера можно привести дегидрогеназы, декарбоксилирующие малат и изоцитрат (КФ 1.1.1.38, 40 и 42), которые либо восстанавливают, либо декарбоксилируют соответствующие оксокислоты. Специфичность реакции зависит иногда от четвертичной структуры фермента; активность одной из субъединиц может изменяться в присутствии других субъединиц. Например, белок А, компонент лактозосинтазы (ЕФ 2.4.1.22), катализирует перенос галактозы от UDP-галактозы на N-ацетилглюкозамин; лактозу из UDP-галактозы и глюкозы образует только «полный» фермент, содержащий помимо белка А α -лактальбумин.

СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТА

Оптически активные субстраты

Помимо химической специфичности ферменты обнаруживают при действии на вещества, содержащие асимметрические центры, стерическую специфичность. Установлено, что при действии на субстраты, содержащие асимметрический атом углерода, ферменты обычно атакуют только один из двух оптических изомеров. Специфичность этого типа обычно абсолютна; в тех случаях, когда в ферментативную реакцию вовлекается сама асимметрическая группа, например при окислении СНОН-группы оксикислот, второй изомер вовсе не атакуется. Однако если асимметрическая группа находится в молекуле субстрата на некотором расстоянии от реагирующей группы, то нередко атакуются оба изомера; правда, при этом обычно наблюдаются более или менее выраженные различия в скорости превращения изомеров (примером может служить гидролиз оптически активных эфиров под действием карбоксилэстеразы [5010]).

Во всех тех случаях, когда в Списке ферментов указана принадлежность субстрата к D- или L-ряду, это следует понимать как указание на то, что данный фермент неспособен с измеримой скоростью атаковать второй изомер субстрата. Если в подобных случаях фермент действует на смесь D- и L-изомеров, то в реакцию вступает только половина субстрата (именно на этом явлении основывается один из способов разделения рацемических смесей).

В тех случаях, когда субстрат представлен симметрической молекулой, а продукт содержит асимметрический атом углерода, под действием фермента почти всегда образуется один оптический изомер; другими словами, происходит «асимметрический синтез». Например, при восстановлении пирувата лактат-

дегидрогеназой (КФ 1.1.1.27) образуется только L-лактат, но та же реакция, катализируемая другой дегидрогеназой (КФ 1.1.1.28), дает только D-лактат; при восстановлении аммонийной соли 2-оксоглутарата L-глутаматдегидрогеназами (КФ 1.4.1.2—4) образуется только L-глутамат; фосфорилирование глицерина под действием глицеролкиназы (КФ 2.7.1.30) дает только *sn*-глицерол-3-фосфат. При синтезе L-треонина путем конденсации глицина с ацетальдегидом [побочная реакция фермента (КФ 2.1.2.1)] возникают одновременно два асимметрических атома углерода. В соединениях, имеющих несколько асимметрических центров, каждый центр может оказывать влияние на специфичность фермента [5117].

Когда стереохимическая специфичность абсолютна, неатакуемый изомер по большей части не тормозит превращения субстрата; однако иногда он выступает как конкурентный ингибитор и, следовательно, связывается с активным центром фермента. Используя это обстоятельство, можно определить степень сродства при данном взаимодействии. Подобные определения неожиданно показали, что в ряде случаев сродство к ферменту у изомера, выступающего в роли ингибитора, оказывается даже большим, чем у субстрата. Такого рода пример приведен в табл. 6.1, в которой сравнивается действие химотрипсина (КФ 3.4.21.1) на несколько пар стереоизомеров. Из этой таблицы видно, что для первых четырех пар соединений сродство фермента к форме, которая не реагирует, выше, чем

Таблица 6.1

Сродство некоторых пар стереоизомеров к химотрипсину [5010]

Соединение	K_M , mM	K_i , mM
Ацетил-L-триптофанамид	5,3	2,7
Ацетил-D-триптофанамид		
Ацетил-L-тирозинамид	30,5	12,0
Ацетил-D-тирозинамид		
Никотинил-L-триптофанамид	2,7	1,4
Никотинил-D-триптофанамид		
Никотинил-L-тирозинамид	15,0	6,2
Никотинил-D-тирозинамид		
Ацетил-L-триптофан		17,5
Ацетил-D-триптофан		4,8
L-триптофанамид		6,3
D-триптофанамид		3,2

Таблица 6.2

Стереоспецифичность химотрипсина [822, 1873, 3829]

Субстрат		K_M , мМ	V , с ⁻¹	$\frac{V}{K_M}$	$\frac{V_L}{V_D}$	Относительная стереоспецифич- ность
						$\left(\frac{V}{K_M}\right)_L / \left(\frac{V}{K_M}\right)_D$
Ацетилфенилала- нин (метиловый эфир)	L	1,8	63,1	$3,5 \cdot 10^4$	∞	∞
	D	2,3	—	—		
Формилфенилала- нин (метиловый эфир)	L	Очень мала	Очень велика	$\sim 10^5$		10^4
	D	0,25	0,0034	13,83		
Бензоилаланин (метиловый эфир)	L	9,75	0,26	26,8	23,6	8,23
	D	3,29	0,011	3,25		
3-карбометокси- 3,4-дигидроизо- карбостирил	L	11,69	0,12	10,61	0,005	$2,46 \cdot 10^{-4}$
	D	0,53	22,7	$4,31 \cdot 10^4$		
Этиловый эфир α -ацетоксипро- пионовой кислоты	L	1,7	0,00036	0,21	0,18	1,9
	D	180	0,02	0,11		
Метиловый эфир N-пиколинил- аланина	L	18	0,07	3,89	0,42	0,4
	D	17	0,165	9,71		

к субстрату (если K_M не слишком сильно отличается от K_S , что, вероятно, справедливо для данного фермента; см. с. 274). Даже в том случае, когда ни один из изомеров не атакуется ферментом, сродство к D-форме все же оказывается выше, нежели к L-форме.

Действие химотрипсина было исследовано на очень большом числе синтетических субстратов (с. 373), и во многих случаях стереоспецифичность фермента оказалась не абсолютной. Относительное предпочтение ферментом одного из изомеров значительно варьирует в зависимости от природы субстрата. Стереоспецифичность фермента по отношению к ряду субстратов с общей формулой $R_1CHR_2COOR_3$ приведена в табл. 6.2. В случае метилового эфира ацетилфенилаланина, являющегося хорошим субстратом, D-изомер не гидролизруется с измеримой скоростью; для соответствующего формильного производного относительное предпочтение L-изомера еще остается очень большим. Вместе с тем в случае производных аланина предпочтительный гидролиз L-изомеров выражен в значительно меньшей степени. Для трех последних соединений, приведенных



Рис. 6.1. Структуры некоторых субстратов химотрипсина.

в табл. 6.2, специфичность фактически является «обратной», и D-изомер гидролизруется быстрее, чем L-изомер.

Хейн и Ниман [1873, 1886] предложили объяснение наблюдаемой картины в рамках общих представлений о специфичности химотрипсина, основанных на постулировании взаимодействия трех групп субстрата с тремя участками в активном центре фермента. Если три участка, взаимодействующих с R_1 , R_2 и $-\text{COOR}_3$ -группами субстрата (где R_1 — ацильная группа, R_2 — R-группа аминокислоты, образующей гидролизуюмую связь), обозначить ρ_1 , ρ_2 и ρ_3 соответственно, то, согласно постулату авторов, гидролиз будет происходить только в том случае, когда эфирная группа $-\text{COOR}_3$ (или другая гидролизующая группа) правильно ориентирована в участке ρ_3 .

Расположение участков ρ_1 , ρ_2 и ρ_3 в области активного центра фермента таково, что в случае нормального хорошего субстрата, такого, как метилловый эфир ацетилфенилаланина, его L-изомер способен взаимодействовать с ферментом надлежащим образом: R_1 с ρ_1 , R_2 с ρ_2 и $-\text{COOR}_3$ с ρ_3 ; D-изомер не может занять требуемое положение. В том случае, когда R_1 - и R_2 -группы имеют меньшие размеры, препятствия для альтернативных вариантов взаимодействия уменьшаются, и R_2 -группа может взаимодействовать с ρ_1 , а R_1 -группа с ρ_2 ; связывание L-изомера с ферментом может оказаться не оптимальным для катализа, и величина V снижается; в то же время у соответствующего D-изомера субстрата появляется возможность занять положение, которое является каталитически эффективным; таким образом, степень стереоспецифичности снижается.

На рис. 6.1 показаны структуры трех субстратов из табл. 6.1. Бензольная группа (R_1) D-изомера метилового эфира бензоилаланина способна взаимодействовать с ρ_2 -участком, который «нормально» взаимодействует с боковой цепью ароматической аминокислоты L-изомера хорошего субстрата, при этом у некоторых молекул, осуществляющих такое взаимодействие, эфирная группа оказывается в благоприятной для катализа ориен-

тации по отношению к ρ_3 . Кольцевая структура третьего субстрата значительно уменьшает число возможных вариантов его размещения в активном центре, и D-изомер жестко удерживается в эффективном для катализа положении. В результате этого активность фермента в отношении L-изомера карбометоксидигидроизокарбостирила оказывается величиной того же порядка, что и в отношении метилового эфира L-бензоилаланина, активность же в отношении D-изомера значительно повышается, что и приводит к обращению специфичности (табл. 6.2).

Весьма сходное объяснение предложено для «обращения» стереоспецифичности в случае этил- α -ацетоксипропионата [822]. У L-изомера этого соединения — OCONH_2 -группа, находящаяся в R_1 -положении, может взаимодействовать с неполярным ρ_2 -участком, а эфирная группа — с ρ_1 -участком, который по постулату взаимодействует с ациламиногруппой. Такая ориентация является каталитически неэффективной: в результате V уменьшается, в то время как K_M остается величиной примерно обычного порядка. В случае же D-изомера при связывании ацетоксигруппы с неполярным участком эфирная группа способна взаимодействовать с ρ_3 , и гидролиз оказывается возможным.

Специфичность к *цис-транс*-изомерам

Специфичность ферментов может определяться не только D, L-изомерией, но также и другими типами стереоизомерии. Если фермент атакует субстрат с *цис*-конфигурацией, то, как правило, он не атакует *транс*-изомер данного соединения, и наоборот. Фумарат-гидратаза, например, действует только на фумарат и совершенно не действует на малеинат; кроме того, она катализирует образование из малата только фумарата. Таким образом, этот фермент проявляет стереоспецифичность двух типов: по отношению к фумарату в одном направлении реакции и по отношению к L-малату — в другом. Многочисленные примеры стереоспецифичности обоих типов можно найти в Списке ферментов.

Ряд ферментов, однако, одинаково хорошо действует на оба изомера. В тех случаях, когда в ходе реакции нарушается асимметрия оптически активного центра, соответствующие ферменты действуют как рацемазы, поскольку они могут превращать L-форму субстрата в симметрическую промежуточную форму и затем в результате обратной реакции образовывать рацемическую смесь. Примерами могут служить ферменты подгруппы 5.1. Если фермент одинаково хорошо действует как на *цис*-, так и на *транс*-форму какого-либо соединения и образуется молекула, в которой возможно свободное вращение вокруг соответствующей связи (например, в результате присоединения молекулы глутатиона к двойной связи), то такой фермент действует как

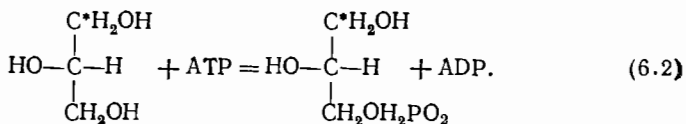
цис-транс-изомеразы (примерами могут служить ферменты подгруппы 5.2). Эпимеризацию сахара можно рассматривать как D—L-изменение при определенном углеродном атоме углеводного кольца; она может осуществляться сходным путем под действием ферментов, которые не обладают специфичностью к какой-либо одной стереохимической конфигурации при соответствующем углеродном атоме. Подобного типа реакции катализируются ферментами подгруппы 5.1.3.

Стереоспецифичность по отношению к симметричным субстратам

Помимо упомянутых выше типов стереоспецифичности известна также способность ферментов различать в симметрических молекулах группы, которые являются химически идентичными. Так, например, в реакции

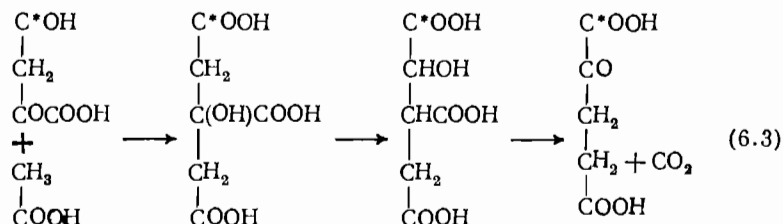


где строчные буквы обозначают четыре группы, присоединенные к углеродному атому, фермент может действовать только на одну из двух химически неразличимых *x*-групп. Доказательством этого служит образование только одного оптического изомера асимметрической молекулы *Cx'xyz*. При фосфорилировании глицерина под действием фермента КФ 2.7.1.30 образуется только *sn*-глицерол-3-фосфат [601]. Это асимметрическое фосфорилирование симметрической молекулы глицерина было подтверждено изотопным методом [602]. Показано, что при фосфорилировании $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глицерина, полученного в процессе дрожжевого брожения из меченного по карбоксилу ацетата или $3,4\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы [4606], имеет место следующая реакция:



Сходная специфичность была обнаружена у ферментов трикарбонового цикла, участвующих в образовании и распаде лимонной кислоты. При химическом расщеплении лимонной кислоты, образованной ферментативным путем из $\text{C}^*\text{OOSCH}_2\text{COSOON}$, установлено, что ^{14}C присутствует только в одной концевой карбоксильной группе. Так, как молекула лимонной кислоты является симметричной, химически невозможно различить две CH_2COON -группы. Однако при ферментативном окислении этой лимонной кислоты с помощью препарата из митохондрий образуется 2-оксоглутарат, меченный только по α -карбоксилу [2865]. Отсюда вытекает, что в лимонной

кислоте вся метка сосредоточивается только в одной из концевых карбоксильных групп и, следовательно, окислительная ферментная система способна различать эти концевые группы. Происходящая реакция может быть изображена в сокращенном виде следующим образом:



Первые две стадии катализируются цитрат (*si*)-синтазой (КФ 4.1.3.7) и аконитат-гидратазой (КФ 4.2.1.3). Можно было бы ожидать, что в первой реакции двухуглеродный остаток будет присоединяться как с одной стороны плоскости $\text{C}=\text{CO}-\text{C}$ группы, так и с другой. Однако тот факт, что в лимонной кислоте метка обнаружена только в «верхней» карбоксильной группе, говорит о том, что фермент катализирует присоединение двухуглеродного остатка только с одной стороны плоскости молекулы; в противном случае метка обнаруживалась бы и в «нижней» карбоксильной группе. Это можно более наглядно представить на молекулярных моделях. Во второй реакции две $-\text{CH}_2\text{COOH}$ -группы, казалось бы, эквивалентны, однако аконитат-гидратаза действует только на «верхнюю» из этих групп.

Объяснение данного типа специфичности было впервые предложено Огстоном [3512—3513]. Теоретические обоснования были затем более детально разработаны Гиршманом [1967—1968]. В наиболее простом варианте предполагается, что в активном центре фермента имеются три группы, которые взаимодействуют с тремя группами субстрата $\text{S}x_2yz$ в определенной конфигурации, так что субстрат может связываться с ферментом только при одной ориентации, хотя его молекула симметрична. Поэтому группа фермента, связывающая x -группу субстрата, всегда будет соединяться с одной и той же x -группой, и если реакцию осуществляет именно данная группа фермента, то реагировать будет только эта определенная x -группа субстрата. Рис. 6.2, на котором изображены две возможные структуры фермент-субстратного комплекса, помогает уяснить сказанное.

