

ИЗДАТЕЛЬСТВО

«МИР»

ENZYMES

by

MALCOLM DIXON

Sc. D.,F.R.S.

Reader in Enzyme Biochemistry in the University of Cambridge, Fellow of King's College, Cambridge

and

EDWIN C. WEBB

M. A., Ph. D.

Professor of Biochemistry in the University of Queensland

SECOND EDITION
LONGMANS 1964

М. Диксон и Э. Уэбб

ФЕРМЕНТЫ

Перевод со второго английского издания
Л. М. ГИНОДМАНА и М. И. ЛЕВЯНТ

Под редакцией
и с предисловием
акад. А. И. ОПАРИНА

ГБ УзССР
1967 24932

VII
14924 91

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» · МОСКВА 1966

577.15/.17

Книга Диксона и Уэбба хорошо известна читателям по первому изданию, выпущенному в русском переводе в 1961 г. Второе издание значительно дополнено авторами, а главное — приведено в соответствие с Международной классификацией и номенклатурой ферментов, обязательной в настоящее время для всех биохимиков. В качестве приложения книга содержит эту новую классификацию и номенклатуру в исправленном и дополненном виде.

Книга будет служить настольным справочником для биохимиков и многих химиков.

24932

2-10-2

Редакция биологической литературы

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Предлагаемая читателю книга представляет собой перевод второго издания сводки М. Диксона и Э. Уэбба «Ферменты». Первое издание этой капитальной работы вышло на английском языке в 1958 г. и было опубликовано в русском переводе в 1961 г.

В предисловии к первому изданию мы уже отмечали высокие достоинства и большую теоретическую и практическую значимость работы М. Диксона и Э. Уэбба. Чем же это новое издание книги столь существенно отличается от предыдущего, что возникла необходимость в его опубликовании на русском языке?

Конечно, энзимология — исключительно бурно развивающаяся область знания. За время, прошедшее с момента выхода в свет первого издания, были открыты, изолированы и описаны многие новые ферменты, выявлены некоторые новые аспекты кинетики ферментативных реакций, получены новые данные о сочетании и взаимодействии ферментных систем. Однако всего этого, возможно, было бы и недостаточно, чтобы оправдать необходимость в новом издании, если бы за указанный промежуток времени не произошли два принципиально важных события, без учета которых всякое изложение учения о ферментах оказывается сейчас уже устаревшим. Этими событиями явились, во-первых, установление новой Международной классификации и номенклатуры ферментов и, во-вторых, выяснение путей биологического синтеза белков (а следовательно, и ферментов).

Книга М. Диксона и Э. Уэбба — это, по существу, курс общей энзимологии, ибо в ней описываются общие для всех ферментов свойства, общие закономерности каталитического действия и т. д. Однако все это излагается на основе конкретных примеров с указанием особенностей каждого известного нам в настоящее время индивидуального фермента. Поэтому читатель может извлечь из книги обширные и даже иногда исчерпывающие сведения относительно любого частного случая, любого отдельного фермента. Но это может быть достигнуто только на основе тщательной работы над книгой, в процессе которой необходимо учитывать номенклатурное обозначение изучаемого фермента и его положение в системе классификации. Между тем ко времени выхода в свет первого издания книги еще не существовало общепринятой «хорошо отстоявшейся» номенклатуры и классификации ферментов. По сути дела, в этой области царил полный хаос. Авторы книги в первом издании пытались ввести свою условную классификацию и номенклатуру. С этой целью каждому ферменту был присвоен особый условный номер, под которым он числился в специальной таблице ферментов и на который давались ссылки в тексте.

В настоящее время, когда Международным биохимическим союзом принята новая классификация и номенклатура ферментов, читатель, пользуясь первым изданием, вынужден все время, так сказать, «переводить» приведенные в книге обозначения ферментов на язык, принятый в современной научной литературе, что требует, конечно, очень большой затраты труда.

Этот громадный труд взяли на себя авторы книги при подготовке к печати ее второго издания. В этом издании не только дан список ферментов, составленный согласно новым принципам обозначения, но и все ссылки в тексте приведены в соответствие с новой классификацией и номенклатурой. В таком виде книгой гораздо легче пользоваться всем тем, кто работает с современной литературой по данной дисциплине, и в частности студентам. Чтобы еще более облегчить работу с книгой, в русском издании в качестве приложения дан указатель к списку ферментов, отсутствующий в оригинале.

Коренного изменения и дополнения ряда глав книги потребовало и второе указанное нами выше событие — выяснение путей биологического синтеза белков. Особенно сильной переработке подверглась гл. X, посвященная именно этому вопросу. Вместо довольно туманных и противоречивых рассуждений, фигурировавших в первом издании, в ней дается четкое изложение современных представлений о роли нуклеиновых кислот в сохранении и передаче информации при синтезе специфических белков на рибосомах.

Значительно дополнены также разделы, в которых рассматривается роль вторичной и третичной структуры белков и их общей конформации в обеспечении каталитической активности ферментов.

Таким образом, по существу, мы имеем новую книгу, в которой крайне нуждается советский читатель, стремящийся все время быть на уровне современных знаний в области биохимии и биологии.

Акад. *А. И. ОПАРИН*

«Трудно, я думаю, преувеличить важность для биологии — и, я осмелюсь сказать, не в меньшей мере для химии — широкого изучения ферментов и их действия»

Ф. ГОПКИНС

(*Послание президента Королевскому обществу, 1932*)

ИЗ ПРЕДИСЛОВИЯ АВТОРОВ

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 были достигнуты значительные успехи. Главным событием за этот период явилось, очевидно, опубликование «Отчета Комиссии по ферментам Международного союза биохимиков», 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 него значительные изменения.

Добавив в новое 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 нам надеяться, что в общем нам удалось соблюсти необходимое равновесие между различными областями энзимологии. Для достаточно полного рассмотрения всех разделов потребовалось бы многотомное издание. Те, кто ищет такое подробное руководство, могут обратиться ко второму изданию «Ферментов», публикуемому в настоящее время под редакцией д-ров Бойера, Ларди и Мирбека.

Мы надеемся, что это новое издание окажется полезным для многих научных работников.

М. ДИКСОН
Э. УЭББ

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 составляет само по себе одну из самых увлекательных областей современного научного исследования.

В настоящее время наука о ферментах — «энзимология»[1] — превратилась в обширную бурно развивающуюся отрасль знания с многочисленными ответвлениями, тесно связанную со многими науками, особенно с биохимией, физической химией, бактериологией, микробиологией, генетикой, ботаникой, сельским хозяйством, фармакологией, токсикологией, физиологией, *медициной и химической технологией*. Кроме того, она имеет важное практическое применение в столь различных областях, как, например, пивоварение и другие бродильные производства, борьба с вредителями в сельском хозяйстве и *химическая война*.

Многие научные работники в различных частях света посвятили себя изучению различных энзимологических проблем; учреждены специальные институты по изучению ферментов, существует целый ряд энзимологических журналов, и по отдельным вопросам энзимологии имеется в настоящее время обширная литература.

Иногда трудно себе представить, что *энзимология возникла* сравнительно недавно; зарождение этой области науки можно 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 Пайон и Персо [2060] обнаружили в осадке, образующемся при добавлении спирта к солодовому экстракту, термолабильное вещество, обладающее способностью превращать крахмал в сахар[2]. Это вещество, которое мы теперь называем «амилазой», было названо ими «диастазой» (от греч. διάστασις — разделять) за его способность отделять растворимый декстрин от нерастворимой оболочки крахмальных

---

[1] Слова «фермент» и «энзим» являются в настоящее время синонимами. В разных странах предпочтительно употребляется либо тот, либо другой термин. В научной литературе на русском языке в равной мере использовались как слово «энзим», так и слово «фермент». Сейчас предпочтение отдается последнему термину. Тем не менее для обозначения науки о ферментах мы сохраняем наименование «энзимология», чтобы не смешивать в одном слове «ферментология» латинский и греческий языки.— *Прим. ред.*

[2] 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.*

зерен. Название «диастаза» впоследствии было распространено на все ферменты как видовое наименование[1].

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», удержалось 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. V.

Сразу же после открытия ферментов многие исследователи обратили внимание на сходство между их действием и действием дрожжей при брожении. Так появился термин «фермент»[2]. 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, В. Кюне [1485] в 1878 г. ввел в употребление термин «энзим». Поскольку среди ученых имели хождение неправильные представления о причинах, побудивших Кюне предложить этот термин, мы цитируем высказывание самого Кюне:

«Таким образом, мы не намереваемся выдвигать какую-либо особую гипотезу, а только констатируем, что в дрожжах (εν ζύμη) имеется что-то, что обладает той или иной ферментативной активностью. Это название, 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 Германии[3] до настоящего времени.

К концу XIX в. благодаря замечательным успехам в области стереохимии органических веществ, представляющих биологический интерес, сделалось возможным изучение *пределов* действия ферментов, или их так называемой «специфичности». Эмилю Фишеру [733] мы обязаны развитием представления о специфичности ферментов и о близком стерическом соответствии между ферментом и субстратом. На основании своих наблюдений над субстратами известной структуры Фишер выдвинул свое знаменитое положение о том, что фермент подходит к субстрату так, как ключ подходит к замку. Изучение специфичности составляет в настоящее время очень важный раздел учения о ферментах, и этому вопросу посвящена гл. VI. Вследствие наличия определенного соответствия между ферментом и субстратом фермент может действовать только на очень ограниченный ряд субстратов, и это является причиной существования большого числа различных фер-

[1] Во французской технической литературе оно сохранилось в указанном понимании и до настоящего времени.— *Прим. ред.*

[2] От лат. fermentatio — брожение.— *Прим. ред.*

[3] См. примечание к стр. 9.— *Прим. ред.*

ментов. 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 проведено Вильштеттером и его сотрудниками между 1922 и 1928 гг. (см. [979, табл. XX]). Несколько работ было выполнено в течение того же периода и другими исследователями (в качестве примера можно указать опыты Диксона и Кодама [627] 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. [2564]. Однако эти первые кристаллы были далеко не чистыми. За этой работой вскоре последовала серия классических работ Нортропа и его сотрудников [1996] по выделению в кристаллическом виде протеолитических ферментов. И хотя еще 20 лет назад число полученных в чистом виде ферментов было очень мало, в наше время число ферментов, полученных в чистом и кристаллическом виде, уже достигает 100, а число ферментов, очищенных до той или иной степени, превышает 600.

Первая работа по очистке ферментов была встречена резкой критикой. Указывалось, что «нефизиологично» выделять ферменты из клетки и что ценность представляют только те методы, которые позволяют изучать ферменты в 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 того, 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.

Главный интерес в ранний период развития энзимологии сосредоточился на изучении ферментов пищеварения и брожения; только значительно позднее была установлена важная роль внутриклеточных ферментов. Фактически серьезных работ по очистке внутриклеточных ферментов до 1937 г. не было, и это несмотря на то, что сравнительно мало ферментов встречается в естественном виде вне живых клеток. Однако с 1937 г. положение полностью изменилось, и то громадное увеличение числа известных ферментов, которое мы имеем теперь, обусловлено главным образом открытием новых *внутриклеточных* ферментов. Это привело в свою очередь к значительно более глубокому пониманию механизма многих фундаментальных жизненных процессов, в особенности лежащих в основе жизни обменных процессов, связанных с накоплением и использованием энергии. Наши знания о таких процессах, как фотосинтез, дыхание, биологическое окисление, брожение, синтез многих необходимых для роста органических веществ, выполнение механической или осмотической работы, значительно пополнились благодаря выделению и изучению соответствующих ферментов.

Возможность получать ферменты в чистом виде позволила в последние годы предпринять их количественное изучение с помощью физических методов, а также исследовать химическое строение белковой части фермента. Развитие методов определения последовательности аминокислот в пептидной цепи привело к важным результатам и в области изучения ферментов; были разработаны специальные методы для исследования химической структуры активных центров ферментов. Эти исследования обсуждаются в гл. X.

Новейшие работы пролили свет на механизм биосинтеза ферментов и на процесс, посредством которого генетический материал хромосом определяет химическую структуру, а также показали важность биологической регуляции этих механизмов. Этот вопрос рассматривается в гл. XI.

Изучение кинетики действия ферментов со времени классической работы Генри и Михаэлиса, опубликованной в начале столетия, достигло значительного развития (как это видно уже из размера гл. IV) и продолжает активно развиваться в направлении выяснения природы ферментативного катализа. Механизм ферментативного катализа исследуется также более прямыми методами, в первую очередь изотопными; этому вопросу посвящена гл. VII.

Очистка ферментов дала возможность получить еще более убедительные доказательства их высокой специфичности. Эта специфичность — одно из наиболее характерных и важных свойств ферментов, резко отличающее их от других катализаторов. Благодаря специфичности возможно существование полиферментных систем, осуществляющих цепи реакций, из которых состоят различные обменные процессы. Ряд таких систем приведен в таблицах гл. XII с описанием соответствующих ферментов.

Значительные успехи были достигнуты в изучении свойств и функций ферментов. Однако в этой области предстоит еще очень большая работа: многие важные ферменты еще вообще не открыты; другие, на существование которых мы уже имеем указания, в настоящее время ожидают изучения. Поэтому мы будем в соответствующих местах книги фиксировать внимание читателя на ряде перспективных областей, пока еще почти совсем не изученных.

Энзимология достигла, по-видимому, той стадии, когда в ближайшем будущем можно надеяться пожать обильные плоды всех тех бесчисленных исследований, которые были проведены в последние годы. Ряд различных направлений исследования сливается сейчас у нас на глазах, благодаря чему постепенно начинает вырисовываться картина, приближающая нас к решению одной из самых увлекательных проблем энзимологии, а именно проблемы механизма действия ферментов.

Среди энзимологов имеет широкое хождение ряд специальных терминов, и, поскольку они будут часто употребляться в этой книге, мы считаем полезным разъяснить здесь то значение, которое мы в них вкладываем. 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 не совсем легким делом. Были предложены самые различные формулировки. Наиболее удовлетворительной из них можно считать, вероятно, ту, которая определяет фермент как «белок с каталитическими свойствами, зависящими от его способности к специфическому активированию других веществ». В этом определении имеется ряд спорных моментов.