Если две x -группы в молекуле со структурой $\text{S}x_2yz$ различны не химически, а по изотопному составу, то мы имеем дело со случаем «изотопной асимметрии». Примерами являются реакции, приведенные в уравнениях (6.2) и (6.3). Следует, конечно, учитывать, что проявляемая ферментом стереоспецифич-

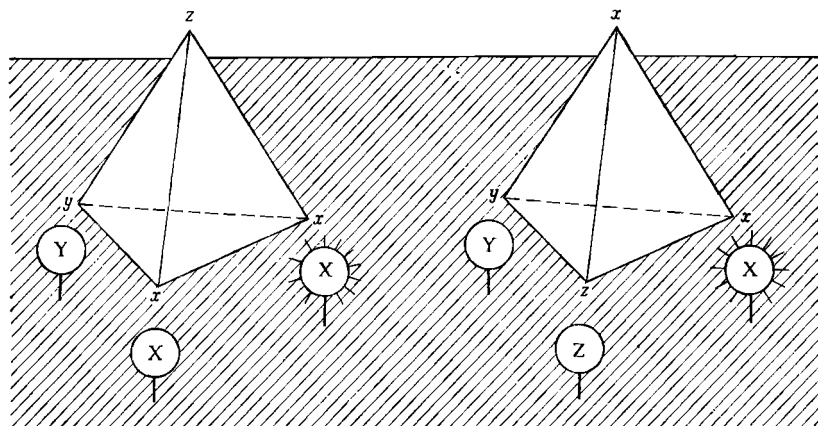


Рис. 6.2. Стереоспецифичность фермента по отношению к субстрату Sx_2yz . На схеме представлены две возможные структуры фермент-субстратного комплекса. Молекула субстрата изображена в виде тетраэдра с группами x , y и z в вершинах. Слева фермент взаимодействует с обеими x -группами и y -группой, а справа — только с одной x -группой, а также с y - и z -группами. Буквы X , Y и Z в кружках изображают группы на поверхности фермента, соединяющиеся с определенными группами субстрата — x , y и z соответственно. Особым кружком помечена группа X , при присоединении к которой x -группа субстрата становится реакционноспособной. В каждом случае в реакцию может вступить только одна из двух x -групп субстрата.

ность не связана с наличием изотопа, последний лишь позволяет обнаружить эффект.

Модель, основанную на взаимодействии трех групп субстрата с поверхностью фермента, не следует рассматривать как абсолютную, т. е. как применимую ко всем случаям, когда обнаруживается стереоспецифичность рассматриваемого типа; в то же время ясно, что молекула субстрата должна удерживаться в активном центре силами связывания, которые обуславливают значительную стерическую жесткость.

К числу хорошо изученных реакций принадлежит восстановление NAD дегидрогеназами, которое описано в нескольких последних разделах. Используя в качестве метки дейтерий, можно показать, что данный фермент присоединяет переносимый от субстрата водород только с одной стороны никотинамидного кольца. (Этот вопрос обсуждается более подробно в гл. 7.) Известно, что некоторые дегидрогеназы катализируют присоединение водорода с одной стороны кольца, а другие — с другой (табл. 7.2). Дегидрогеназы катализируют двухсубстратные реакции и проявляют стереоспецифичность по отношению к обоим субстратам. По отношению к донору часто проявляется абсолютная оптическая специфичность (например, к L- или D-форме, как в случае лактата), тогда как по отношению к акцептору

обнаруживается такая специфичность, которую можно выявить только с помощью изотопов. Даже если донор представляет симметрическую молекулу, то с помощью изотопов удастся обнаружить асимметрическое действие фермента, как это было впервые показано в опытах с дрожжевой алкогольдегидрогеназой Левусом, Вестхеймером и Веннесландом [2854]. При восстановлении CH_3CDO с помощью NADH образуется только один изомер CH_3CHDOH ; другой изомер образуется при восстановлении CH_3CHO с помощью NADD . Изомеры обладают некоторой оптической активностью и различаются по знаку вызываемого ими вращения ($\alpha_D = 0,18^\circ$).

Если в ферментативной реакции участвуют два оптически активных субстрата, то теоретически возможны четыре комбинации стереоизомеров. Однако любой фермент катализирует обычно реакцию только между формами одной пары; три другие возможности исключаются вследствие его специфичности. Для некоторых реакций известны ферменты с различной стереоспецифичностью (например, L- и D-лактатдегидрогеназы); однако обнаружить все четыре возможные комбинации в этих случаях не удалось (все известные лактатдегидрогеназы реагируют с одной и той же стороны никотинамидного кольца NAD^+).

ГИПОТЕЗА ИНДУЦИРОВАННОГО СООТВЕТСТВИЯ

Исходя из высокоспецифической природы ферментативного катализа, а также кинетических данных (рассмотренных в гл. 4) было сделано заключение, что субстрат взаимодействует с молекулой фермента в специфическом участке поверхности, «активном центре». Эмиль Фишер [1345, 1346] первый выдвинул аналогию с «замком и ключом», согласно которой белковая молекула фермента имеет форму более или менее жесткой матрицы; эта матрица содержит взаимодействующие с субстратом группы, расположенные надлежащим образом для контакта с молекулой специфического субстрата. Представление Фишера об активном центре как о жесткой преформированной матрице в течение полустолетия не подвергалось сомнению.

Имеется ряд данных, которые нелегко согласовать с теорией жесткой матрицы. Если молекула, имеющая те же взаимодействующие с ферментом группы, что и субстрат, но большая по размеру, не атакуется ферментом, то можно предположить, что именно большие размеры молекулы препятствуют ее правильной ориентации на матрице. Труднее объяснить неатакуемость молекулы с теми же группами, которые имеет специфический субстрат, но меньшего размера, особенно если эта молекула имеет примерно такое же, как специфический субстрат, сродство к ферменту; известно, однако, много примеров подоб-

ного рода. В ряде случаев такие небольшие молекулы являются мощными конкурентными ингибиторами; следовательно, они связываются с субстратсвязывающим участком фермента, но при этом не активируются. Особенно трудно объяснить специфичность ферментов (например, киназ подгруппы 2.7.1), катализирующих реакции переноса, в которых акцепторами являются соединения со спиртовой группой. Эти ферменты совершенно не способны катализировать реакции гидролиза, хотя можно было ожидать (учитывая высокую концентрацию воды в среде), что молекула воды легко займет на матрице участок, специфичный для спиртовой группы и примет участие в реакции.

Приняв во внимание эти трудности, Кошланд предложил в 1959 г. теорию индуцированного соответствия субстрата и активного центра ([2625]; см. также [796], [2566], [2569] и гл. 7). Основной постулат этой теории, состоящий в том, что при взаимодействии фермента с небольшими лигандами происходит изменение его конформации, был выдвинут несколькими годами раньше Лейдлером [2681] для объяснения некоторых экспериментальных результатов, полученных в опытах по исследованию влияния давления на ферментативную активность. В присутствии субстрата изменения конформации фермента обеспечивают точную ориентацию каталитических групп, необходимую для протекания реакции. Соединения, не являющиеся субстратами, могут взаимодействовать с ферментом, но они не индуцируют требуемого перемещения его каталитических групп. Следовательно, по мнению Лейдлера, необходимое для взаимодействия с субстратом расположение каталитических групп активного центра не предсуществует, а индуцируется при связывании субстрата; когда продукты реакции диссоциируют из комплекса с ферментом, последний возвращается в исходную конформацию.

На изменение конформации фермента в результате связывания небольших лигандов указывали также аллостерические эффекты, которые детально обсуждаются в гл. 8. В ряде случаев наличие конформационных изменений было подтверждено прямыми физическими методами. Для обнаружения изменения конформации креатинкиназы (КФ 2.7.3.2) при связывании субстрата был использован метод ЯМР; при связывании хороших субстратов наблюдали более значительные изменения спектра [3565]. Подобные результаты были получены также при исследовании фосфоглюкомутазы [5221] и ряда других ферментов. Субстраты фосфоглюкомутазы глюкозо-1-фосфат и глюкозо-6-фосфат вызвали большие конформационные изменения; соединения, сходные с субстратом, такие, как неорганический фосфат и глицерофосфат, вызвали изменения существенно меньшего масштаба. При рентгеноструктурном исследовании карбоксипептидазы А (КФ 3.4.17.1) в присутствии и в отсутствие пло-

хих субстратов было показано, что остатки двух аминокислот — тирозина и глутаминовой кислоты, которые, как полагают, участвуют в каталитическом процессе, — перемещаются при связывании субстрата на 15 и 2 Å соответственно ([2889]; рис. 10.24). Эти изменения достаточно значительны, чтобы вызвать растрескивание кристаллов карбоксипептидазы А при добавлении в среду субстрата. Небольшие перемещения остатков аминокислот наблюдали также у других ферментов, например у лизоцима (КФ 3.2.1.17).

Теория индуцированного соответствия объясняет те случаи, когда для превращения полимерного субстрата требуется, чтобы его цепь была не меньше определенного размера, при этом необходимые структурные элементы оказываются весьма удаленными от атакуемой связи. Так, например, для эффективного действия β -амилазы (КФ 3.2.1.2) необходимо, чтобы полисахаридная цепь содержала не меньше четырех глюкозных остатков. Теория объясняет также опыты, в которых было показано, что молекулы, не участвующие непосредственно в ферментативной реакции, действуют как активаторы в случае небольших плохих субстратов. Хорошим примером является действие трипсина [2135]. Этиловый эфир ацетилглицина гидролизуетсся ферментом, но значительно медленнее, чем специфический субстрат, например этиловый эфир ацетиллизина. Добавление в среду этиламина увеличивает скорость гидролиза этилового эфира ацетилглицина в 9 раз, при этом K_M существенно не изменяется. Небольшой субстрат вместе с положительно заряженным ионом способны вызвать конформационное изменение фермента, подобное тому, которое вызывает специфический субстрат с положительно заряженной боковой цепью. Сходная ситуация наблюдается в случае аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2). Скорость переноса аминокислотной группы от аланина на оксоглутарат увеличивается примерно на 20% в среде с формиатом, хотя формиат тормозит перенос аминокислотной группы от L-глутамата [4050]. Сродство фермента к аланину не изменяется в присутствии формиата, а сродство к формиату не изменяется в присутствии аланина. Эти результаты позволяют предполагать, что аланин и формиат независимо присоединяются к участкам связывания глутамата (который занимает оба участка), вызывая соответствующее конформационное изменение.

Теория Кошланда несомненно дает рациональное представление о фермент-субстратном взаимодействии для все большего и большего числа ферментов. Следует, однако, отметить, что ряд элементов концепции «замка и ключа» сохраняет значение, поскольку первичное взаимодействие субстрата с активным центром должно происходить с уже существующей в исходной конфигурации фермента констелляцией связывающих групп последнего. Цитри [796] проводит различие между «рецепторной

специфичностью», которая относится к взаимодействию лиганда с ферментом в исходной конформации, и «функциональной специфичностью», характеризующей взаимодействие лиганда с активной конформацией фермента (возникшей в результате первоначального связывания лиганда). Он отмечает, что в оригинальной формулировке концепции «замка и ключа» Эмиля Фишера [1345] учитывается возможность влияния субстрата на фермент. Фишер писал: «Фермент и субстрат должны соответствовать друг другу подобно замку и ключу, а также оказывать химическое действие друг на друга». Следует, однако, отметить в заключение, что степень конформационных изменений, наблюдавшихся в исследованных случаях, значительно варьировала, и нет оснований полагать, что конформационные изменения являются существенной стадией при функционировании любого фермента.

ПРИМЕРЫ, ИЛЛЮСТРИРУЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Специфичность отдельных ферментов изучена далеко не одинаково. В одних случаях мы располагаем весьма детальными сведениями, в других — небольшим числом отрывочных наблюдений. Для ряда ферментов весьма полные данные об их специфичности обесценены тем обстоятельством, что в экспериментах использовались недостаточно хорошо очищенные ферментные препараты. Нередко также исследование, хотя и очень детальное, ограничивалось только одним субстратом.

В этом разделе мы приведем таблицы, характеризующие специфичность ряда наиболее изученных ферментов. Эти таблицы составлены в основном по материалам работ, проведенных с высокоочищенными ферментными препаратами. Обсуждаемые ферменты расположены здесь в том же порядке, в каком они приведены в Списке ферментов.

ДЕГИДРОГЕНАЗЫ

За исключением нескольких ферментов с относительно широкой специфичностью, таких, как алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1—2, 71), альдегид-дегидрогеназы (КФ 1.2.1.3—5) и ацил-СоА — дегидрогеназы (КФ 1.3.99.3), все ферменты этой группы характеризуются весьма высокой степенью специфичности. Во многих случаях известна только одна пара субстратов, т. е. один донор и один акцептор водорода. Как правило, эти ферменты действуют только на указанную в Списке пару субстратов; исключения из этого правила во всех случаях оговорены.

Несколько особняком стоят в этой группе пероксидазы (подгруппа 1.11); они высоко специфичны только к пероксидазной группировке и в большинстве случаев мало специфичны по отношению к донору водорода.

ГЛЮКОЗООКСИДАЗА

Одним из лучших исследований по специфичности ферментов можно считать работы Кейлина и Хартри [2387, 2388], проведенные с чистой глюкозооксидазой из *Penicillium* (КФ 1.1.3.4). Как видно из табл. 6.3, глюкозооксидаза высокоспецифична по отношению к β -D-глюкозе. При любом изменении в молекуле этого субстрата скорость окисления резко уменьша-

Таблица 6.3

Специфичность глюкозооксидазы¹⁾

Углевод	Относительная скорость окисления	Углевод	Относительная скорость окисления
β -D-глюкоза	100	α -D-глюкоза	0,64
2-дезоксид-D-глюкоза	25	Трегалоza	0,28
2-дезоксид-6-фтор-D-глюкоза	3	Мальтоза	0,19
6-метил-D-глюкоза	1,85	D-альтроза	0,16
4,6-диметил-D-глюкоза	1,22	D-галактоза	0,14
D-манноза	0,98	Мелибиоза	0,11
D-ксилоза	0,98	Целлобиоза	0,09

¹⁾ Фермент не окисляет: D-фруктозу, L-фукозу, D-идозу, D-галактозу, L-арабинозу, D-аллозу, D-гулозу, D-рибозу, L-сорбозу, L-рамнозу, D-тагатазу, глюконогептозу, сахарозу, лактозу, мелицитозу, раффинозу, D-глюкуронат, D-галактуронат, 2-амино-2-дезоксид-D-глюкозу, 2-амино-2-дезоксид-D-галактозу, 2-метил-D-глюкозу, 3-метил-D-глюкозу, 2,3-диметил-D-глюкозу, 2,3,6-триметил-D-глюкозу, 2,4,6-триметил-D-глюкозу, 2,3,4,6-тетраметил-D-глюкозу, 2,4-диметил- α -D-галактозу, 4,6-диметил- α -D-галактозу, 2,4,6-триметил- α -D-галактозу, 2-метил- β -D-галактозу, 2,6-диметил- β -D-галактозу, 3,4-диметил- β -D-галактозу, 3,4,6-триметил-D-фруктофуранозу, α -D-метилглюкозид, 2-метил- α -D-метилглюкозид, 2-метил- β -D-метилглюкозид, 2,3-диметил- α -D-метилглюкозид, 2,3,6- β -D-метилглюкозид, 2,3,4,6-тетраацетил-D-глюкозу, пентаацетил-D-глюкозу, 3,4,6-триацетил-2-дезоксид-D-глюкозу, α -D-глюкозо-1-фосфат, D-глюкозо-6-фосфат, D-фруктозо-6-фосфат, D-фруктозо-1,6-дифосфат [442, 2387, 2388, 4396].

ется. Так, из восьми D-альдогексоз фермент окисляет только три (D-маннозу, D-альтразу и D-галактозу) и то с очень низкой скоростью. Даже другой аномер D-глюкозы (т. е. α -D-глюкоза) окисляется в 150 раз медленнее. Если замещение происходит при втором углеродном атоме (за исключением замены

гидроксильной группы водородом) или при третьем, то активность полностью утрачивается. В то же время фермент проявляет несколько меньшую специфичность по отношению к группам при четвертом или шестом углеродном атоме; в этих положениях возможны небольшие изменения, не влекущие за собой полной утраты активности. Так, например, при введении фтора вместо гидроксильной группы при шестом углеродном атоме скорость окисления уменьшается до 3%, метилирование уменьшается до 2%, а фосфорилирование — до нуля. Удаление $-\text{CH}_2\text{OH}$ -группы (т. е. образование пентозы) ведет к уменьшению скорости окисления в 100 раз.

Высокая специфичность глюкозооксидазы делает ее очень ценным реагентом в опытах по обнаружению и количественному определению глюкозы в биологическом материале.

ФЛАВОПРОТЕИДЫ

Флавопротеидные ферменты часто высоко специфичны по отношению к молекуле донора и эта специфичность во многих случаях была детально изучена; хорошим примером может служить рассмотренная выше глюкозооксидаза. Меньше внимания уделяли акцептору; поскольку свободные флавины способны очень быстро реагировать с различными акцепторами, высказывались предположения, что так же реагируют и флавопротеиды. Диксон [1113] на основании исследования двадцати флавопротеидных ферментов показал, что это не так; больше половины из них либо слабо взаимодействовали с O_2 , либо вообще не реагировали с ним; примерно половина исследованных ферментов оказалась неспособной восстанавливать феррицианид. Отмечена тенденция к отрицательной корреляции между способностями этих ферментов реагировать с двумя указанными акцепторами; однако D-аспартатоксидаза хорошо реагирует с обоими акцепторами, а дрожжевая D-лактатдегидрогеназа не реагирует ни с одним из них. Помимо хинонредуктазы лишь немногие флавопротеиды реагируют с хинонами; некоторые взаимодействуют с цитохромом или нитратом. Наиболее общим акцептором оказался дихлорфенолиндофенол, правда, некоторые флавопротеиды либо не реагируют с ним, либо реагируют очень медленно. Диксон приходит к заключению, что специфичность процесса окисления флавина, обусловленная белковым компонентом, может иметь большое значение в биологической функции флавопротеидов.

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3)

Специфичность этого флавопротеида (из почек свиньи) была детально изучена Диксоном и Клеппе [1117]. Этот фермент

очень специфичен к кислороду (акцептору). Величины K_M и V были определены для ряда аминокислот (доноров), акцептором являлся кислород; в результате удалось охарактеризовать влияние структуры субстрата как на сродство к ферменту, так и на реактивность. В этом исследовании было изучено также ингибирующее действие соответствующих гидрокси- и оксокислот.

В общем наблюдалась обратная зависимость между V и $1/K_M$, т. е. у субстратов с высоким сродством наблюдалась тенденция к низкой реактивности, и наоборот; вместе с тем отмечено много исключений из этого правила. Влияние длины цепи в серии гомологов D-аминокислот на $1/K_M$ было сходно с влиянием этого параметра на $1/K_i$ для соответствующих гидроксикислот и оксокислот; это является убедительным свидетельством того, что влияние на $1/K_M$ характеризует изменение сродства к аминокислотам. По мере увеличения длины цепи R-группы D-аминокислоты (до 4—6 углеродных атомов) величина $1/K_M$ возрастает до максимума, а при дальнейшем удлинении цепи снижается. Величина V ведет себя по-другому; она имеет два максимума: первый — при длине цепи 1 или 2 углеродных атома, и второй — при длине цепи 4 углеродных атома. Ароматические и гетероциклические аминокислоты также быстро окислялись, но сродство фермента к ним было значительно ниже, чем к лучшим алифатическим субстратам. L-аминокислоты совершенно не атаковались ферментом.

На основании этих результатов Диксон и Клеппе предложили схему активного центра оксидазы D-аминокислот, подобную той, которая была предложена для активного центра карбоксилэстеразы печени (с. 360—362). На одном конце центра находится положительно заряженная группа, взаимодействующая с карбоксильной группой субстрата; на другом конце расположен гидрофобный участок, связывающий алкильную цепь; каждая CH_2 -группа этой цепи вносит свой вклад в сродство. Гидрофобный участок может связывать и кольцевую структуру; он имеет, однако, ограниченную протяженность (по-видимому, из-за наличия полярных или объемных групп на границах), так что может связать фрагмент цепи, содержащий не больше четырех углеродных атомов. Ориентация связывающих групп обеспечивает надлежащий контакт аминогруппы и атома водорода, которые принадлежат α -атому, со связанной флавиновой группой, катализирующей окисление.

МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

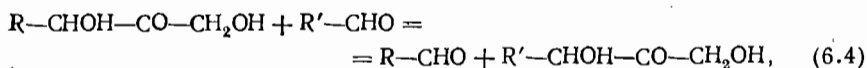
Метилтрансферазы, подобно дегидрогеназам, по-видимому, обладают высокой специфичностью в отношении обоих субстратов. Диметилтетин-гомоцистеин — метилтрансфераза (КФ

2.1.1.3) была изучена весьма детально Мо [3049], а также Дареллом и др. [1179], которые использовали частично очищенные препараты фермента из печени лошади и печени крысы. В реакции, катализируемой этим ферментом, акцептором служит только L-гомоцистеин; реакция с D-изомером протекает очень медленно. Ряд других тиолов, включая глутатион, цистеин и меркаптоэтанол, оказались неактивными, так же как и го-моцистин, аминокобутират, треонин и диметилглицин.

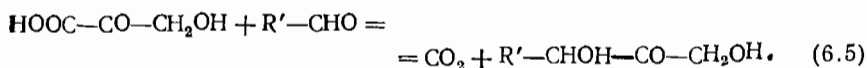
Лучшим донором является диметилтетин $(\text{CH}_3)_2\text{SCH}_2\text{COOH}$, однако ряд других метилсульфониевых соединений также обладает некоторой активностью. Одна метильная группа может быть заменена этильной (что сопровождается некоторым снижением активности, но диэтилпроизводные совершенно неактивны, так как фермент способен переносить только метильные группы. Удлинение углеродной цепи между атомом серы и карбоксильной группой ведет к значительному уменьшению активности; некоторой активностью обладает метионинметилсульфоний. Сера не может быть заменена азотом. Небольшая активность, наблюдавшаяся в случае бетаина [2483], связана с действием другого специфичного фермента (КФ 2.1.1.5).

ТРАНСКЕТОЛАЗА И ТРАНСАЛЬДОЛАЗА

Транскетолаза (КФ 2.2.1.1) отличается весьма широкой специфичностью. Она катализирует реакции типа

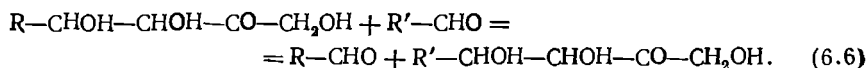


где R и R' могут быть представлены различными группами. От одного субстрата к другому переносится гликольальдегидная группа. В результате ранних работ с неочищенным препаратом фермента создалось впечатление, что в качестве донора может выступать D-рибулозо-5-фосфат; однако позднее было показано, что в препарате присутствовала эпимераза (КФ 5.1.3.1) и что истинным субстратом транскетолазной реакции является D-ксилулозо-5-фосфат [2039, 4431]. Известно, что донором могут служить следующие соединения: седогептулозо-7-фосфат, D-фруктозо-6-фосфат, D-ксилулозо-5-фосфат, а также (менее эффективно) октулозо-8-фосфат, L-эритрулоза и гидроксипируват [1037]. За исключением гидроксипирувата, у всех известных субстратов-доноров гидроксильные группы при C-3 и C-4 находятся в *транс*-положении. В случае гидроксипирувата группа R донора с соседним водородным атомом «заменена» атомом кислорода, так что имеет место следующая реакция:



Таким образом, в присутствии подходящего альдегида-акцептора фермент действует в отношении гидроксипирувата как декарбоксилаза.

Трансальдолаза (КФ 2.2.1.2) катализирует реакцию типа



В этом случае переносится диоксиацетоновая группа. Установлено, что донорами могут служить: октулозо-8-фосфат, седогептулозо-7-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктоза, L-сорбозо-6-фосфат и эритроулоза [4891].

ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Некоторые из гликозилтрансфераз (подгруппа 2.4) специфически катализируют перенос гликозильной группы на неорганический фосфат или с неорганического фосфата (а также арсената). В этих случаях реакцию можно рассматривать как фосфоролитическое расщепление (или соответственно синтез) гликозидной связи и ферменты, катализирующие эти процессы, можно считать фосфорилазами. Типичная фосфорилазная реакция может быть представлена уравнением



где G — гликозильная группа, P — фосфат, A — акцептор гликозильной группы. Ниже мы рассмотрим специфичность фосфорилаз как по отношению к акцептору гликозильной группы (A), так и по отношению к самой гликозильной группе (G).

Насколько известно, отдельные фосфорилазы проявляют высокую степень специфичности по отношению к одной определенной гликозильной группе. Так, α -глюканфосфорилаза (КФ 2.4.1.1) катализирует перенос только α -D-глюкозила. В реакции, катализируемой мальтозофосфорилазой (КФ 2.4.1.8), гликозильная группа в ходе переноса подвергается инверсии, так что при одном направлении реакции фермент специфичен в отношении α -D-глюкозы, а при другом — в отношении β -D-глюкозного остатка.

В отношении природы акцептора гликозильной группы фосфорилазы также проявляют высокую специфичность, правда, не абсолютную. Так, для α -глюканфосфорилазы картофеля акцептором глюкозильной группы должна быть полисахаридная цепь, содержащая не меньше четырех глюкозных остатков (хотя очень слабую активность можно обнаружить и у акцептора с тремя остатками) [238, 1409, 5026]. Глюкозильная группа под действием фермента переносится только к четвертому углеродному атому нередуцирующего концевой глюкозного остатка. Фермент хорошо действует лишь в том случае, если цепь со-

держит только 1,4- α -глюкозидные связи. Так, на лихенин, имеющий 1,4- β -глюкозидные связи, и на декстран, имеющий 1,6- α -глюкозидные связи, фермент не действует [5026]. Фермент из картофеля расщепляет гликоген медленнее и менее полно, чем фермент из тканей животных [2806]. Декстрины с разветвленной цепью, образующиеся из амилопектина и содержащие одну или две 1,6- α -глюкозидные связи вместо 1,4- α -глюкозидных связей, могут тормозить действие фермента [1409]. Декстрины из четырех или больше единиц, содержащие фосфатную группу у шестого углеродного атома второго или третьего глюкозного остатка, могут служить субстратами α -глюканфосфорилазы, но присутствие фосфатной группы уменьшает активность фермента примерно в 5 раз [3725].

Мышечная гликогенфосфорилаза в отличие от α -глюканфосфорилазы картофеля не действует на короткие прямые цепи декстринов и лучше всего атакует большие разветвленные молекулы. При фосфоролизе она атакует амилопектин или гликоген намного быстрее, чем амилозу. В обратной реакции она действует на остаточный декстрин, образовавшийся при фосфоролизе из амилопектина или гликогена, но не действует на остаточный декстрин, образовавшийся под действием β -амилазы, который содержит меньше четырех глюкозных остатков в главной цепи [879, 1935]. Другими словами, эта фосфорилаза не способна действовать на фрагменты из пяти глюкозных остатков, заключенные между точками ветвления главной цепи, хотя она может расщеплять боковую цепь вплоть до остатка, присоединенного 1,6-связью. Это различие в специфичности по отношению к главным и боковым цепям представляется несколько неожиданным.

Для действия ферментов имеет значение также размер молекулы субстрата; так, например, фермент из печени действует на небольшие молекулы гликогена лучше, чем фермент из мышц [4495].

Сахарозофосфорилаза (КФ 2.4.1.7) катализирует реакцию взаимодействия между сахарозой и неорганическим фосфатом. Первоначально этот фермент относили к фосфорилазам, но в отличие от истинных фосфорилаз он может катализировать перенос глюкозильных остатков с одного сахара на другой без участия фосфата. Специфичность сахарозофосфорилазы была детально изучена Хассидом и Дудоровым [1830]. Этот фермент катализирует перенос только α -D-глюкозильных групп и не переносит α -L-глюкозильные, α -D-маннозильные, α -D-галактозильные, α -D-ксилозильные или мелибиозильные группы. Под действием сахарозофосфорилазы α -D-глюкозильная группа переносится на фосфат, арсенат, D-фруктозу, L-сорбозу, D-ксилулозу, L-арабиноулозу или L-арабинозу, но не может переноситься на L-фруктозу, D-тагатозу, D-фруктозо-6-фосфат, D-фруктозо-1,6-

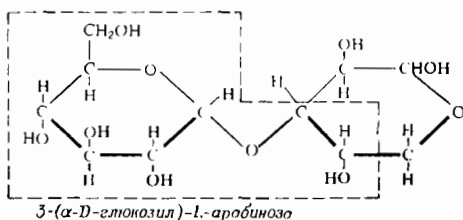
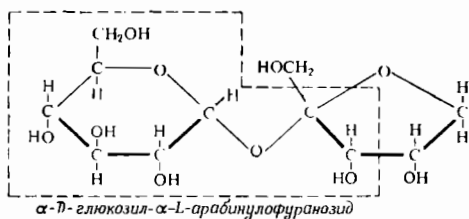
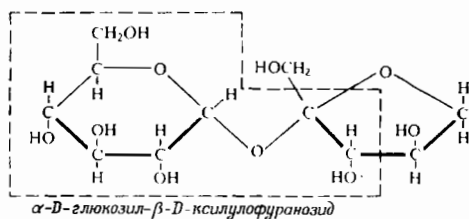
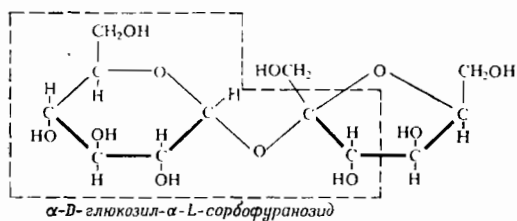
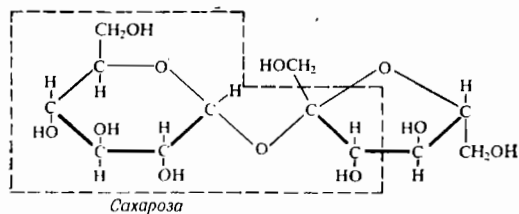


Рис. 6.3. Продукты реакции, катализируемой сахарозофосфорилазой.

бисфосфат, D-манногептулозу, D-глюкозу, D-маннозу, D-галактозу, L-рамнозу, L-фукозу, D-ксилозу, D-лихтозу, D-арабинозу, L-ксилозу, D-арабинозу, эритрозу, дигидроксиацетон или туранозу. Из пяти сахаров, способных служить акцепторами глюкозильных групп, четыре кетозы образуют нередуцирующие дисахариды (β -D-фруктофуранозид, α -L-сорбофуранозид, β -D-ксилофуранозид и α -L-арабинофуранозид), а одна альдоза — L-арабиноза, — акцептируя глюкозильный остаток, образует редуцирующий дисахарид [3(α -D-глюкопиранозил)-L-арабинопиранозу]. Этот результат не будет казаться неожиданным, если обратиться к рис. 6.3, из которого видно, что все пять дисахаридов имеют общую структуру (выделенную на схеме штриховой линией) [1626].

ФОСФОТРАНСФЕРАЗЫ

Киназы

Как и в случае дегидрогеназ, мы вновь встречаем здесь группу ферментов, для которых специфичность в отношении донора и акцептора следует рассматривать отдельно (только в данном случае речь идет о донорах и акцепторах фосфата, а не водорода). В общем фосфокиназы даже более специфичны, чем дегидрогеназы, как в отношении донора, так и в отношении акцептора. Например, в реакции переноса фосфата с АТФ на креатин, протекающей с участием креатинкиназы (КФ 2.7.3.2), креатин не может быть заменен креатинином, L-аргинином, D-аргинином или L-гистидином, правда, фермент проявляет небольшую активность по отношению к N-этилгликоциамину и гликоциамину. АТФ не может быть заменен АДР, аденозин-2'-фосфатом, аденозин-3'-фосфатом, аденозин-5'-фосфатом или ГТР; в обратной реакции АДР не может быть заменен АТФ [2620]. Такая высокая специфичность весьма типична для фосфокиназ. Однако в одном или двух случаях АТФ можно заменить другими нуклеозидтрифосфатами, тогда как в отношении акцептора фосфата фермент проявляет высокую специфичность. Пируваткиназа (КФ 2.7.1.40) высоко специфична к фосфоенолпирувату — не найдено ни одного субстрата, заменяющего его; вместе с тем АТФ можно заменить УТР, ГТР, СТР, ГТР или дезокси-АТФ [511].