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 данного утверждения лежит 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, в прошлом время от времени появлялись сообщения о получении ферментов небелковой природы, но впоследствии всегда выяснялось, что авторы этих сообщений использовали слишком разбавленные растворы высокоактивных ферментов. Из этих растворов при их концентрировании были выделены ферменты,

и они оказались 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, многое можно будет возразить против безоговорочного 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 *с*, 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 будут активированы 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 50 лет, следует предпочесть более общему термину «реагент».

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. Физикохимики употребляют этот термин в двух различных значениях. С точки зрения теории Аррениуса активированными являются те молекулы, у которых запас кинетической энергии превышает некую определенную величину; согласно же более современной теории, рассматривающей абсолютные скорости реакций (которую мы обсудим ниже, в гл. IV), активация происходит путем образования специфического активированного комплекса, которое сопровождается изменением как кинетической, так и потенциальной энергии. В ферментативных реакциях активация субстрата происходит путем образования фермент-субстратного комплекса. Этот процесс имеет много общего с процессом образования активированного комплекса, постулируемого упомянутой выше теорией. Однако эту аналогию не следует переоценивать: фермент-субстратный комплекс представляет собой более стабильное соединение, нежели активированный комплекс; в процессе своего образования и распада он проходит через стадию активированных комплексов. Этот вопрос более детально обсуждается ниже.

Изучение специфичности (см. гл. VI) позволило установить, что субстрат соединяется не со всей молекулой фермента, а с отдельным ее участком, получившим название «активного центра». Этот активный центр, участвующий в процессе активации и в самой реакции, обладает выраженным сродством к соответствующему субстрату. Первоначально предполагалось, что в каждой молекуле фермента имеется много активных центров; однако сейчас стало ясно, что в большинстве случаев на каждую молекулу фермента приходится только один или два активных центра. Структура ферментов обсуждается в гл. X.

По большей части (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. Таким образом, 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 отдель-

ности. Так, НАД и НАДФ 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 приведено в гл. IX.

Часто находят, что при добавлении некоторых веществ, не принимающих участия в реакции, скорость реакции уменьшается. Такие вещества обычно называют «ингибиторами». Этот термин, однако, не принято прилагать к таким, например, веществам, как сильные кислоты, которые просто разрушают ферментный белок. Многие из ингибиторов действуют специфически, 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. VIII.

Наконец, никогда не следует забывать, что ферменты имеют столь большое значение вследствие того, что сама жизнь тесно связана с ферментным 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.

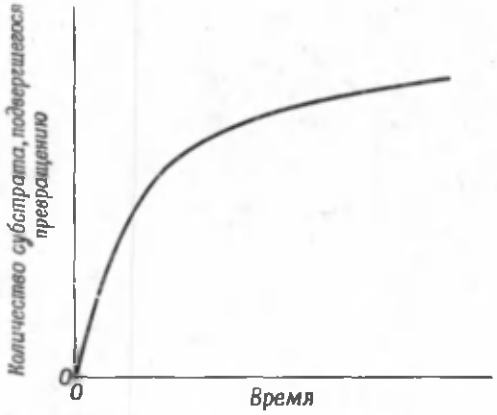
ГЛАВА II

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

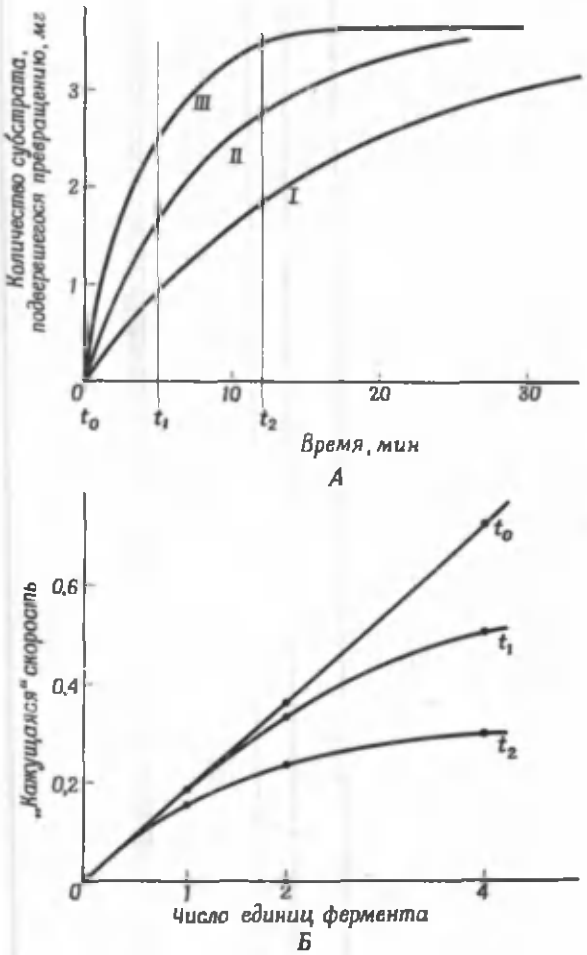
Кривые хода большинства ферментативных реакций имеют общую форму, показанную на фиг. 1. На этом графике видно, что скорость реакции уменьшается со временем. Это уменьшение скорости может объясняться



Фиг. 1. Типичная кривая хода реакции.

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 важной может становиться роль обратной реакции; фермент (или кофермент) может подвергаться инактивации из-за нестабильности в данных условиях темпера-

туры 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 (см. гл. IV). Чтобы обойти это затруднение, при изучении ферментативных реакций используют иной подход, а именно измерение *начальной* скорости



Фиг. 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 единица фермента; *II* — 2 единицы фермента; *III* — 4 единицы фермента.

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 прослеживать 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 первый 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, только до тех пор может рассматриваться как показатель скорости реакции, пока не перейден этот предел. В прошлом очень часто пренебрегали этим ограничением и опубликовывали данные, указывающие только на объем изменений, происшедших в данной системе за определенное время. Следующий простой пример показывает, что подобные результаты не дают правильной характеристики процесса. Кривые хода реакции на фиг. 2, *А* могут характеризовать опыты при трех различных pH 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 построить график зависимости между начальной скоростью в момент времени t_0 и количеством фермента, как это сделано на фиг. 2, *Б*, то получим прямую, показывающую, что скорость реакции пропорциональна количеству фермента. Однако количество субстрата, подвергшегося превращению к моменту времени t_2, не пропорционально количеству фермента, и сравнение кажущихся скоростей реакции, полученных путем деления соответствующих величин на промежуток времени между t_0 и t_2, дает совершенно ошибочный результат, как это видно из фиг. 2, *Б*.

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

Типы методов, используемых при изучении ферментативных реакций

Различают два типа методов изучения ферментативных реакций: методы, связанные с отбором проб, и непрерывные методы. В первом случае не производят наблюдений над самой реакционной смесью, 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; это дает возможность путем проведения большого числа измерений или путем автоматической регистрации получать непрерывные кривые хода реакции.

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

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

В опытах с отбором проб обычно необходимо бывает получить по крайней мере три точки в каждом случае определения скорости: одну при нулевом отсчете времени, вторую по прошествии определенного выбранного промежутка времени и третью по истечении примерно вдвое большего времени. Это дает возможность проверить линейность графика на протяжении

ГБ УзССР 1967 24852

рассматриваемого промежутка времени. Каждую пробу необходимо немедленно после взятия смешивать с реагентом, мгновенно останавливающим ферментативную реакцию, с тем чтобы проба точно отражала состав реакционной смеси в определенный момент. Так как используемые реагенты всегда высокотоксичны для ферментов, необходимо соблюдать большую осторожность, чтобы не перенести обратно в реакционную смесь следы реагента (например, на кончике пипетки).

Большинство методов, используемых для изучения ферментативных реакций, относится к непрерывному типу, и именно этим методам обычно отдают предпочтение. При работе с помощью этих методов необходимо, в сущности, одно — получить достаточное число отсчетов для того, чтобы можно было быть уверенным в том, что соответствующие точки укладываются на прямую. Если же используется непрерывно регистрирующий прибор, то скорость определяют по наклону кривой. В некоторых случаях прибор может непосредственно регистрировать скорость процесса; так, например, в системе люциферазы интенсивность люминесценции прямо пропорциональна скорости ферментативной реакции [438].

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 проведения наблюдений. Реакцию следует проводить в термостате, и все реагенты должны быть доведены до необходимой температуры, прежде чем в результате их смешения начнется реакция. Необходимо предусмотреть достаточное забуферивание растворов для предотвращения заметного изменения pH в тех случаях, когда в результате реакции образуется кислота. Если только это возможно, то 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 соблюсти при изучении фермента в широком диапазоне условий.

Так как ферменты обладают высокой каталитической активностью, особое внимание следует обращать на то, чтобы из-за простой небрежности не внести их следы в реакционный сосуд. Такие загрязнения могут попасть в 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 следует затыкать ватой.

Скорость реакции следует всегда предварительно отрегулировать (путем изменения количества взятого в опыт фермента) с таким расчетом, чтобы измерения могли быть проведены надлежащим образом.

Общие принципы 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 резкие 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.

2 8975

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°, 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 еще 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° сосуды из нержавеющей стали (вследствие их высокой теплопроводности) предпочитают стеклянным.

Большинство ферментов инактивируется в растворах с 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°.

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. Лопасти 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 относительно 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.

Отделение осадков путем центрифугирования обычно предпочитают фильтрованию, и центрифуга с охлаждением представляет собой очень полезный предмет оборудования лаборатории. 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, селит, суперсел и т. д.

Во многих случаях даже при наиболее благоприятных условиях наблюдается медленное инактивирование фермента при стоянии. Поэтому целесообразно 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 подвергнуть замораживанию и оттаиванию без потери активности, то наиболее удобно сохранять 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 сульфате 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 может сохраняться 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, характеристика которых выходит за рамки небольшой части этой программы.

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

Структура: аминокислотный состав; число пептидных цепей; последовательность чередования аминокислот; 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.

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 по отношению к 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 таковая имеется.

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 сродство 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.

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.

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; биологический эффект от специфического отравления фермента; иммунологическое поведение; антиферменты.

Большинство из перечисленных свойств ферментов рассматривается 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 активности на 1 *мг* фермента (единица активности характеризует при этом превращение определенного количества субстрата или образование определенного количества продукта за определенное время); 2) в величинах Q (см. ниже); 3) в единицах константы скорости реакции на 1 *мг* фермента; 4) числом микромолей субстрата, превращаемых за 1 *мин* на 1 *мг* фермента; 5) 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. Иногда для обозначения удельной активности ферментов используют специальные показатели. Таков, например, показатель PZ (пурпурогаллиновое число) для пероксидаз. Эта величина представляет собой число единиц на 1 *мг* препарата, причем под единицей понимают количество фермента, которое образует 1 *мг* пурпурогаллина за 5 *мин* при 20° в определенных условиях.

2. Величина Q заимствована из области манометрической техники. Под $-Q_s$ понимают число микролитров субстрата S, потребленного (в стандартных условиях) в течение 1 *час* на 1 *мг* фермента. Строго говоря, величины Q_s для ферментативных реакций являются отрицательными, так как субстрат всегда *потребляется* в ходе реакции, однако часто знак минус опускают. Первоначально величину Q использовали для характеристики газообразных веществ (например, O_2 или CO_2), и поэтому ее широко применяли в работе с дыхательными ферментами. Позднее, однако, этот показатель распространили и на другие вещества, исходя из того, что 1 *мкмоль* вещества в газообразном состоянии занимает объем 22,4 *мкл*. Для ферментативных реакций, в которых участвует фосфат, широко используется показатель Q_P, который обозначает число микролитров фосфата, прореагировавшего в течение 1 *час* на 1 *мг* фермента (см., например, [135]).

3. Иногда для измерения удельной активности используют константу скорости ферментативной реакции. Так, например, активность каталазы (1.11.1.6) «Kat. f.» (Katalasefähigkeit) выражают константой скорости реакции (в *мин*), 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, то этот метод нельзя считать достаточно удовлетворительным. Возникают также недоразумения и вследствие того, что одни авторы при расчете константы скорости используют десятичные, а другие — натуральные логарифмы. Для пептидаз широко используется «протеолитический коэффициент» [1215]. 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 стандартных условиях), деленную на концентрацию фермента. Показатель «протеолитическое частное» представляет собой отношение протеолитических коэффициентов, полученных в опытах с двумя разными субстратами. Этот показатель используется для суждения о гомогенности фермента.

4. 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 [2212].

5. Следует считать мало удачной попытку охарактеризовать молекулярную активность фермента (при неизвестном молекулярном весе), принимая его молекулярный вес в среднем равным 100 000. Если молекулярный вес фермента неизвестен, то лучше пользоваться удельной активностью, а если он известен, то следует вычислить точное значение молекулярной активности.

Молекулярную активность выражают: 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 применять термин «молекулярная активность» в случае (а), в случае же (б) пользоваться термином «активность каталитического центра» [2212].

Все три величины, установленные Комиссией по ферментам Международного биохимического союза, основываются на идее стандартной единицы фермента. В отчете комиссии [2212] 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 затро-

нутой 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°. Прочие условия, в частности pH и концентрации субстратов, должны быть по возможности оптимальными. Во избежание несоразмерно *малых или больших величин допускается применение таких терминов*, как миллиединицы (*м*Е), килоединицы (*к*Е) 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 одну 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, чтобы определение активности ферментов основывалось по возможности на измерении 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 определить 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 спектрофотометрическим или же химическим путем. В том случае, когда это невозможно, удельную активность фермента, очевидно, нельзя определить, хотя можно определить удельную активность *препарата фермента* (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 определяются концентрациями фермента и реагирующих веществ, а также величинами, 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 в опытах по изучению кинетики действия ферментов пользуются, как правило, только константой диссоциации. Мы будем следовать этой практике, которая одобрена Комиссией по ферментам.

Фермент может соединяться с веществами двух классов, а именно с теми, которые принимают участие в реакции (т. е. с «субстратами»), и с теми, которые в реакции не участвуют. Среди последних некоторые могут быть ингибиторами, а некоторые — активаторами. Константа сродства фермент — субстрат имеет особо важное значение.

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

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{s}}, \qquad \text{(II.1)}$$

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. IV. 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 комиссии наименование «константа Михаэлиса» и символ K_m следует сохранить 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. IV.

«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. VIII и IX.