Специфичность трех гексокиназ была исследована довольно тщательно. Результаты этих исследований представлены в табл. 6.4. Для каждого фермента приведена величина максимальной скорости реакции по отношению к скорости реакции с D-глюкозой, а также величина родства к каждому субстрату по отношению к соответствующей величине для D-глюкозы (при опре-

Таблица 6.4

Специфичность гексокиназ, полученных из различных источников

Субстрат ¹⁾	Дрожжи [370, 2648, 4397]		Мозг [4395]		Aspergillus [981]	
	Относительное сродство	Относительная максимальная скорость	Относительное сродство	Относительная максимальная скорость	Относительное сродство	Относительная максимальная скорость
D-глюкоза	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
D-фруктоза	0,14	1,8	0,0005	1,5	—	0,28
D-манноза	2,0	0,8	1,6	0,4	—	0,64
2-амино-2-дезоксид-D-глюкоза	0,07	0,7	0,1	0,6	0,47	0,55
D-галактоза	<0,002	0	0,0001	0,02	0,75	0,88
2-амино-2-дезоксид-D-галактоза	—	—	—	—	0,37	0,41
2-дезоксид-D-глюкоза	0,33	1,0	0,3	1,0	—	—
L-сорбоза	0	0	0	0	—	0,02
1,5-ангидро-D-глюцит	0,03	0,01	0,0003	1,0	—	—
1,5-ангидро-D-маннит	—	—	0,0004	0,9	—	—
D-арабиноза	<0,001	0	0,000004	0,1	—	0,04
D-аллоза	<0,001	<0,1	0,001	0,5	—	—
D-глюкозон	5,0	0,2	0,8	0,08	—	—
3-дезоксид-D-глюкоза	—	—	0,0005	0,2	—	—
D-альтроза	—	—	0,003	0,11	—	—
2,5-ангидро-D-глюцит	—	0	0,00006	0,08	—	—
D-ксилоза	0,01	0	0,004	0	—	—
D-ликсоза	—	—	0,006	0	—	—
6-дезоксид-D-глюкоза	—	—	0,004	0	—	—
D-манногептулоза	0,67	0	0,16	0,01	—	—
D-глюкогептулоза	—	—	0,04	0,01	—	—
2-ацетиламино-2-дезоксид-D-глюкоза	0,1	0	0,1	0	—	—
2-метиламино-2-дезоксид-D-глюкоза	—	—	0,04	0	—	—

¹⁾ Фермент из дрожжей не способен фосфорилировать α -метилглюкозид, 1-метилфруктозу, 3-метилглюкозу, 3-метилфруктозу, D-глюцит, L-рамнозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу и раффинозу; фермент из ткани мозга не фосфорилирует α - и β -метилглюкозиды, 2-метилглюкозу, 3-метилглюкозу, D-глюцит, α -глюкозо-1-фосфат, глюконо-5-лактон и D-рибозу.

делении ее исходили из предположения, что мерой сродства служит величина, обратная K_M). Для тех субстратов, для которых скорость реакции оказалась очень небольшой или равной нулю, данные по сродству основывались на определении величины K_i с использованием в качестве субстрата фруктозы. Действительные значения K_M для глюкозы оказались следующими: $1 \cdot 10^{-4}$ М (фермент из дрожжей), $8,0 \cdot 10^{-6}$ М (фермент из ткани мозга) и $1,6 \cdot 10^{-4}$ М (фермент из *Aspergillus*).

Из приведенных в табл. 6.4 данных видно, что кристаллический фермент из дрожжей способен фосфорилировать ряд различных сахаров. Примерно с одинаковыми скоростями фосфорилируются α - и β -формы D-глюкозы и D-маннозы. D-фруктоза реагирует только в β -фуранозной форме [1623—1625].

Наряду с соединениями, приведенными в табл. 6.4, фермент из дрожжей может фосфорилировать также 2,5-ангидро-D-маннит [633]. Готтшалк [1626] пришел к заключению, что фермент специфичен к структуре молекулы в области 3,4,5,6-атомов, которая является общей для группы веществ, приведенных на рис. 6.4.

Крейн [906] проанализировал данные, полученные для фермента из мозга (табл. 6.4), особенно величины K_M , которые в данном случае он полагал близкими к K_s . Если K_M для соединения, не имеющего —ОН-группы, значительно больше, чем для исходного соединения, то есть основание предположить, что эта —ОН-группа участвует в специфическом взаимодействии с ферментом. На этом основании сделано заключение, что гидроксилы у С-1, С-3 и С-6 глюкозы и у С-2, С-3 и С-6 фруктозы являются группами, взаимодействующими с ферментом, и что гидроксил у С-4 не участвует в связывании. Рис. 6.5 иллюстрирует предположения Крейна о характере взаимодействия фермента из мозга с субстратом D-глюкозой. К ферменту субстрат присоединяется в конформации «кресла» β -D-глюкопиранозы с экваториальным расположением гликозидной группы. Затем конформация сахара в комплексе изменяется таким образом, что гликозидная группа оказывается в аксиальном положении; это позволяет произойти реакции. Возможность осуществления реакции с субстратом (в отличие от ингибитора) обусловлена, следовательно, способностью субстрата переходить в конформацию «кресла» с аксиальным расположением гликозидной группы.

Многие киназы более или менее специфичны по отношению к определенной структуре молекулы сахара. Глюкокиназа печени (КФ 2.7.1.2) действует на D-глюкозу и D-маннозу, но не на фруктозу и многие другие сахара; кетогексокиназа печени (КФ 2.7.1.3) фосфорилирует D-фруктозу и ряд других кетоз в положении 1, а не в положении 6; фруктокиназа (КФ 2.7.1.4) из тканей растений высоко специфична к D-фруктозе; рибоки-

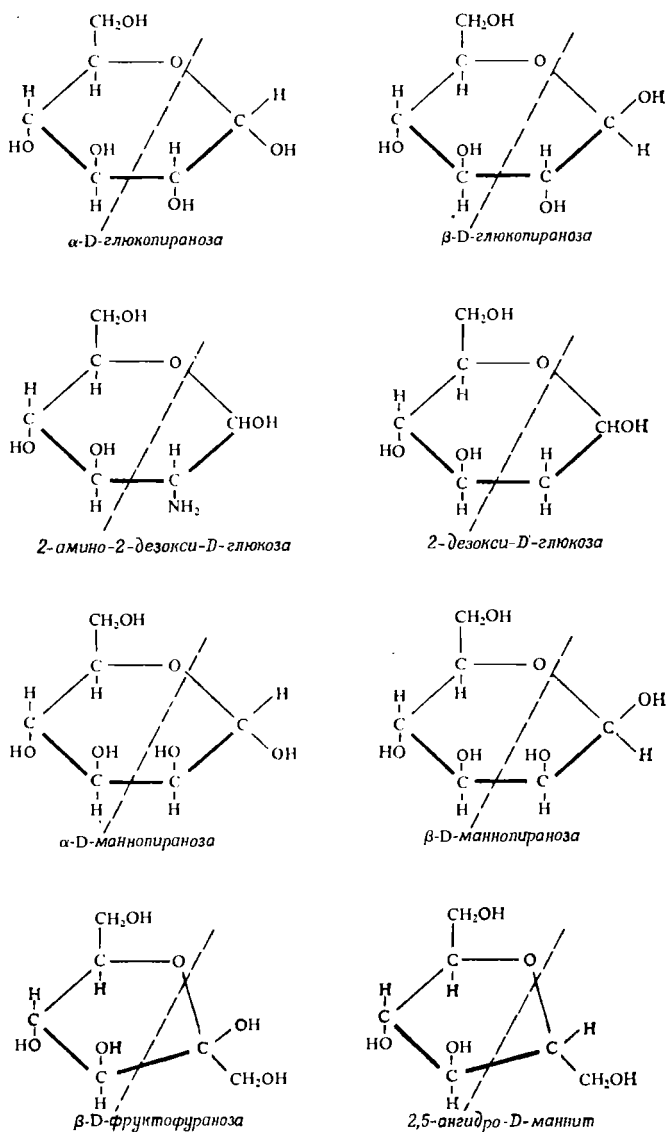


Рис. 6.4. Субстраты дрожжевой гексокиназы.

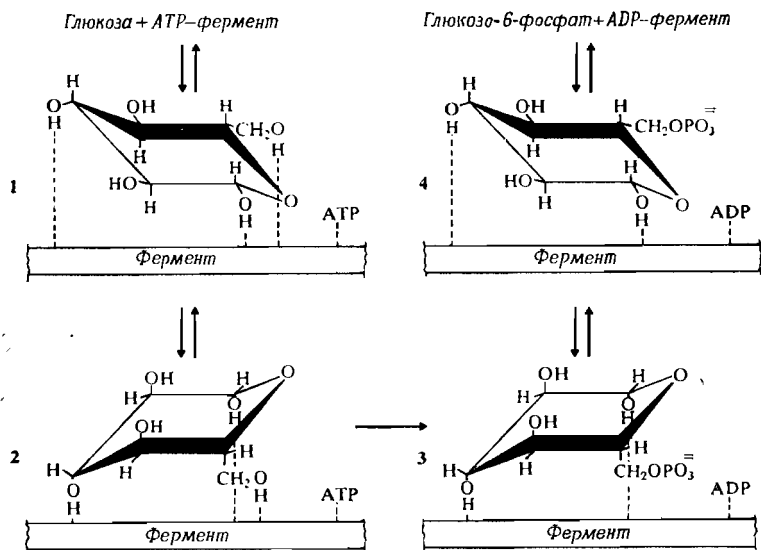


Рис. 6.5. Взаимодействие гексокиназы из мозга с субстратом [906].

наза (КФ 2.7.1.15) высоко специфична к D-рибозе и не действует на D-глюкозу, D-галактозу, D-рибулозу, D-рибон-4-лактон, D-рибозо-2- или -3-фосфат, D- или L-арабинозу, D- или L-ксилозу или D-ликтозу.

ЭСТЕРАЗЫ

Эти ферменты, вообще говоря, имеют гораздо более широкую специфичность, чем рассмотренные выше, и это обуславливает трудности их классификации и номенклатуры. Многие из ферментов, входящих в подгруппу 3.1.1, в действительности являются группой ферментов со сходной специфичностью; показано, что некоторые из них представлены в определенной ткани множественными формами, незначительно отличающимися по специфичности; установлено также, что у соответствующих ферментов из различных видов часто наблюдаются различия в специфичности. Имеются также перекрывания в специфичности с некоторыми ферментами, относящимися к другим группам. Так, 4-нитрофенилацетат, широко используемый для обнаружения эстеразной активности, гидролизует также более специфичными эстеразами, например ацетилхолинэстеразой, и протеолитическими ферментами, например химотрипсином.

Простые эстеразы и липазы катализируют гидролиз незаряженных субстратов; они специфичны главным образом в отношении длины и формы углеводородных цепей по обе стороны от

эфирной связи. Панкреатическая липаза (КФ 3.1.1.3) относится к особой категории ферментов, поскольку она эффективно действует только на поверхности раздела между водой и нерастворимым эфирным субстратом. Другие эстеразы различаются на основе таких критериев, как способность гидролизовать ароматические эфиры или способность ингибироваться фосфорорганическими соединениями, например DFP. Так, карбоксилэстеразы подгруппы КФ 3.1.1.1 гидролизуют как ароматические, так и алифатические эфиры и ингибируются DFP; арилэстеразы (КФ 3.1.1.2) слабо действуют на алифатические эфиры и не ингибируются DFP.

Карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1)

Ряд ферментов этой группы, особенно из печени млекопитающих, был выделен в высокоочищенном состоянии и весьма обстоятельно изучен; полученные данные были недавно обобщены в обзоре Криша [2605]. Однако сравнительно мало исследованы особенности их специфичности. Одно из достаточно полных исследований проведено Уэббом [5011] на частично очищенном ферменте из печени лошади. В качестве субстратов были использованы различные алифатические и нейтральные ароматические эфиры, и для каждого были определены величины V и K_m (для многих субстратов графики Михаэлиса оказались нелинейными). Результаты, полученные для ряда эфиров с неразветвленной цепью, приведены в табл. 6.5.

Влияние изменений в ацильной и алкильной частях молекулы субстрата до некоторой степени различно. С удлинением ацильной части молекулы сродство и реакционная способность сначала увеличиваются параллельно, вплоть до цепи с 4—5 углеродными атомами, но дальнейшее увеличение длины цепи вызывает уменьшение реакционной способности, хотя сродство продолжает быстро возрастать (по крайней мере до 10 углеродных атомов). При удлинении алкильной цепи до 4—6 углеродных атомов также наблюдается параллельный рост сродства и реакционной способности; однако дальнейшее увеличение длины цепи вызывает снижение как реакционной способности, так и сродства. У эфиров с относительно короткими цепями алкильная группа оказывает гораздо большее влияние на сродство, чем ацильная группа, тогда как для реакционной способности характерны обратные соотношения. С повышением степени разветвленности цепи резко возрастает сродство и несколько снижается реакционная способность. У лучших субстратов на обоих концах молекулы находятся неполярные группы. Фениловые и нитрофениловые эфиры являются хорошими субстратами. Гидролизуются также некоторые циклические соединения, такие, как бутиролактон и оксазолины.

Таблица 6.5

Специфичность карбоксилэстеразы из печени лошади¹⁾

	$-\text{OCH}_3$	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	$-\text{OC}_3\text{H}_7$	$-\text{OC}_4\text{H}_9$	$-\text{OC}_5\text{H}_{11}$	$-\text{OC}_6\text{H}_{13}$	$-\text{OC}_7\text{H}_{15}$	$-\text{OC}_8\text{H}_{17}$	$-\text{OC}_9\text{H}_{19}$
HCO—	1,0 0,2								
CH ₃ CO—	0,26 0,018	0,06 0,04	0,12 1,55	0,28 3,1	0,18 1,1	0,45 0,87	0,3 2,5	0,13 1,8	1,5 1,0
C ₂ H ₅ CO—	1,28 0,025	0,46 0,43		2,0 4,7	1,5 2,2				
C ₃ H ₇ CO—	2,0 0,46	1 1	2,0 0,93	4,5 2,9	3,5 6,7	2,5 11,7	1,1 5,3		2,1 12,5
C ₄ H ₉ CO—	1,85 1,12	1,04 2,3		3,2 3,3					
C ₅ H ₁₁ CO—	2,35 1,18	0,6 2,2		1,7 4,2					
C ₆ H ₁₃ CO—	1,75 1,3	0,92 4,0				0,32 2,5			
C ₇ H ₁₅ CO—	1,25 2,85	0,8 3,4							
C ₈ H ₁₇ CO—	1,05 10,0								
C ₉ H ₁₉ CO—	0,36 22,0								

¹⁾ Пояснение к таблице. В левой колонке приведены ацильные группы, а в верхнем ряду алкильные группы исследованных эфиров с неразветвленными цепями; в последней колонке для сравнения приведены результаты, полученные с фенольными эфирами. Для каждого эфира верхняя величина — максимальная скорость, нижняя — скорость; обе величины относительные (за единицу приняты соответствующие величины для этилового эфира n-масляной кислоты). Средство рассматривается как 1/К_м.

Подобное влияние длины цепи было показано и другими исследователями. Хофсти [1990] нашел, что реактивность эфиров неразветвленных жирных кислот и 3-гидроксibenзойной кислоты увеличивается с длиной ацильной цепи (до 12 углеродных атомов). В опытах с очищенной карбоксилэстеразой из слизистой кишечника козы Мальхотра и Филип [2957] нашли, что при гидролизе 4-нитрофениловых эфиров оптимум активности наблюдается для соединений с 4 атомами углерода в ацильной группе.