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, то часто оказывается возможным найти такую длину волны, при которой в результате рассматриваемого превращения значительно изменяется поглощение. Измеряя величину этого изменения, можно количественно изучать течение данной ферментативной реакции. Появление спектрофотометра Бекмана и других подобных приборов обес-

печило лаборатории, вероятно, наиболее удобным методом для изучения ферментативных реакций. 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 сами величины изменений оптической плотности и единицы фермента выражают в величинах изменения оптической плотности за определенное время. Когда 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 во время измерений необходимо, чтобы кювета, содержащая реакционную смесь, находилась в условиях постоянной температуры. Обычные приборы не снабжены соответствующим приспособлением, и требуется специальный держатель кюветы с кожухом, по которому можно пропускать воду 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 ряда точек; это позволяет быстро и точно определять начальную скорость реакции. Непрерывная регистрация становится в настоящее время одним из наиболее широко распространенных методов определения скорости 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, фосфопируват-гидратазой (4.2.1.11) [2788] и фумаратгидратазой (4.2.1.2) [1743, 2148]. В случае фумаратгидратазы фумарат благодаря наличию двойной связи довольно сильно поглощает при 300 *ммк*, тогда как малат не поглощает при этой длине волны. При действии ксантиноксидазы (1.2.3.2) происходит изменение в кольцевой структуре субстрата; окисление гипоксантина до мочевой кислоты сопровождается значительным увеличением поглощения при 290 *ммк* [1284].

Имеется также большая группа окислительных ферментов; в катализируемых ими реакциях у второго реагента (акцептора водорода) при восстановлении субстратом изменяется спектр поглощения. Коферменты НАД и НАДФ имеют, например, полосы поглощения при 340 *ммк* 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. В окисленной форме флавопротеидные ферменты поглощают при 450 *ммк* весьма интенсивно, а в восстановленной форме гораздо слабее. Цитохромы в восстановленной форме обнаруживают очень четкие полосы поглощения в видимой области спектра, и потому спектрофотометрический метод является идеальным для изучения процессов их окисления и восстановления. Наконец, осуществляемое с участием ферментов восстановление феррицианида или красителей типа метиленового синего и индофенолового синего может быть точно прослежено спектрофотометрическим методом.

Таким образом, действие всех окислительных ферментов практически может быть легко изучено с помощью спектрофотометра. 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.

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 *n*-нитрофенилсульфата максимум поглощения смещается от 278 к 318 *ммк*, и ход реакции, катализируемой арилсульфатазой (3.1.6.1), может быть прослежен по значительному увеличению поглощения при 330 *ммк* [2809]. Сходным образом реакция образования тиоэфирной связи ацил-КоА — синтетазой (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 *ммк* [2756]).

Даже если течение изучаемой ферментативной реакции не сопровождается заметным изменением поглощения, то все же спектрофотометрический метод можно нередко использовать после добавления к изучаемой системе другого фермента, действие которого на продукты реакции приводит к изменению поглощения. Во многих случаях, например, продукт ферментативной реакции сам служит субстратом для одной из дегидрогеназ. В таких случаях добавление избытка (очищенной) дегидрогеназы вместе с соответствующим коферментом позволяет проследить за ходом первой реакции по восстановлению кофермента, которое определяется по увеличению поглощения при 340 *ммк*. Образование цитрата из аконитата под действием аконитатгидратазы (4.2.1.3) может быть прослежено после добавления изоцитратдегидрогеназы (1.1.1.42) и НАДФ [2006]. 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 НАДФ в НАД под действием очищенной фосфатазы (3.1.3.1) [1876], которое можно проследить в присутствии алкогольдегидрогеназы (1.1.1.b) и спирта. Эта дегидрогеназа не реагирует с НАДФ, но, как только образуется НАД, он сразу же ею восстанавливается.

Можно назвать и еще один вариант, а именно тот, при котором продукт первичной реакции является одновременно продуктом окисления дегидрогеназной системы. В этом случае реакция часто может быть прослежена путем добавления дегидрогеназы и восстановленной формы кофермента; уменьшение поглощения характеризует при этом окисление кофермента в обратной дегидрогеназной реакции. Метод Ракера [2146] для измерения активности 6-фосфофруктокиназы (2.7.1.11) может служить примером такого рода. Этот фермент фосфорилирует фруктозо-6-фосфат с образованием фруктозо-1,6-дифосфата. При добавлении вместе с восстановленным коферментом избытка альдолазы (4.1.2.b) (которая превращает фруктозо-1,6-дифосфат в смесь глицеральдегид-3-фосфата и диоксиацетонфосфата) и глицерофосфат-дегидрогеназы (1.1.1.8) (которая катализирует восстановление диоксиацетонфосфата за счет НАД·H_2) фосфокиназная реакция может быть прослежена по окислению кофермента. Таких систем можно подобрать достаточно много, и метод не ограничивается использованием только дегидрогеназ.

Большую часть спектрофотометров можно использовать также и для измерения флуоресценции, и в некоторых случаях методики, основанные на измерении флуоресценции, оказываются более чувствительными, чем методики с измерением поглощения света. Флавиновые соединения, сильно флуоресцирующие в окисленной форме, теряют способность к флуоресценции при восстановлении. НАД и НАДФ не флуоресцируют в окисленном состоянии; восстановленные же их формы дают голубую флуоресценцию, и измерение этой флуоресценции может послужить чувствительным методом для изучения дегидрогеназных реакций [2638]. Флуоресценция, однако, в большей степени, чем поглощение света, изменяется в присутствии посторонних веществ (эти вещества могут действовать как тушители флуоресценции).

Б. МАНОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Манометрические методы представляют собой удобные и точные методы для изучения тех 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, уреаза 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 условиях бикарбонатного буфера, находящегося в равновесии с газовой смесью, содержащей определенный процент CO_2. Любое количество образовавшейся кислоты 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 глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы (1.2.1.12) в системе гликолиза. Границы применения манометрического метода можно расширить, дополняя, например, действие изучаемых дегидрогеназ действием глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы, и многие дегидрогеназные реакции, осуществление которых связано с участием кофермента, изучались именно манометрически [904]. Карбоксильные группы могут образовываться и в результате гидролиза пептидной или эфирной связи, что было использовано при манометрическом изучении гидролиза белков [1462], а также при изучении действия эстераз, особенно действия холинэстеразы (3.1.1.8) [64]. Были изучены также некоторые реакции переноса фосфата, связанные с изменением ионизации фосфатного остатка [480]. Феррицианид способен восстанавливаться многими окислительными ферментами, и его восстановление, сопровождаемое образованием водородного иона, может быть изучено манометрически в бикарбонатном буфере [2132].

Манометрические методы подробно рассматриваются в ряде работ [619, 2696].

В. МЕТОД ТУНБЕРГА

В прошлом значительное число работ с дегидрогеназами было проведено с помощью метода Тунберга, который основан на измерении времени, необходимого для восстановления (обесцвечивания) определенного количества метиленового синего или другого аналогичного красителя. Для предотвращения последующего окисления красителя атмосферным кислородом опыт необходимо проводить в специальных пробирках, в которых можно создавать вакуум (трубки Тунберга); так как количество добавляемого красителя чрезвычайно мало, то концентрация субстрата в ходе реакции остается практически постоянной. Обычно определяют только время восстановления

красителя, не прослеживая хода реакции. В небольшом числе случаев, в которых определяли кривую хода реакции во времени, было найдено, что реакция протекала достаточно линейно, замедляясь только к концу; таким образом, величина, обратная времени восстановления красителя, характеризует скорость реакции. Однако то обстоятельство, что ход реакции замедляется, не ограничивает применимость метода, так как этот метод по большей части используется для определения относительных, а не абсолютных скоростей; величины же, обратные времени, необходимому для восстановления красителя, пропорциональны скорости реакции даже тогда, когда ход реакции не является линейным.