На рис. 6.6 изображена схема строения активного центра карбоксилэстеразы из печени лошади, предложенная Уэббом для объяснения результатов, приведенных в табл. 6.5. Хотя эстеразный участок связывает сложноэфирную группировку субстрата и, следовательно, определяет расположение молекулы, однако связывающая сила у него меньше, чем у ацильного и алкильного участков. Поскольку последние взаимодействуют с неполярными цепями, главную роль в связывании субстрата должны играть вандерваальсовы силы. Толщина линий штриховки на схеме качественно характеризует величину сил взаимодействия на разных участках. Алкильный участок изображен сравнительно небольшим; он заполнен *n*-бутильной цепью или фенильным кольцом. На ацильной стороне показан вторичный ацильный участок, который сильно увеличивает связывание субстрата, но уменьшает реакционную способность из-за нарушения ориентации в эстеразном участке. Несомненно, что это слишком упрощенная картина, поскольку, как было показано, фермент активируется субстратом [2605, 4518], по крайней мере если субстратами являются ароматические эфиры. Далее, реакция проходит через стадию ацилфермента [4518], и измеряемая величина *V* в случае относительно менее реактивных субстратов характеризует стадию образования этого интермедиата, а в случае более реактивных субстратов — предельную скорость гидролиза ацилфермента.

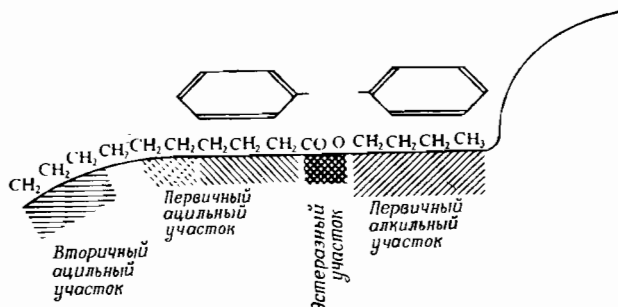


Рис. 6.6. Возможная конфигурация активного центра карбоксилэстеразы [5011].

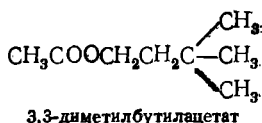
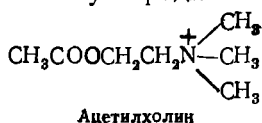
Холинэстеразы

Ферменты, гидролизующие эфиры холина, относятся к группе сериновых ферментов, сильно ингибируемых DFP; они ингибируются также алкалоидом эзерином (гл. 8). Хотя эти ферменты были предметом интенсивного исследования, только небольшое число их получено в высокоочищенном состоянии (см. обзоры [185, 186, 1444]). В работах Менделя и сотр., опубликованных в 1943 г. [3123, 3124], было впервые высказано предположение о том, что существуют два основных типа этих ферментов. Мендель и сотр. называли их «истинными холинэстеразами» и «псевдохолинэстеразами»; эти типы соответствуют двум группам ферментов, находящихся в последнем Списке, — ацетилхолинэстеразе (КФ 3.1.1.7) и холинэстеразе (КФ 3.1.1.8). Ферменты этих групп существенно различаются по кинетическим и другим свойствам, а также имеют большие различия в специфичности, хотя как те, так и другие гидролизуют ацетилхолин. Мендель предложил использовать специфические субстраты, которые гидролизуются преимущественно ферментами одной из групп, а именно ацетил- β -метилхолин для КФ 3.1.1.7 и бензоилхолин для КФ 3.1.1.8; каждая группа состоит из ряда ферментов, несколько отличающихся по специфичности. Так, бензоилхолин является отличным субстратом для некоторых представителей КФ 3.1.1.8, другие же ферменты этой группы значительно лучше гидролизуют бутирилхолин или пропионилхолин.

Весьма детальные исследования специфичности рассматриваемых ферментов проведены Адамсом [22] и Адамсом и Уиттакером [23], которые сравнивали специфичность ацетилхолинэстеразы из эритроцитов и плазмы человека. Хотя были использованы лишь частично очищенные препараты ферментов, удалось, однако, показать, что полученные результаты обусловлены действием в каждом препарате только одного фермента. Было установлено, что каждый из ферментов гидролизует как холиновые, так и нехолиновые эфиры. Варьируя длину ацильной цепи, присоединенной к холину, названные авторы нашли, что скорость расщепления эфиров холина под действием ацетилхолинэстеразы резко уменьшается с увеличением длины цепи: бутирилхолин гидролизуетс $\ddot{y}$ со скоростью, равной только 1—2% скорости гидролиза ацетилхолина. С холинэстеразой дело обстояло как раз наоборот — в этом случае бутирилхолин гидролизовался вдвое быстрее, чем ацетилхолин. Адамс и Уиттакер изучали, как влияет изменение длины ацильной и алкильной цепей на скорость гидролиза нехолиновых алифатических эфиров под действием ацетилхолинэстеразы и холинэстеразы. При изменении длины алкильной цепи (ацильная часть — ацетат) влияние было в общем сходным для обеих холинэстераз —

наиболее быстро гидролизовался бутилацетат. Подобные же результаты были получены и при гидролизе эфиров других групп. Однако при изменении длины ацильной цепи (алкильная группа одна и та же) между двумя холинэстеразами наблюдалось выраженное различие: ацетилхолинэстераза имела отчетливый оптимум с двухуглеродной ацильной группой (ацетат) и нулевую активность в случае бутирата, тогда как у холинэстеразы, наоборот, резкий максимум приходился на бутират.

Имеется много фактов, указывающих на то, что обе холинэстеразы обладают особым сродством к метильным группам; поэтому разветвление алкильной цепи увеличивает атакуемость эфиров ферментами (за исключением случая разветвления у углеродного атома, стоящего рядом с эфирной группой). Оптимальной алкильной группой в обоих случаях является, по-видимому, 3,3-диметилбутильная группа, которую можно рассматривать как углеродный аналог холина:



Интересно, что для действия обоих ферментов наличие заряженного атома азота, имеющегося в молекуле холина, не является обязательным, и одним из самых важных факторов оказывается форма молекулы. В то же время холинэстераза обладает более высокой специфичностью, нежели ацетилхолинэстераза: скорость гидролиза углеродного аналога холина при действии ацетилхолинэстеразы составляет 60% скорости гидролиза ацетилхолина, а при действии холинэстеразы — только 35%.

Холинэстеразы, подобно карбоксилэстеразе, гидролизуют наряду с алифатическими также и ароматические эфиры, часто с весьма высокой скоростью. Например, в случае очищенной ацетилхолинэстеразы из тканей электрического угря скорости гидролиза ацетилхолина, фенилацетата, 4-метоксифенилацетата и 4-нитрофенилацетата относятся как 1:2,4:0,85:0,1 [373].

ФОСФАТАЗЫ

В группе фосфатаз встречаются ферменты как с резко выраженной, так и с весьма широкой специфичностью. Кислая и щелочная фосфатазы (КФ 3.1.3.1 и 3.1.3.2) являются, подобно карбоксилэстеразам, группой распространенных ферментов с очень широкой специфичностью, несколько различающихся в зависимости от источника выделения. Все они действуют на различные моноэфиры ортофосфорной кислоты как на алифатические, например глицерол-1-фосфат и глицерол-2-фосфат, так и на ароматические, например 4-нитрофенилфосфат [1329, 2000,

3268]. Они не действуют на диэфиры и триэфиры фосфорной кислоты. Большое различие между двумя группами фосфатаз наблюдается при их действии на серусодержащие эфиры [2000]. Щелочная фосфатаза (но не кислая) гидролизует S-замещенные моноэфиры тиофосфорной кислоты, например цистеамин-S-фосфат; для действия кислой фосфатазы, по-видимому, необходим кислород в расщепляемой связи. Кислая фосфатаза (но не щелочная) гидролизует O-замещенные моноэфиры тиофосфорной кислоты, например O-4-нитрофенилтиофосфат. Это свидетельствует о том, что для действия щелочной фосфатазы необходимо, по-видимому, наличие двух гидроксильных групп в фосфатном радикале.

Было показано (в отличие от ранее полученных данных), что очищенная щелочная фосфатаза из ряда источников гидролизует также креатинфосфат, неорганический пирофосфат и некоторые полифосфаты, в том числе АТР и метафосфат с длинной цепи средних размеров [1330, 3277]. Специфичность фермента изменяется в зависимости от концентрации Mg^{2+} ; хотя этот катион является активатором фермента, он почти полностью ингибирует его пирофосфатазную активность, вероятно, путем уменьшения концентрации свободного иона пирофосфата [1330].

НУКЛЕАЗЫ

Группа ферментов, гидролизующих нуклеиновые кислоты, характеризуется широкой и перекрывающейся специфичностью; классификация этих ферментов весьма трудна и противоречива. Многие из них катализируют наряду с гидролизом реакции переноса. Для гидролитических ферментов способность к реакции переноса в присутствии высокой концентрации акцептора не является необычной, но панкреатическая рибонуклеаза образует 2',3'-циклический монофосфат примерно в 1000 раз быстрее, чем гидролизует его на следующей стадии реакции до 3'-монофосфата. Это дало основание Диксону и Уэббу в предыдущих изданиях данной книги классифицировать фермент как трансферазу, так же этот фермент был классифицирован и в Номенклатуре ферментов (1964 г.) [1265]. Две рибонуклеазы получили затем шифры КФ 2.7.7.16 и 2.7.7.17. Фермент КФ 2.7.7.16 характеризовался следующим образом: «Переносит 3'-фосфат пиримидиннуклеотидного остатка полинуклеотида из 5'-положения соседнего нуклеотида в 2'-положение самого пиримидинового нуклеотида с образованием циклического нуклеотида. Он также катализирует перенос фосфатной группы из 2'-положения циклического фосфата на воду; в результате суммарной реакции происходит деполимеризация РНК». Вместе с тем дезоксирибонуклеазу относили к гидролазам (КФ 3.1.4.6).

Прежняя классификация, как видим, была несовершенна,

поскольку две группы ферментов со сходной биологической функцией, заключающейся в деградации нуклеиновых кислот, относили к разным подгруппам. В последующих исследованиях было показано, что различие между ферментами этих групп не является абсолютным, оно в различной мере выражено у отдельных членов групп. У некоторых бактериальных рибонуклеаз относительные скорости переноса и последующего гидролиза весьма близки, так что интермедиаты (циклические монофосфаты) не накапливаются. Представлялось, с одной стороны, нерациональным включать их в подгруппу 2.7.7, а с другой — было бы необоснованно отделять их от панкреатической рибонуклеазы только потому, что относительные скорости двух стадий различны.

В издании Номенклатуры ферментов 1972 г. [1266] все нуклеазы помещены в подгруппу 3.1.4. Различие между рибонуклеазами и дезоксирибонуклеазами оказалось не очень четким, поскольку были обнаружены нуклеазы, которые гидролизуют полинуклеотиды, содержащие либо рибозу, либо дезоксирибозу, либо арабинозу [5023].

Ласковски [2710, 2712] считает, что специфичность определенной нуклеазы можно охарактеризовать, учитывая восемь различных признаков, являющихся более или менее независимыми. Они кратко рассмотрены ниже. Во всех случаях рассматриваемая реакция является гидролизом фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами.

1. Специфичность по отношению к сахару в нуклеотидной структуре. Этот признак является основой для разделения на рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы; однако, как было отмечено выше, некоторые нуклеазы не проявляют такой специфичности.
2. Фермент атакует связь, находящуюся на конце полинуклеотидной цепи (экзонуклеаза); если это условие не является необходимым, то фермент относится к эндонуклеазам. Рассматриваемое различие подобно тому, которое наблюдается между α - и β -амилазами. Одни экзонуклеазы атакуют молекулу по 3'-концу, другие — по 5'-концу.
3. Направленность действия на определенную «сторону» остатка фосфата, образующего лабильную связь; в результате образуется либо 5'-монофосфат, либо 3'-монофосфат.
4. Присутствие определенного основания в нуклеотидной единице, примыкающей к атакуемой связи. Специфичность некоторых ферментов в этом отношении весьма невелика: рибонуклеазы из растений и *E. coli* (КФ 3.1.27.1) гидролизуют связи по 3'-положению как пуриновых, так и пиримидиновых нуклеотидов. Панкреатическая рибонуклеаза (КФ 3.1.27.5) занимает промежуточное положение,

- она атакует связи по 3'-положению любого пиримидинового нуклеотида. В то же время фермент КФ 3.1.27.3 является строго специфичной эндонуклеазой, расщепляющей РНК по 3'-положению гуанилатного остатка.
5. Наличие определенной вторичной структуры: либо одноцепочечной, либо двухцепочечной нуклеиновой кислоты. Большинство нуклеаз проявляют очень высокую степень специфичности по рассматриваемому признаку; отношение скоростей гидролиза нуклеиновых кислот с различной вторичной структурой может превышать 10 000.
 6. Нуклеазы, атакующие двухцепочечную нуклеиновую кислоту, могут гидролизовать обе цепи либо в одном участке, так что продукты разделяются, либо в разных участках; в последнем случае для разделения продуктов необходим гидролиз ряда связей [5260].
 7. Некоторые дезоксирибонуклеазы не способны атаковать ДНК «своего» вида, их называют ферментами рестрикции [710].
 8. Наличие определенного участка молекулы нуклеиновой кислоты. Джонсон и Ласковски [2247] показали, что нуклеазу из бобов фасоли (КФ 3.1.30.2) можно считать «специфичной к определенным участкам». Фермент проявляет высокую специфичность к одноцепочечной (но не к нативной) ДНК; он атакует также РНК и арабинозилолигонуклеотиды, образуя во всех случаях 5'-фосфоолигонуклеотиды. Если субстратом является ДНК λ -фага, то ее молекула расщепляется на две половины, очевидно, в результате гидролиза ее в центральной части, в которой весьма высока концентрация А—Т-пар. Следовательно, фермент специфичен к «рыхлым» участкам нативного субстрата.

Некоторые из этих соображений были учтены в новой классификации нуклеаз [1266a], которая используется в данной книге. Введено четырнадцать новых подгрупп (3.1.11, 13—16, 21—27, 30—31) с учетом того, являются ли ферменты эндонуклеазами, специфичны ли они к рибонуклеиновым или дезоксирибонуклеиновым кислотам или действуют на оба вида, образуют ли они 5'-фосфомоноэфиры или другие фрагменты, являются ли они специфичными к определенным соседним основаниям или последовательностям. Известны еще не все возможные комбинации этих факторов специфичности; при дальнейшем изучении нуклеаз может оказаться необходимым введение дополнительных подгрупп.

ГЛИКОЗИДАЗЫ

Ферменты этой большой и важной группы расщепляют в основном субстраты, в молекуле которых не содержится заряжен-

ных групп. В этих субстратах доминирующую роль играет расположение гидроксильных групп и атомов водорода, и специфичность гликозидаз определяется конфигурацией каждой —СНОН-группы. Как правило, гликозидазы проявляют высокую степень специфичности по отношению к определенному моносахаридному кольцу; однако присоединенная агликоновая группа также может оказывать более или менее заметное влияние. В некоторых случаях (например, у нуклеозидаз) это влияние агликона бывает выражено даже сильнее, чем влияние моносахаридного компонента. Инозиназа (КФ 3.2.2.2), например, гидролизует гипоксантинрибозид, но не действует на ксантинрибозид.

В литературе имеется значительная информация о менее специфичных гликозидазах, например о ферментах КФ 3.2.1.20—26; большой материал приведен в обзорах Гельфериха [1893], Пигмана [3686] и Готшалка [1626]. Поскольку большинство прежних исследований было проведено с неочищенными препаратами ферментов, некоторые виды минорной активности могли быть обусловлены примесными ферментами. Однако ясно, что эта группа ферментов высокоспецифична в отношении конфигурации кольца сахара: например β -D-гликозидаза (КФ 3.2.1.21) не действует на β -D-маннозиды, β -D-галактозиды или α -D-гликозиды. Замещение по С-2, С-3 или С-4 полностью предотвращает гидролиз β -гликозидазой; замещение по С-6 снижает скорость гидролиза, а замещение группы $-\text{CH}_2\text{OH}$ на Н уменьшает скорость гидролиза в 200 раз. В ряде случаев отмечено влияние природы агликона, связанное, по-видимому, не с размерами или формой этого фрагмента молекулы, а с электроноакцепторными свойствами группы [3378].

Весьма характерны особенности специфичности ферментов, гидролизующих полисахариды, например амилаз (КФ 3.2.1.1—3). Все эти три фермента атакуют в цепях крахмала или гликогена α -1,4-связи, однако положение атакуемых связей в полисахаридной цепи различно. β -Амилаза отщепляет мальтозные фрагменты от нередуцирующих концов молекулы, вызывая инверсию по месту расщепляемой связи; экзо-1,4- α -гликозидаза отщепляет от тех же концов одиночные остатки сахара; под действием α -амилазы образуется смесь декстринов, по-видимому, в результате неупорядоченной атаки цепей.

В исследованиях, проведенных в последнее время на небольших субстратах, меченных ^{14}C , показано, что α -амилаза проявляет заметную специфичность по отношению к гидролизуемым связям [3958]. При гидролизе α -амилазой мальтотриозы обнаруживаются только глюкоза и мальтоза; если меченым является восстанавливающий конец, то находят как меченую глюкозу, так и меченую мальтозу. При низкой концентрации субстрата скорость образования меченой глюкозы в 4 раза боль-

ше скорости образования меченой мальтозы, однако при повышении концентрации субстрата отношение скоростей сначала выравнивается, а затем становится противоположным исходному. При высокой концентрации две молекулы мальтотриозы конденсируются, образуя мальтогексозу; при гидролизе последней образуются меченая мальтоза и немеченые глюкоза и мальтотриоза. При интерпретации этих результатов предполагают, что активный центр α -амилазы имеет пять подцентров, взаимодействующих с остатками глюкозы; каталитический центр локализован между подцентрами 2 и 3 ([3958], см. также обсуждение в [4721]). В случае пентасахаридного субстрата образуется только один фермент-субстратный комплекс, и первичная атака осуществляется исключительно по связи между вторым и третьим остатками сахара; при этом образуется меченая мальтоза и немеченая мальтотриоза. С другими субстратами может образовываться ряд комплексов; при этом гидролизуются несколько связей, однако с различными скоростями, как показано на рис. 6.7.

В экспериментах описанного типа определяют начальные скорости образования меченых продуктов. На основании ряда исследований с различными амилазами высказано предположение о возможности множественной атаки субстрата, когда в течение жизни одного фермент-субстратного комплекса гидролизуются несколько связей; при этом имеется высокая вероятность гидролиза связи, находящейся поблизости от только что

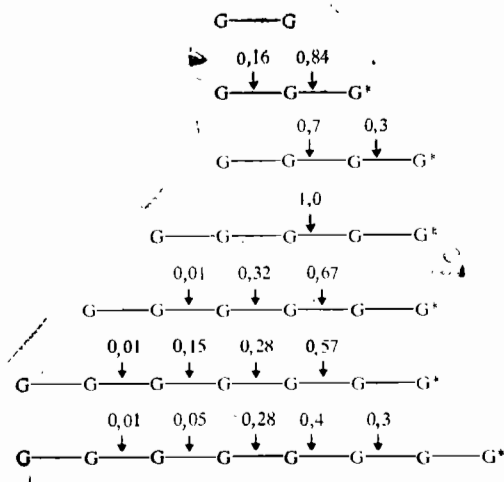


Рис. 6.7. Частота первоначальной атаки различных гликозидных связей в олигосахаридах (меченных ^{14}C) α -амилазой [3958]. G — остаток глюкозы, связанный α -1,4-связью; G* — ^{14}C -глюкоза, меченная на редуцирующем конце. Вертикальные стрелки указывают на гидролизуемые связи; цифры соответствуют относительной частоте первоначальной атаки.

прогидролизованной. В предельном случае («атака одиночной цепи») фермент полностью гидролизует одну молекулу субстрата, прежде чем начинает гидролизовать другую. Выраженность феномена множественной атаки, по-видимому, изменяется в зависимости от экспериментальных условий; так, в случае действия панкреатической α -амилазы при pH 10,5 после образования фермент-субстратного комплекса гидролизует одна связь, в то время как при pH 6,9 наблюдается выраженная множественная атака, перемещающаяся от первоначально атакующей связи в направлении нередуцирующего конца [3959]. Экспериментальные данные, подтверждающие протекание множественной атаки, и кинетический анализ процесса весьма подробно рассмотрены в [4721].

ПЕПТИДАЗЫ

Одно время считали, что специфичность протеолитических ферментов определяется величиной молекулы субстрата, и на этом основании подразделяли эти ферменты на протеиназы и пептидазы. Однако, как только исследователям стало доступно большое число синтетических пептидов, обнаружилось, что такое разделение ошибочно, ибо протеиназы в действительности способны гидролизовать также и очень небольшие пептиды, если только эти пептиды имеют соответствующую структуру. Установив этот факт, Бергман радикально изменил представления, царившие в этой области энзимологии. Теперь нам ясно, что определяющим фактором служит не величина молекулы субстрата, а природа аминокислотных боковых групп, находящихся по соседству с гидролизуемой связью. Установлено, что каждый фермент предъявляет совершенно определенные требования к субстрату и гидролизует только те пептидные связи в белках, которые удовлетворяют этим требованиям. При исследовании наиболее важных протеолитических ферментов были использованы сотни синтетических субстратов и родственных соединений. Многие из полученных ранее полуколичественных данных были сведены в таблицы (см. предыдущие издания книги); в этом издании они не приведены. Однако в полученной информации имеются значительные пробелы, в частности специфичность рассматриваемых ферментов охарактеризована далеко не полностью. Число ди- и трипептидов, которые теоретически можно синтезировать из известных аминокислот, составляет около 10 000; исследована только часть таких пептидов, причем преимущественно в опытах с одним или двумя ферментами. Во многих случаях были найдены несколько соединений, которые можно рассматривать как «специфические субстраты», расщепляемые только одним определенным ферментом.

Большинство белков гидролизуются в той или иной степени многими протеолитическими ферментами, поскольку они содержат большой набор различных пептидных связей, который с большой вероятностью включает связи, чувствительные к действию определенного фермента, как об этом свидетельствуют опыты с небольшими синтетическими пептидами. По мере того как становились доступными крупные пептиды с известной последовательностью аминокислот, проводились исследования специфичности пептидаз непосредственно на крупных субстратных молекулах.

В большинстве случаев результаты, полученные на крупных пептидах, совпадают с теми, которые были получены раньше на более простых субстратах; иногда, однако, в крупных пептидах обнаруживаются дополнительные чувствительные связи. Так, пепсин гидролизует в инсулине связь между лейцином и валином, которая не попала в число чувствительных по данным гидролиза ди- и трипептидов.

Наряду с природой аминокислот, образующих гидролизуюмую связь, важной характеристикой специфичности пептидаз является положение гидролизуюемой связи; по этому признаку различают две главные группы пептидаз. Экзопептидазы — это ферменты подгрупп 3.4.11—15, для действия которых требуется либо свободная концевая аминогруппа (аминопептидазы), либо свободная концевая карбоксильная группа (карбоксипептидазы). Остальные пептидазы гидролизуют определенные связи внутри цепи; действие некоторых из них тормозится, если около гидролизуюемой связи находится свободная концевая группа.

Ниже приведены краткие данные о специфичности некоторых наиболее важных пептидаз (в последовательности, соответствующей их положению в Списке ферментов).

Аминопептидаза (цитозоля) (КФ 3.4.11.1)

Этот фермент раньше назывался лейцинаминопептидазой, поскольку он с высокой скоростью отщепляет от пептидов N-концевой L-лейцин; он отщепляет также N-концевые изолейцин, валин и ароматические аминокислоты и гидролизует амиды многих аминокислот. Фермент стереоспецифичен к L-аминокислотам.

Трипептид-аминопептидаза (КФ 3.4. 11. 4)

Этот фермент необычен в том отношении, что гидролизует только трипептиды, у которых свободны как α -аминогруппа, так и α -карбоксильная группа. Не атакуются дипептиды, амиды дипептидов, ацилированные трипептиды и тетрапептиды. Из

числа изученных лучшими субстратами являются трипептиды алифатических аминокислот, например глицилглицилглицин и L-аланилглицилглицин.

Дипептид-гидролазы (КФ 3.4.13)

Известен ряд истинных дипептидаз, для действия которых необходимо наличие у субстрата-дипептида свободных α -аминогруппы и α -карбоксильной группы. Типичным примером является глицилглицин-дипептидаза (КФ 3.4.13.1). Пептидная связь должна быть немодифицированной, в то же время один (но не оба) водородный атом аминогруппы может быть замещен метильной группой.

Описаны дипептидазы, которые специфичны к пролину и оксипролину либо в N-концевом положении [(КФ 3.4.13.8), пролил-дипептидаза, ранее называвшаяся пролиназой], либо в C-концевом положении [(КФ 3.4.13.9), пролин-дипептидаза, ранее называвшаяся пролидазой]. Последний фермент отличается от большинства пептидаз тем, что он гидролизует не обычную пептидную связь, а имидную связь между α -карбоксильной группой и циклической иминокислотой.

Карбоксипептидаза (КФ 3.4.16.1)

Карбоксипептидаза атакует субстраты со свободной α -карбоксильной группой и в отличие от многих ферментов, описанных в этом разделе, не гидролизует амиды или эфиры, образованные простыми спиртами. Специфичность фермента определяется главным образом той аминокислотой, которая несет свободную карбоксильную группу, и лишь в значительно меньшей степени — частью молекулы; расположенной в направлении N-конца от этой аминокислоты; эта часть может быть представлена даже ацильной группой.

Активность этого фермента мало зависит от длины пептидной цепи; однако дипептиды гидролизуются очень медленно, если не ацилирована их аминогруппа. Фермент используют для последовательного гидролиза пептидов с целью идентификации C-концевых аминокислот, но некоторые аминокислоты либо отщепляются очень медленно, либо вообще не отщепляются. Наиболее быстро отщепляются концевые аминокислоты с ароматическими или разветвленными алифатическими боковыми цепями. Ароматические аминокислоты в третьем с C-конца положении (и в меньшей степени во втором, четвертом и пятом положениях) значительно увеличивают сродство субстрата к ферменту, но не влияют существенно на каталитическую константу [14].

Химотрипсин (КФ 3.4.21.1)

Химотрипсин был исследован, вероятно, более детально, чем какой-либо другой очищенный фермент; охарактеризована его специфичность по отношению к большому числу синтетических субстратов. Некоторые из них уже упоминались в связи с вопросом о стереоспецифичности фермента (с. 336—338). Наряду с пептидами фермент гидролизует амиды и эфиры, при этом он расщепляет предпочтительно связи, образованные остатками ароматических аминокислот. Лучшими субстратами являются эфиры, особенно эфиры N-ацилтирозина; эфиры фенилаланина гидролизуются медленнее. Гидролизуются также и некоторые эфиры триптофана и метионина; эфиры аргинина, норлейцина и валина расщепляются чрезвычайно медленно. Если бензольное кольцо фенилаланина в субстрате заменить на циклогексановое, то скорость гидролиза не уменьшается. Если же фенилаланин заменить на O-алкилтирозин или 4-иодфенилаланин, то скорость гидролиза уменьшается в 1000 и более раз. Эти результаты были интерпретированы в рамках представлений о способности субстрата комплементарно связываться в гидрофобном кармане молекулы фермента (рис. 10.9), сформулированных на основе данных рентгеноструктурных исследований [466].

Наличие в субстрате свободной α -аминогруппы снижает атакуемость, поэтому N-ацилпроизводные являются более эффективными субстратами, особенно если в ацильной группе содержится ароматическое кольцо. Вместе с тем N-метилирование гидролизующей —CO—NH-группы приводит к значительному снижению атакуемости.

Для объяснения наблюдаемой специфичности химотрипсина Хейн и Ниман [1873] сформулировали общие представления о взаимодействии между субстратами и активным центром фермента (см. также с. 339). Постулируется, что три участка активного центра ρ_1 , ρ_2 и ρ_3 взаимодействуют с группами R_1 , R_2 и R_3 субстрата $R_1\text{CHR}_2\text{COR}_3$ соответственно. Активными являются только те фермент-субстратные комплексы, в которых группа —COR₃ находится в надлежащей ориентации по отношению к ρ_3 ; эти комплексы оказываются более реакционноспособными, когда R_3 представлен —OR' (по сравнению с $R_3 = \text{—NHR''}$ при сходных размерах R' и R''). При увеличении размера R_2 взаимодействие между данной группой и участком ρ_2 становится доминирующим фактором, определяющим скорость гидролиза. Для высокой эффективности гидролиза необходимо, чтобы участок ρ_1 занимала α -ациламиногруппа; замена ее менее полярными группами может снизить скорость гидролиза в 10^4 раз. Разветвление боковой цепи на расстоянии двух углеродных атомов от реактивного карбонила приводит к сте-

рическим препятствиям как для связывания, так и для гидролиза.

Трипсин (КФ 3.4.21.4)

Трипсин гидролизует связи (не обязательно пептидные), в которых карбоксильные группы принадлежат основным аминокислотам — лизину или аргинину. Амиды расщепляются быстрее, чем пептиды, а сложные эфиры — быстрее, чем амиды. На скорость гидролиза эфиров не влияет природа спиртовой группы. Даже такое простое соединение, как этиловый эфир лизина, быстро гидролизует трипсином. Замещение аминокруппы в боковой цепи делает гидролиз невозможным, тогда как замещение α -аминогруппы, наоборот, благоприятствует гидролизу. В то же время при удалении α -аминогруппы гидролиз оказывается невозможным. Так, бензоилглициллизинамид или бензоиллизиллизиллизин гидролизуются быстро, в то время как бензоилглицил (ω -карбобензоксизил)-амид или этиловый эфир ϵ -аминокапроновой кислоты не атакуются. Наличие кислотной боковой цепи у соседнего с атакуемым аминокислотного остатка снижает эффективность гидролиза. Показано, что трипсин способен гидролизовать соединение $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{COCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ (по связи $\text{CO}-\text{CH}_2$), являющееся β -кетокислотой с лизиноподобной боковой цепью.

Специфические требования трипсина могут быть удовлетворены, даже если необходимые группы находятся на разных молекулах. Инагами и Мураки [2135] исследовали влияние некоторых четвертичных катионов на катализируемый трипсином гидролиз пептидов. Все исследованные катионы оказались конкурентными ингибиторами гидролиза специфических субстратов, например этилового эфира бензоил-L-аргинина. Однако гидролиз ацетилглицина ускорялся в 3, 9 и 2 раза метиламином, этиламином и 1-*n*-пропиламином соответственно; 1-*n*-бутиламин оказался ингибитором. При взаимодействии с соответствующим ионом происходит активация трипсина, при этом сродство к субстрату не изменяется. Положительно заряженная группа индуцирует активацию каталитического участка фермента подобно тому как это осуществляют аргинильная или лизильная боковые группы специфических субстратов.

Пепсин (КФ 3.4.23.1)

Специфичность этого фермента до конца не выяснена¹. Хотя пепсин первым из всех протеолитических ферментов был по-

¹ Вопрос о специфичности пепсина с учетом новых данных рассмотрен в работе Антонова и сотр. [Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К., Биоорганическая химия, 2, 803—810 (1976); Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К., Биоорганическая химия, 3, 1663—1670 (1977)]. — *Прим. перев.*

лучен в кристаллическом виде, его специфичность изучена хуже, нежели специфичность большинства других ферментов. Установлено, что пепсин гидролизует белки намного медленнее, чем это делают другие протеиназы. Еще медленнее он действует на пептиды. Одно время даже сомневались в способности пепсина расщеплять синтетические пептиды и наблюдавшийся незначительный гидролиз под влиянием препаратов пепсина склонны были приписывать действию другого, сопутствующего пепсину фермента. Кристаллический пепсин из лосося не расщепляет те синтетические пептиды, которые гидролизует пепсин млекопитающих [1999, 3464].