Метод прост и не требует дорогостоящей аппаратуры; при соблюдении необходимых предосторожностей его можно считать довольно точным. В случае дегидрогеназ, зависящих от НАД, необходимо, однако, добавлять избыток флавопротеида, например 1.6.4.3, для катализирования реакции между коферментом и красителем, и это в некоторой мере ограничивает возможности метода при работе с такими ферментами.

Одна из модификаций этого метода основывается на наблюдении за обесцвечиванием 2,6-дихлорфенолиндофенола с помощью спектрофотометра. Восстановленная форма этого красителя реагирует с O_2 значительно медленнее, чем восстановленная форма метиленового синего, и поэтому опыты можно проводить в обычной открытой кювете спектрофотометра; следует, впрочем, отметить, что для той же цели изготовляются и специальные трубки Тунберга.

Г. ЭЛЕКТРОДНЫЕ МЕТОДЫ

Использование стеклянного электрода дает в руки исследователя другой метод изучения тех реакций, в результате которых образуется кислота. Наиболее простым приемом может служить регистрация изменений pH в ходе реакции, однако против этого способа имеются два возражения. Во-первых, изменение pH в ходе реакции может, вероятно, вызывать осложнения, связанные с изменением активности фермента. Во-вторых, скорость изменения pH 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 лучшим следует считать метод непрерывного титрования. В этом случае с помощью частых добавлений небольших количеств щелочи поддерживают приблизительно постоянный уровень pH; скорость добавления щелочи характеризует скорость реакции и не зависит от количества буфера. Количество буфера влияет, однако, на точность метода: если взято слишком мало буфера, то трудно поддерживать pH достаточно постоянным, если же его взято слишком много, то метод становится нечувствительным.

В продаже имеются очень удобные автоматические приборы (pH-статы), которые поддерживают постоянное значение pH за счет непрерывного добавления кислоты или щелочи и в то же время вычерчивают кривую, показывающую количество добавленного реактива во времени. С помощью такого прибора можно получать без участия экспериментатора кривые хода реакций для многих ферментов. Имеется прекрасный обзор по использованию pH-стата [1228].

Электродные методы можно также использовать для изучения окислительных ферментов путем измерения окислительно-восстановительного потенциала. Гладкий платиновый электрод в растворе, содержащем смесь вос-

становленной и окисленной форм красителя или другого акцептора водорода, приобретает потенциал, который зависит от отношения концентраций этих форм. Поэтому восстановление красителя может быть прослежено по изменению потенциала электрода. По большей части удобнее работать не с красителем, а с феррицианидом, во-первых, потому что он непосредственно реагирует с коферментами, так что не требуется добавления диафоразы, и, во-вторых, потому что O_2 не мешает реакции и ее можно проводить в открытых пробирках. Для обеспечения линейности хода изучаемой реакции целесообразно начинать опыт со смесью равных количеств ферри- и ферроцианида, так как при этом изменения потенциала будут в известных пределах приблизительно пропорциональны количеству восстановленного феррицианида [625]. Этот метод считается очень удобным.

Реакции, в которых участвует O_2, можно 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 может быть получена кривая, показывающая изменения концентрации O_2. Для этой цели используют два типа кислородных электродов. Чанс [428] в большинстве своих работ по окислительному фосфорилированию пользовался вибрирующим платиновым электродом, погруженным непосредственно в реакционную смесь. Электрод Кларка[1] отделен от реакционной смеси полиэтиленовой мембраной, через которую может диффундировать молекулярный кислород. Этот электрод в последнее время все более широко применяется при изучении окисления субстратов суспензией митохондрий и сходными системами; описание техники работы с этим электродом приведено в работе Чеппела [430] (см. также [2200]). Полярографический метод отличается от манометрического тем, что жидкость находится в закрытой системе без газовой фазы.

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 ход реакции можно проследить 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 отличаются по величине удельного вращения. Этот метод, хотя он и не является столь удобным, как некоторые из предыдущих, 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 сахараза (3.2.1.26). Важно проводить опыты в термостатированной поляриметрической трубке.

В некоторых случаях оптическая активность субстрата слишком мала для того, чтобы ее можно было непосредственно измерить, но в то же время она может значительно возрасти 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, то необходимо было проводить отбор проб по ходу реакции, а потому в настоящее время этот метод уступил место более быстрым спектрофотометрическим методам.

---

[1] Изготовляется фирмой The Yellow Springs Instrument Co., Inc., Ohio; другая форма электродов описана в работе Ривса и др. [2200].

Е. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В ряде случаев, когда применение других методов не дает результата, можно обнаружить образование продукта реакции хроматографическим методом. Этот метод связан с отбором проб; пробы отбирают из реакционной смеси через определенные промежутки времени, помещают на хроматографическую бумагу, высушивают и хроматографируют обычным путем. Постепенное появление на хроматограмме нового пятна дает качественное представление о ходе ферментативной реакции. Если желательно получить количественные данные, то необходимо вырезать соответствующие участки хроматограммы, экстрагировать из них вещество и определить его с помощью химического или спектрофотометрического метода. Такой способ применялся, например, при изучении реакции трансглюкозилирования с участием флавинов [2853].

Главный недостаток метода в том, что вся процедура в целом отнимает 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 широкого применения при работе с ферментами, за исключением тех случаев, где другие методы непригодны.

Ж. ХИМИЧЕСКИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

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 изучение действия различных ферментов требует разных методов определения. Существует, однако, несколько методов более общего характера, применимых к целым классам ферментов. Удобный колориметрический метод Фиске и Суббароу [745] 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°, 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 АДФ, в том числе и реакции, катализируемые некоторыми фосфокиназами и синтетазами, так как АТФ имеет две пирофосфатные связи, а АДФ—только одну.

Поскольку расщепление гликозидной связи приводит к образованию редуцирующей группы, при изучении ферментов, действующих на углеводы, широко используются методы, связанные с восстановлением меди. При изучении пептидаз очень широко применяются методы формольного титрования.

Как показал Липман, добавление гидроксиламина к ацилфосфатам 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 ацетилкофермента А к реакционной смеси добавляют кофермент А и избыток фосфат-ацетилтрансферазы (2.3.1.8). Например, цитрат-синтаза (4.1.3.7) образует цитрат из оксалоацетата и ацетилкофермента А, и если ацетилфосфат, КоА и фосфат-ацетилтрансфераза добавлены вместо ацетил-КоА, то реакцию можно проследить по исчезновению ацетилфосфата [2012].

Для подробного ознакомления с методами изучения отдельных ферментов см. «Методы энзимологии» [481].

ГЛАВА III

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 первые ферменты были получены в чистом виде. 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, изменяясь, 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 (4.1.3.7). Трудности в толковании механизма аэробного фосфорилирования, с которыми мы сталкиваемся и сейчас, также в значительной степени обусловлены сложностью разделения различных компонентов ферментной системы митохондрий.

Для изучения специфичности особенно необходимо иметь ферментные препараты очень высокой степени чистоты, ибо если будет обнаружено, что неочищенный препарат катализирует какую-либо дополнительную реакцию, то всегда будет оставаться сомнение, не протекает ли данная реакция за счет другого фермента, присутствующего в препарате.

Серьезная очистка ферментов началась с 1922 г.; первый кристаллический фермент (уреаза, 3.5.1.5) был получен Самнером [2564] в 1926 г.; к 1940 г. число ферментов, полученных в высокоочищенном виде, приблизилось к 20, и с тех пор оно продолжает увеличиваться с каждым годом. Ежегодно поступают сведения об очистке примерно десятка новых ферментов. В настоящее время общее число очищенных ферментов приближается к 200. Далеко не все они получены в кристаллическом виде, хотя возможно, что некоторые из некристаллических препаратов чище кристаллических; известно, что кристаллизация белка не гарантирует его чистоты, и часто в первых полученных кристаллах белков чистота не превышает 50%. В Списке ферментов, помещенном в конце книги, приведено около 75 различных

ферментов, полученных в кристаллическом виде; однако мы допускаем, что нам известны не все такие ферменты.

В настоящее время, когда уже точно установлено, насколько важно работать с очищенными ферментами, кажется странной та резкая критика, которой были встречены первые попытки выделить ферменты в чистом виде. Противники выделения заявляли, что «нефизиологично» отделять ферменты от живых клеток и что необходимо, насколько это возможно, работать с неповрежденной тканью. В настоящее время существует как раз обратная тенденция — относиться с некоторым недоверием к работе, проведенной с неочищенными ферментами.

Методы очистки

По данному вопросу собрано большое количество полезных сведений в обзоре Швиммера и Парди [2354], 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 в различных фракциях, очень желательно как-либо сократить именно эту процедуру. В данном случае быстрота определений более важна, чем их 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 будет, естественно, зависеть от типа реакции, катализируемой ферментом, и в каждом конкретном случае должен быть разработан подходящий тест. В гл. II 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 разделяются эти два фермента, 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, с помощью которого можно измерить количество вещества С; тогда первый фермент можно будет очистить независимо от второго или, если это окажется неудобным, можно будет приготовить препарат второго фермента и добавить его в избытке ко всем пробам в качестве одного из реагентов.

Аналогичный случай может возникнуть, когда в реакцию, катализируемую простым ферментом, вовлекается кофермент, о присутствии которого в данной системе мы не знаем. И в этом случае активность при очистке исчезнет. Если удаленный фактор окажется в конце концов одним из изве-

стных коферментов, то он может быть просто добавлен к пробе; если же природа кофермента неизвестна, то можно восстановить активность фермента добавлением к нему либо прокипяченного тканевого экстракта (кипячение служит для удаления ферментов и белков, так как большинство коферментов сравнительно теплоустойчиво), 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, то его удельная активность, а следовательно, и чистота исходного препарата, естественно, нам неизвестны. Фермент находится в ткани в количестве, составляющем от $^1/_{10}$ до $^1/_{10\,000}$ части всего количества ткани. 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 этой 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, то единицей будет количество фермента, которое обусловливает образование определенного количества вещества в минуту, и так далее. В интересах постоянства важно выбрать такую новую единицу, которая, насколько это возможно, совпала бы с единицей, рекомендованной Комиссией по ферментам (см. стр. 22). 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*, которая является мерилом 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, удельную активность ферментов следует выражать числом единиц в 1 *мг* белка. Такой способ выражения наиболее удовлетворителен, хотя он, очевидно, и не дает 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 методом.

Количество белка можно определить несколькими методами. Классическим методом является определение общего азота по Кьельдалю [446]. Однако количество азота не всегда может служить точной мерой количества белка, так как содержание азота в различных белках довольно сильно варьирует (от 12 до 19%); кроме того, в эту величину могут входить и азотсодержащие вещества небелковой природы. Последнее обстоятельство причиняет особо большое неудобство в тех случаях, когда для фракционирования пользуются сульфатом аммония; при этом необходимо либо тщательно отдиализовывать раствор, либо проводить осаждение белков трихлоруксусной кислотой и затем мыть осадок до полного освобождения от аммония [1080]. Эта обработка еще более замедляет процедуру, и без того достаточно медленную вследствие того, что сжигание по методу Кьельдаля должно продолжаться не менее 8 *час* для полного превращения азота всех аминокислот в аммиак.

С успехом применяются также турбидиметрические методы, в которых используются такие осадители, как трихлоруксусная и сульфосалициловая кислоты. Для проведения этих определений требуется немного времени, и они могут считаться удовлетворительными для тех случаев, когда условия стандартизированы таким образом, что обеспечивают полное осаждение и позволяют избежать флокуляции (см., например, [354]). Следует отметить, что трихлоруксусная кислота дает иногда очень неполное осаждение даже при нагревании; это особенно относится к тем случаям, когда в среде присутствуют мукопротеиды [1242].

Для определения количества белка используют несколько колориметрических методов. Разработан количественный метод, основанный на биуретовой реакции [893, 2817]; поскольку эта реакция зависит от наличия пептидных связей, а не боковых групп в белке, состав белка, очевидно, не должен сказываться на результатах определения. Согласно Кёрку [1388], «эта реакция как основа для колориметрического метода анализа белков заслуживает критики менее, чем любая другая». Число небелковых веществ, которые могут влиять своим присутствием на определения, невелико. Особенно важным обстоятельством следует считать то, что метод не чувствителен к присутствию солей аммония. Метод Фолина и Чиокальто (см. [1625]), предложенный для определения количества белка, основан на определении в белке тирозина и триптофана: известно, что содержание этих аминокислот в различных белках колеблется в широких пределах и, следовательно, при определении по этому методу возможны значительные вариации.

В настоящее время для определения количества белка широко пользуются измерением интенсивности поглощения света (в спектрофотометре) при 280 *ммк*, 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 *ммк* равна 1. Нуклеиновые кислоты также имеют максимум поглощения в этой области спектра, но можно сделать приблизительную поправку на их присутствие, проводя измерения и при 260 и 280 *ммк* [2788].

Ранее уже было отмечено, насколько важна быстрота при проведении определения активности ферментов. То же относится и к методам определения количества сухого остатка или количества белка. Поэтому в процессе очистки фермента метод определения белка путем изменения величины поглощения при 280 *ммк* должен быть предпочтен другим методам. Выиграть время важнее, чем исключить те ошибки, которые могут возникнуть вследствие того, что удельное поглощение выделяемого белка иногда значительно отличается от средней величины поглощения для 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 происходит ли значительных изменений в среднем содержании этого компонента под влиянием очистки белка. Проверка может быть проведена путем определения количества белка на главных этапах его очистки с помощью одного из наиболее надежных методов, таких, как биуретовый метод или определение азота по Кьельдалю.

Когда, наконец, фермент получен в чистом виде и его удельная активность определена, чистоту отдельной фракции можно выразить в абсолютных значениях, обычно в процентах от количества чистого фермента, присутствующего в данном препарате. Однако при описании метода очистки фермента чистота обычно выражается числом ферментных единиц в 1 *мг* белка. До недавнего времени было принято произвольно обозначать чистоту наиболее очищенной из полученных фракций величиной 1,0 (независимо

от того, действительно ли эта фракция чиста) и выражать чистоту всех других фракций в долях от этой величины. Такой способ обозначения вводил исследователей в заблуждение, так как создавалось ложное представление, что данный фермент был получен в чистом виде.