В противоположность некоторым другим пептидазам пепсин не действует ни на амидные, ни на сложноэфирные связи и гидролизует только пептидные связи. Действие пепсина на пептидные связи отличается абсолютной специфичностью в отношении оптической конфигурации аминокислотных остатков по обе стороны от гидролизуемой связи. Пептиды с ароматической аминокислотой на любой из сторон атакующей связи являются хорошими субстратами, особенно в тех случаях, когда другая аминокислота является также либо ароматической, либо дикарбоновой аминокислотой. Если короткие пептиды имеют свободную концевую аминогруппу, то эффективность гидролиза снижается, поэтому N-ацилированные пептиды являются лучшими субстратами по сравнению с их неацилированными аналогами. Наличие серусодержащей аминокислоты вблизи атакующей пептидной связи, в образовании которой участвует ароматическая аминокислота, повышает гидролизуемость пептида. Очень хорошими субстратами являются карбобензокси-L-тирозил-L-фенилаланин, карбобензокси-L-глутамил-L-тирозин или карбобензокси-L-метионил-L-тирозин. При амидировании C-концевой карбоксильной группы пептида эффективность гидролиза снижается.

Данные о действии пепсина на А- и В-цепи инсулина и ряд других белков в общем согласуются с результатами, полученными на синтетических пептидах; однако в белках наблюдали гидролиз некоторых дополнительных связей, например между лейцином и валином.

Общие выводы о специфичности действия пептидаз

Хотя имеющихся сведений пока еще недостаточно, чтобы составить полное представление о механизмах, лежащих в основе специфичности действия пептидаз, однако на основании известных фактов уже сейчас можно сделать некоторые обобщения. Очень часто решающим фактором служит присутствие или отсутствие определенных заряженных групп в определенном положении по отношению к гидролизуемой связи; именно

это обстоятельство лежит в основе различий между экзопептидазами и эндопептидазами и между аминопептидазами и карбоксипептидазами. Среди пептидаз мы встречаем такие ферменты, для действия которых необходимо, чтобы в молекуле субстрата вблизи гидролизуемой связи имелся положительный заряд; другим требуется отрицательный заряд, а третьи способны действовать только на субстраты, в молекуле которых на определенном расстоянии от гидролизуемой связи имеется как положительный, так и отрицательный заряд. Одним пептидазам необходим заряд у α -аминогруппы субстрата, другим — в боковой цепи. Однако известны также и случаи, когда наличия заряда в молекуле субстрата вообще не требуется; химотрипсин, например, может гидролизовать метиловый эфир бензоилглицина, метиловый эфир бензоилфенилаланина и ряд других нейтральных соединений.

Заряженные группы — не единственный фактор, определяющий специфичность; в некоторых случаях существенное значение имеют незаряженные и неполярные группы. Ряд пептидаз чрезвычайно чувствителен к присутствию в составе субстрата ароматических групп тирозина или фенилаланина, обычно равноценных в этом отношении (фенольные гидроксильные группы не оказывают влияния на родство). Для действия других пептидаз необходимо наличие в молекуле субстрата пирролидинового кольца иминокислоты. По крайней мере в одном случае для действия фермента требуется, чтобы в молекуле субстрата имелась углеводородная цепь, с помощью которой, по-видимому, осуществляется вандерваальсово взаимодействие между ферментом и субстратом.

Если указанные выше требования выполнены, то природа гидролизуемой связи не всегда имеет решающее значение. Иногда эта связь может и не быть пептидной; в таких случаях ее можно представить общей формулой $RCO=X$. Если остаток R имеет структуру, соответствующую специфичности фермента, то связь $CO-X$ активируется; при этом природа остатка X важна лишь в той мере, в какой она влияет на химическую стабильность связи. В тех случаях, когда фермент не обладает специфичностью по отношению к X , он может катализировать не только гидролиз, но также и реакцию обмена одного остатка X на другой. Например, пептидазы, гидролизующие эфиры и амиды, катализируют также реакции транспептидирования ацильного типа [547, 1455]. Вместе с тем пепсин катализирует транспептидацию типа аминопереноса на свободные карбоксильные группы акцепторов [3403].

Уреаза (КФ 3.5.1.5)

Уреазу можно рассматривать как фермент, гидролизующий связь $-CO-NH$ в простом, не являющемся пептидом соедине-

нии, а именно $\text{H}_2\text{N}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{H}$. Раньше считали, что фермент абсолютно специфичен к мочевины, однако имелись сообщения о том, что он гидролизует также небольшое число производных мочевины. Эти сведения были недавно проверены на высокоочищенных субстратах [1515]. Среди многих исследованных производных мочевины гидролизу подвергались только следующие: N-оксимочевина, семикарбазид (N-аминомочевина) и N,N'-диоксимочевина; не подвергались гидролизу, в частности, карбазид (N,N'-диаминомочевина), N-метилмочевина, N-бутилмочевина, N-метоксимочевина, N-(2-аминоэтил)мочевина, 2-имидазолидинон, биурет, 1-фенилсемикарбазид, этилкарбамат и карбамоилазид.

ЛИАЗЫ

Многие ферменты этого класса являются высокоспецифичными; приводимые данные по специфичности констатируют только, что ряд близких к субстрату соединений не вступает в реакцию. Пируватдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.1) способна декарбоксиллировать высшие гомологи пирувата (вплоть до 2-оксогексаноата), однако скорость реакции уменьшается с увеличением длины цепи; другие же декарбоксилазы действуют только на одно соединение. Многие альдолазы также являются высокоспецифичными. Фруктозобисфосфат-альдолаза (КФ 4.1.2.13) интересна в том отношении, что обладает различной специфичностью в зависимости от того, из какой ткани она выделена. Этот фермент помимо D-фруктозо-1,6-бисфосфата действует также на 3S, 4R-кетозо-1-фосфаты. Фермент из мышц атакует бисфосфат примерно в 50 раз эффективнее, чем D-фруктозо-1-фосфат; однако фермент из печени действует на оба субстрата почти одинаково.

Фумарат-гидратаза (КФ 4.2.1.2)

Этот фермент абсолютно специфичен и действует только на L-малат (прямая реакция) или на фумарат (обратная реакция). Фермент проявляет стереоспецифичность двух типов, так как в прямой реакции он действует только на одну из двух оптических форм, а в обратной — только на один из двух геометрических изомеров. В табл. 6.6 приведены данные по специфичности фумарат-гидратазы, которые показывают, что L-малат и фумарат не могут быть заменены ни одним из перечисленных в таблице соединений; в то же время многие из этих соединений действуют как конкурентные ингибиторы [3012].

Из этой таблицы видно, что для соединения с ферментом молекула вещества должна иметь две кислотные группировки;

Таблица 6.6

Специфичность фумарат-гидратазы

Субстраты	Конкурентные ингибиторы	Неактивные соединения
L-малат Фумарат	D-малат Цитрат D-тарtrat L-2-окси-3-сульфопропионат Маленнат Мезаконат <i>транс</i> -Аконитат Сукцинат Малонат Адипат Глутарат Глицин	L-аспарат D-аспарат Монометиловый эфир фумаровой кислоты Диметиловый эфир фумаровой кислоты Кротоат Ацетоацетат Ацетат Бутират Ацетилендикарбоксилат L-цистеат

родственные монокарбоновые кислоты, а также моно- или ди-эфиры субстратов не соединяются с ферментом. Однако при замещении одной карбоксильной группы сульфогруппой вещество сохраняет способность соединяться с ферментом, хотя оно и не является его субстратом. Замещение α -водородного атома метильной группой или CH_2COOH -группой (как в мезаконате, т. е. 2-метилфумарате, а также в цитрате и *транс*-аконитате) или же введение еще двух α -водородных атомов (как в сукцинате и т. д.) вызывает сходный эффект, тогда как удаление обоих α -водородных атомов (как в ацетилендикарбоксилате) лишает соединение способности соединяться с ферментом. Интересно отметить, что стереоизомеры обоих субстратов (D-малат и маленнат) хотя и не подвергаются превращениям, но довольно прочно соединяются с активным центром фермента и вследствие этого действуют как конкурентные ингибиторы.

Енолаза (КФ 4.2.1.11)

Этот фермент высокоспецифичен; он действует только на 2-фосфо-D-глицерат (прямая реакция) и на фосфоенолпируват (обратная). Однако ряд других соединений также может соединяться с активным центром фермента (табл. 6.7) [5133].

Таблица 6.7

Специфичность енолазы

Субстраты	Конкурентные ингибиторы	Неактивные соединения
2-фосфо-D-глицерат Фосфоенолпируват	3-фосфо-3-оксипропионат 2-фосфо-D-лактат 3-фосфо-D-глицерат 2-фосфо-D-эритро-2,3-диоксибутират 3-фосфо-D-эритро-2,3-диоксибутират	D-лактат D-глицеральдегид-3-фосфат Диоксиацетонфосфат Глицерол-2-фосфат

Еноил-СоА — гидратаза (КФ 4.2.1.17)

Этот фермент интересен во многих отношениях [4484]. Он действует только на тиоэфиры соответствующих кислот и СоА и не действует (в отличие от фермента КФ 1.1.1.35) на тиоэфиры

Таблица 6.8

Специфичность еноил-СоА-гидратазы¹⁾

Субстрат	Относительная скорость гидратации
(транс) Кротоноил-СоА	100
(цис) Изокротоноил-СоА	30
транс-2-пентеноил-СоА	77
цис-2-гексеноил-СоА	20
транс-2-гексеноил-СоА	15
транс-3-гексеноил-СоА	0,86
3-метилкротоноил-СоА	14
цис-2-метилкротоноил-СоА	+
Акрилоил-СоА	+
Винилацетил-СоА	1,5
Метакрилоил-СоА	+
Сорбоил-СоА	+
S-кротоноилпантетион	0,01

¹⁾ Знак+означает, что соединение служит субстратом, но скорость гидратации не была определена. Следующие соединения не являются субстратами: кротоноат, 4-пентеноил-СоА, 3-окси-4-гексеноил-СоА, маленил-СоА, итаконил-СоА, мезаконил-СоА, транс-циннамоил-СоА, фумарат, цис-аконитат.

более простых аналогов CoA или других тиолов. Он обратимо гидратирует ряд ненасыщенных эфиров CoA с углеводородной цепью различной длины, до C₉; при этом скорость реакции уменьшается по мере увеличения длины цепи (табл. 6.8).

Еноил-CoA — гидратаза представляет собой исключение среди гидро-лиаз в том отношении, что она катализирует гидратацию как *цис*-, так и *транс*-изомеров (относительная скорость реакции зависит при этом от длины цепи). Однако в реакцию дегидратации вступают только L-изомеры; фермент не действует на D-3-оксибутирил-CoA. При гидратации *транс*-ненасыщенных субстратов образуются L-оксизомеры; конфигурация продуктов гидратации *цис*-соединений точно не выяснена, но совокупность имеющихся данных свидетельствует в пользу того, что они также представляют собой L-изомеры.

Интересно отметить, что фермент может гидратировать как 2,3-, так и 3,4-ненасыщенные соединения, но при этом в обоих случаях образуются 3-оксисоединения.

Аммиак-лиазы

Это еще одна группа очень специфичных ферментов. Например, аспартат — аммиак-лиаза (КФ 4.3.1.1) действует только на фумарат и на L-аспартат, и к фумарату присоединяется аммиак, а не вода. Очищенная аспартат — аммиак-лиаза бактерий пропионовокислого брожения не действует на такие соединения, как D-аспартат, малеинат, моноэтиловый эфир фумаровой кислоты, диамид фумаровой кислоты или диэтиловый эфир фумаровой кислоты, пируват, кротонат, мезаконат, аконитат, глутаконат, 2,4-гексадиеноат, глицин, аланин, лейцин, фенилаланин, тирозин, гистидин и глутамат [1233]. Таким образом, при любом небольшом изменении в молекуле, а именно при замещении или переходе одного стереоизомера в другой, соединение утрачивает способность служить субстратом данного фермента.

Фенилаланин — аммиак-лиаза (КФ 4.3.1.5) из тканей растений действует на L-фенилаланин, но не на D-фенилаланин, DL-аспартат, L-гистидин, L-аланин, 3,4-диокси-DL-фенилаланин, DL-лейцин, β-фенил-DL-серин, глицин, L-цистеин, L-триптофан, L-тирозин и DL-*м*-тирозин [2579].

ИЗОМЕРАЗЫ

Среди ферментов этого класса сравнительно мало интересных примеров в отношении их специфичности. Во многих случаях детальные исследования специфичности вообще не проводились, а там, где они были проведены, было показано, что она очень высока. Ниже будут рассмотрены только два фермента.

Альдоза — 1-эпимераза (КФ 5.1.3.3)

Этот фермент катализирует реакцию взаимопревращения α - и β -сахаров. Данная реакция может происходить также и в отсутствие фермента, и это дает возможность сравнить скорости реакций, катализируемых ферментом, со скоростями неферментативных мутаротаций, обусловленных присущей субстратам реакционной способностью. Подобные сравнения были проведены для ферментов, выделенных из гриба *Penicillium* и из почки млекопитающих [2426, 2427, 2785]. Результаты этих работ приведены в табл. 6.9, в которой скорости мутаротаций, катализируемых ферментом (с поправками на спонтанную мутаротацию), а также скорости неферментативных мутаротаций выражены в процентах от скорости мутаротации α -D-глюкозы.

Таблица 6.9

Специфичность альдоза-1-эпимераз

Соединение	Относительная скорость мутаротаций, %		
	неферментативная реакция [2426, 2785]	фермент из <i>Penicillium</i> (рН 4,7) [2785]	фермент из почки (рН 7,1) [2426, 2427]
α -D-глюкоза	100	100	100
α -D-галактоза	110—70	131	165
L-арабиноза	436		119
α -D-ксилоза	320	30	60
β -Лактоза	72	23	
β -D-фруктоза	680	10	0
β -Мальтоза	84	6	
α -D-манноза	260—480	0	0
2-амино-2-дезоксид-глюкоза	112	0	
D-арабиноза	420		0
L-рамноза	420		0
3-метил-D-глюкоза	0		0
Сахароза	0		0
Рафиноза	0		0
Маннит	0		0
Сорбит	0		0

Из таблицы видно, что ферменты из обоих источников имеют сходную специфичность и действуют, хотя и с совершенно различными скоростями, только на сахара с такой же конфи-

гурацией у второго и третьего углеродных атомов, как и в молекуле D-глюкозы. Лучшим субстратом является D-галактоза. Интересно отметить отсутствие корреляции между специфичностью фермента и присущей субстрату реакционной способностью. Так, например, наилучшие субстраты фермента — глюкоза и галактоза — характеризуются сравнительно низкой реакционной способностью в неферментативной реакции, а очень реакционноспособные D-манноза, D-арабиноза и L-рамноза совершенно не атакуются альдоза — 1-эпимеразой.

Маннозоизомераза (КФ 5.3.1.7)

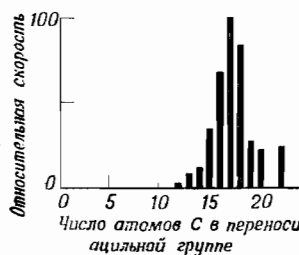
Фермент из *Pseudomonas* превращает D-маннозу в D-фруктозу, а со скоростью примерно в 10 раз меньшей превращает D-лихсозу в D-ксилозу и D-рамнозу в D-рамнулозу [3589]. Он не действует на D-ксилозу, D-арабинозу, D-рибозу, L-ксилозу, L-арабинозу, D-глюкозу, D-талозу, D-галактозу, L-идозу, L-гулозу, L-глюкозу, L-маннозу, L-рамнозу, D-маннуронат, D-маннозо-6-фосфат, D-глицеро-D-галагептозу, D-глицеро-D-талогептозу, L-глицеро-L-идогептозу и L-глицеро-L-гулогептозу.

ФЕРМЕНТЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ НА СУБСТРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ УГЛЕВОДОРОДНЫЕ ЦЕПИ

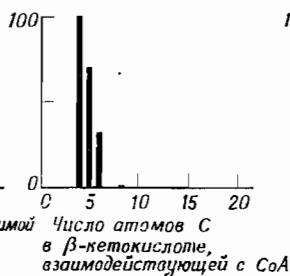
Если фермент действует на субстрат, содержащий алкильную цепь с более чем одним или двумя углеродными атомами, то длина цепи обычно не имеет решающего значения и фермент может действовать на ряд гомологичных субстратов. В этом случае интересно исследовать влияние длины цепи на скорость ферментативной реакции. Несмотря на то что обсуждаемые ферменты относятся к различным группам, мы суммировали некоторые данные об их специфичности и представили эти данные в виде диаграмм на рис. 6.8.

Этот рисунок иллюстрирует ряд общих черт, обнаруживающихся при изучении данной зависимости. Во всех случаях наблюдается более или менее определенная зависимость между скоростью катализируемой ферментом реакции и длиной цепи. В большинстве случаев имеется некоторая оптимальная для действия фермента длина цепи; вероятно, такой оптимум мог бы быть найден для всех ферментов, если бы наши данные в этой области были достаточно полными. Как видно из рис. 6.8, оптимальная длина цепи варьирует в широких пределах — от 2 до 17 атомов углерода. В некоторых случаях реакция одного и того же типа катализируется двумя или более ферментами; при этом обнаруживаются различные оптимумы в отношении длины цепи: один фермент действует на низшие, а другой — на

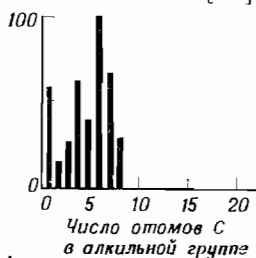
Глицерофосфат-ацилтрансфераза
(КФ 2.3.1.15)
из печени морской свинки [2551]



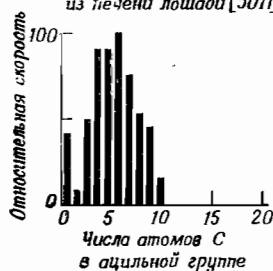
СоА-трансфераза 3-кето-
кислот (КФ 2.8.3.5)
из сердца свиньи [4486]



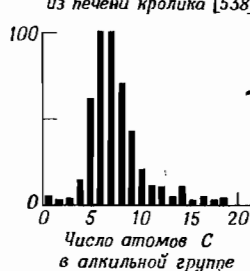
Карбоксилэстераза
(КФ 3.1.1.1)
из печени лошади [5011]



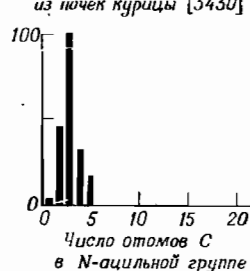
Карбоксилэстераза
(КФ 3.1.1.1)
из печени лошади [5011]



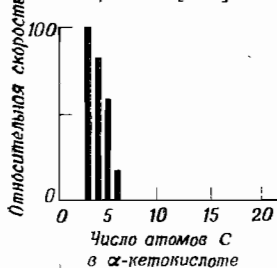
Амидаза
(КФ 3.5.1.4)
из печени кролика [538]



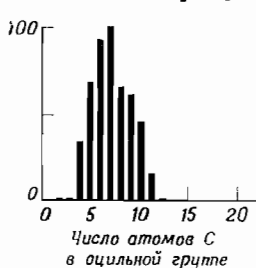
Арилациламидаза
(КФ 3.5.1.13)
из почек курицы [3430]



Пироватдекарбоксилаза
(КФ 4.1.1.1)
из дрожжей [2503]



Бутирил-СоА-синтетаза
(КФ 6.2.1.2)
из печени быка [2942]



Ацил-СоА-синтетаза
(КФ 6.2.1.3)
из печени морской свинки [2550]

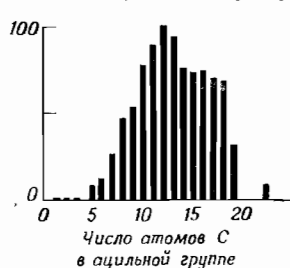
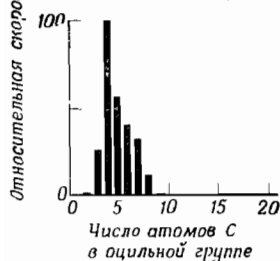
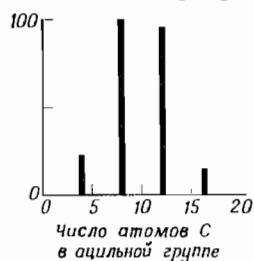


Рис. 6.8. Влияние длины алкильных и ацильных группировок в субстрате на скорость различных ферментативных реакций. Во всех случаях использованы субстраты типа $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{X}$. Активность выражена в процентах от скорости, полученной с наилучшим субстратом.

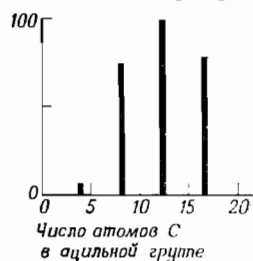
Бутирил-СоА-дегидрогеназа
(КФ 1.3.99.2)
из печени свиньи [1645]



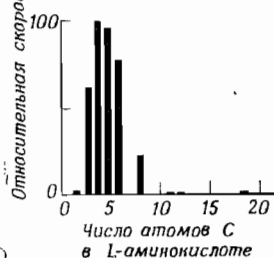
Ацил-СоА-дегидрогеназа 1
(КФ 1.3.99.3)
из печени свиньи [1643]



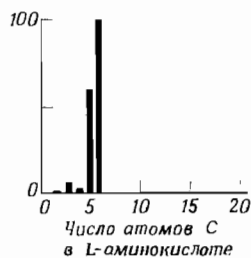
Ацил-СоА-дегидрогеназа 2
(КФ 1.3.99.3)
из печени свиньи [1643]



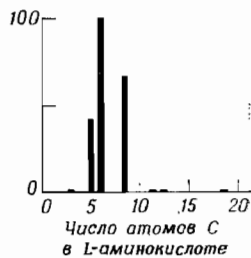
Оксидаза L-аминокислот
(КФ 1.4.3.2)
из нейроспоры [352]



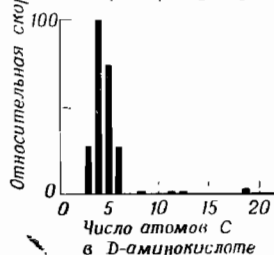
Оксидаза L-аминокислот
(КФ 1.4.3.2)
из почек крысы [450]



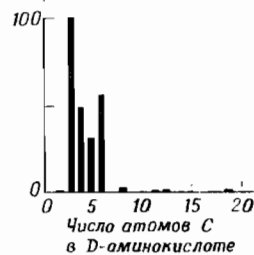
Оксидаза L-аминокислот
(КФ 1.4.3.2)
из яда кобры [352]



Оксидаза D-аминокислот
(КФ 1.4.3.3)
из нейроспоры [352]



Оксидаза D-аминокислот
(КФ 1.4.3.3)
из почек овцы [352]



Аминоксидаза,
содержащая флавин
(КФ 1.4.3.4),
из печени морской свинки [455, 456]

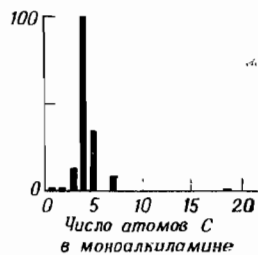


Рис. 6.8.

высшие члены одной и той же серии субстратов (ср., например, дегидрогеназы КФ 1.3.99.2—3, а также синтетазы КФ 6.2.1.2—3). Интересно отметить, что ширина пика кривой довольно сильно варьирует; в некоторых случаях при увеличении или уменьшении длины цепи на два углеродных атома (по сравнению с оптимальной длиной) скорость ферментативной реакции уменьшается вдвое, тогда как в других случаях для такого падения скорости необходимо изменение длины цепи не менее чем на шесть углеродных атомов. Несколько неожиданным представляется то обстоятельство, что отчетливо выраженный оптимум приходится иногда на цепи с большим числом углеродных атомов (примером такого фермента может служить ацилтрансфераза КФ 2.3.1.15).

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

Явление специфичности ферментов проливает свет на механизм взаимодействия фермента с субстратом, и всякая теория ферментативного действия должна учитывать экспериментальные данные по изучению специфичности. В большинстве случаев, для того чтобы вещество могло соединиться с активным центром данного фермента, необходимо строго определенное расположение химических групп в молекуле этого вещества. Однако не все вещества, имеющие необходимую для взаимодействия структуру, могут после соединения с активным центром фермента претерпевать превращения. К структуре конкурентных ингибиторов, также способных связываться с активным центром фермента, предъявляются менее строгие требования, нежели к структуре субстратов. Мерой специфичности ферментов служат размер и сложность тех структур в химическом соединении, которые обеспечивают этому соединению функцию субстрата. Ферменты, для действия которых необходимо присутствие в молекуле субстрата какой-нибудь небольшой группировки или сравнительно простой структуры (например, эфирной связи), считаются относительно малоспецифичными, а ферменты, требующие большой и сложной группировки, такой, как NAD, относятся к высокоспецифичным.

Связывание высокоспецифичных ферментов со своими субстратами, имеющими сложную структуру (т. е. большое число функциональных групп, расположенных на определенном расстоянии друг от друга), должно происходить одновременно во многих точках. Такой множественный контакт объясняет удивительную стереоспецифичность, наблюдаемую у ферментов, специфичность, которая выражается иногда в способности различать даже химически идентичные группы в симметричных молекулах. Как мы увидим в следующей главе, во многих теориях ферментативного действия постулируется деформация мо-

лекулы субстрата в результате присоединения ее к ферменту в двух или более точках.

Минимальная структура, обеспечивающая соединение субстрата с ферментом, равно как и химическая природа групп, осуществляющих это соединение, неодинаковы у разных ферментов. Из этого следует, что в образовании фермент-субстратного комплекса могут участвовать различные силы. В тех случаях, когда в молекуле субстрата должны присутствовать заряженные группы, связывание может происходить главным образом за счет электростатических сил; если взаимодействие обусловлено только электростатическими силами, то распределение зарядов на поверхности молекул фермента и субстрата должно, очевидно, быть комплементарным. Однако часто субстрат не содержит заряженных групп, и тогда взаимодействие фермента с субстратом должны обуславливать другие силы. У ферментов, действующих на различные сахара, возможность образования фермент-субстратного комплекса зависит от расположения гидроксильных групп в молекуле сахара; в этом случае соединение фермента с субстратом следует, по-видимому, объяснить образованием водородных связей. В других случаях даже водородные связи должны быть исключены (как, например, у ферментов, специфичных по отношению к углеводородным цепям определенной длины), и взаимодействие можно приписать только вандерваальсовым силам (гидрофобное взаимодействие). Наконец, в немногих случаях (см., например, пероксидазы) соединение обуславливается образованием координационной связи между субстратом и атомом металла в молекуле фермента.

Оглавление

Предисловие редакторов перевода	5
Предисловие	7
Из предисловия ко второму изданию	9
Из предисловия к первому изданию	10
Благодарности	12
Глава 1. ВВЕДЕНИЕ	13
Специальные термины	18
Глава 2. МЕТОДИКА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ	22
Измерение скорости ферментативных реакций	22
Типы методов, используемых при изучении ферментативных реакций	25
Некоторые практические соображения	26
Общие правила работы с ферментами	27
Исследование фермента	29
Удельная и молекулярная активности	31
Сродство фермента к реагирующим веществам	34
Методы количественного изучения ферментативных реакций	36
А. Спектрофотометрические методы	36
Б. Флуоресцентные методы	40
В. Манометрические методы	40
Г. Электродные методы	41
Д. Поляриметрические методы	42
Е. Методы с отбором проб	43
Глава 3. ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ	45
Значение очистки ферментов	45
Методы очистки	47
А. Методы определения ферментативной активности	47
Б. Общие приемы	48
В. Источник фермента	51
Г. Экстракция	52
Методы фракционирования	54
А. Фракционное осаждение при изменении pH	56
Б. Фракционная денатурация нагреванием	56
В. Фракционное осаждение органическими растворителями	57
Г. Фракционирование солями	58
Д. Фракционная адсорбция	61
Е. Колоночная хроматография	63

Ж. Электрофорез	67
З. Кристаллизация	71
И. Чередование методов фракционирования	72
К. Другие методы	74
Л. Концентрирование	75
Критерий чистоты ферментов	76
Затруднения, встречающиеся при работе с чистыми ферментами	80

Глава 4. КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ 82

Значение исследования кинетики действия ферментов	82
Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций	83
А. Влияние концентрации фермента	83
1. Вогнутые кривые $v - [E]$	84
2. Выпуклые кривые $v - [E]$	87
Б. Влияние концентрации субстрата	92
Ферментативная кинетика односубстратных реакций	92
Теория Михаэлиса	92
Теория стационарного состояния	95
Кинетические уравнения для ферментов, действующих на два и большее число субстратов	123
Реакции с участием двух субстратов	127
Установление кинетического механизма	142
Реакции с участием трех и большего числа субстратов	171
Исследование связывания субстрата	174
Ингибирование высокими концентрациями субстрата	184
Субстрат, действующий одновременно как активатор фермента	197
В. Влияние pH	199
pH-функции Михаэлиса	202
Влияние pH на V	213
Влияние pH на K_m	221
Г. Влияние температуры	235
Теплота инактивации ферментов	236
Влияние температуры на собственно ферментативную реакцию	241
Влияние температуры на состояние ионизации фермента	259
Д. Влияние давления	259
Е. Предстационарная фаза ферментативных реакций	260
Методы исследования быстрых реакций	260
Анализ результатов исследований быстрых реакций	265
Релаксационные методы	281

Глава 5. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ 291

Схема нумерации ферментов	293
Правила классификации и номенклатура	299
а) Общие указания и правила	299
б) Указания и правила, касающиеся отдельных классов ферментов	304
Ферментативные реакции	309
1. Оксидоредуктазы	310
2. Трансферазы	313
3. Гидролазы	321
4. Лиазы	325
5. Изомеразы	328
6. Лигазы	329

Глава 6. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ	330
Изучение специфичности действия ферментов	332
Общие замечания о специфичности	335
Стереоспецифичность фермента	336
Гипотеза индуцированного соответствия	344
Примеры, иллюстрирующие специфичность ферментов	347
Дегидрогеназы	347
Глюкозооксидаза	348
Флавопротеиды	349
Метилтрансферазы	350
Транскетолаза и трансальдолаза	351
Гликозилтрансферазы	352
Фосфотрансферазы	355
Эстеразы	359
Фосфатазы	364
Нуклеазы	365
Гликозидазы	367
Пептидазы	370
Лиазы	377
Изомеразы	380
Ферменты, действующие на субстраты, содержащие углеводородные цепи	382
Общие выводы	385

УВАЖАЕМЫИ ЧИТАТЕЛИ!

**Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении,
качестве перевода и другие просим присылать по адресу:
129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир».**

Малкольм Диксон, Эдвин Уэбб

ФЕРМЕНТЫ, т. 1

Научные редакторы Т. И. Жилева, Н. Н. Шафрановская

Мл. редактор З. Е. Кожанова

Художник Б. А. Шляпугин

Художественный редактор А. В. Проценко

Технический редактор Т. А. Максимова

Корректор Н. В. Андреева

ИБ № 2879

Сдано в набор 23.12.81. Подписано к печати 23.04.82.

Формат 60×90¹/₁₆. Бумага типографская № 2.

Гарнитура латинская. Печать высокая.

Объем 12,25 бум. л. Усл. печ. л. 24,50. Усл. кр.-отт. 24,50.

Уч.-изд. л. 23,82. Изд. № 4/1803. Тираж 6700 экз. Зак. 2277.

Цена 3 р. 40 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР».

Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли, Москва, 113105,
Нагатинская ул., д. 1.