Полезно при описании метода выделения фермента составить таблицу, по которой можно проследить процесс очистки на различных стадиях, эффективность различных фракционирований, общую степень очистки и выход. Очень желательно, чтобы результаты были представлены в таблице стандартной формы. Вполне удовлетворительна и дает необходимые сведения приводимая ниже табл. 1, состоящая из восьми столбцов. В столбце 1 дается краткое описание определяемых фракций, в столбце 2 — их объем, в столбце 3 — концентрация фермента, в столбце 4 (цифры столбца 3 умножить на цифры столбца 2) — общее число единиц фермента в данном объеме, в столбце 5 — концентрация белка, в столбце 6 (цифры столбца 3 разделить на цифры столбца 5) — удельная активность, в столбце 7 — выход (получают из цифр столбца 4, приняв активность исходного экстракта за 100%), в столбце 8 — степень достигнутой очистки (получают из цифр столбца 6, приняв первую цифру этого столбца равной 1).

Таблица 1

ОЧИСТКА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ (3.1.3.1) ИЗ СЛИЗИСТОЙ КИШЕЧНИКА ТЕЛЕНКА [1874]*

Фракция	Объем, *мл*	Концентрация фермента, *ед/мл*	Общее число единиц $\times 10^3$	Концентрация белка, *мг/мл*	Удельная активность, *ед/мг*	Выход, %	Степень очистки
Исходный экстракт	12 000	205	2 460	12,85	16	100	1
Осаждение при pH 5	5 000	216	1 080	4,97	43	44	3
Обработка бутанолом	4 450	166	739	0,18	920	30	57
Осаждение 60%-ным ацетоном	55	12 360	680	12,42	995	28	62
Осаждение 35—48%-ным ацетоном	20	26 250	525	11,88	2 210	21	138
Осаждение 40—50%-ным ацетоном	20	18 900	378	5,70	3 320	15	207
Обработка древесным углем	32	7 340	235	0,67	11 000	10	688
Осаждение 40—48%-ным ацетоном	10	14 200	142	1,03	13 800	6	861

* Эта таблица дается как иллюстрация стандартного способа изображения результатов очистки, но приведенные в ней цифры соответствуют действительному случаю. Таблица несколько модифицирована по сравнению с оригиналом Мортона, в частности сокращена процедура очистки. Для воспроизведения работы Мортона следует обратиться к оригинальной статье.

В табл. 1 приведен пример типичной очистки фермента. Чаще всего число ступеней разделения при очистке фермента приближается к 10, и на каждой ступени чистота фермента возрастает в среднем в 2—3 раза. Общая

степень очистки может возрасти в несколько тысяч раз, а общий выход чистого фермента составляет только около 5%. Тот факт, что выход ферментов низок, не имеет особого значения, поскольку исходного материала обычно достаточно много.

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 (см. табл. 62). При работе с тканью, богатой ферментом, не только получают больше фермента, но требуется в 10 и даже в 100 раз меньшая степень очистки, чтобы получить чистый препарат. Легко доступным источникам следует отдавать предпочтение.

При работе с бактериями, которые обычно трудно получить в больших количествах, можно использовать феномен индукции для получения культуры, значительно обогащенной данным ферментом, путем выращивания бактерий на среде, содержащей соответствующий субстрат.

Ряд ферментов находится в особых клеточных структурах, например в митохондриях. Поэтому в некоторых случаях имеет смысл вначале выделить митохондрии центрифугированием тканевых экстрактов при большом числе оборотов 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 того, чтобы получить митохондрии в больших количествах, необходимо иметь большие скоростные центрифуги и достаточное количество персонала, ибо работа эта поглощает много времени.

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 мышцы или печени достаточна простая экстракция водой. При работе с интенсивно гликолизирующей тканью должны быть приняты меры, предупреждающие подкисление, которое может повредить 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 гомогенизатора 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 быстром встряхивании с измельченным стеклом; аналогично действуют звуковые или ультразвуковые колебания, замораживание и оттаивание, обработка растворителями (такими, 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 протеиназами в том случае, если можно использовать какие-либо другие методы, так как в противном случае исследователь вынужден будет выделять фермент из чрезвычайно сложной смеси продуктов расщепления белков, возникшей в результате перевари-

вания. Однако часто, в особенности при работе с дрожжами, 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 заготовлять впрок активный сухой порошок [1]. Этот порошок может храниться и представляет собой удобный исходный материал, из которого фермент можно экстрагировать либо водой, либо буферным раствором. Обработку ацетоном следует всегда проводить при низкой температуре, но даже и при этой мере предосторожности некоторые ферменты разрушаются. Особый случай ферментативного лизиса под действием мурамидазы (3.2.1.17) можно наблюдать у *Micrococcus lysodeikticus*. Большинство приемов механического разрушения ткани малопригодно для работы с большими количествами материала.

Экстракция ферментов из митохондрий 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 вследствие набухания. Однако некоторые ферменты более прочно связаны со структурой митохондрий (возможно, в виде липопротеидного комплекса) и для их экстракции требуется специальная обработка. *Обзор применяющихся для этого методов приведен у* Мортона [1877]. 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 гидролитическими ферментами, например липазами, нуклеазами или протеолитическими ферментами.

Обработка бутанолом, которая при выделении некоторых ферментов, например щелочной фосфатазы (3.1.3.1), дает очень хорошие результаты, по-видимому, разрушает липопротеидный комплекс, в результате чего фермент переходит в водную фазу. Обработка детергентом, широко используемая при выделении компонентов цитохромной системы, приводит иногда к истинному растворению фермента, который и после удаления детергента остается в виде прозрачного раствора; иногда весь процесс очистки фермента приходится вести в присутствии детергента; в противном случае фермент выпадает в осадок.

Методы фракционирования

В полученном экстракте, помимо фермента, подлежащего очистке, присутствует и ряд других веществ большого и малого молекулярного веса. Малые молекулы могут быть удалены диализом, после чего останутся 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 одного

[1] Этот метод впервые был применен А. Лебедевым для получения препарата дрожжей, из которого легко извлекаются ферменты, в частности ферменты зимазного комплекса («Лебедевские дрожжи»).— *Прим. ред.*

и того же приема. Фракционирование обязательно должно контролироваться определением 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° 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 приходится обычно 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 pH и концентрации электролита (в особенности первому из них). Большинство трудностей, встречающихся при попытках воспроизвести уже опубликованные результаты выделения, связано с нарушением именно этих условий. Для успешной работы незаменим хороший стеклянный электрод.

На каждом этапе фракционирования суммарный белок делится на серию фракций (5—10 в предварительных опытах) путем постепенного увеличения концентрации соли, количества добавленного адсорбента, концентрации органического растворителя, кислотности и т. д. с таким расчетом, чтобы большая часть фермента находилась, если это возможно, в одной фракции. Иногда для удаления балластных белков применяют также фракционную 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 опытной пробе. 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%, 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 дальнейшего определения активности фермента небезопасно, так как условия осаждения белков в больших объемах не полностью совпадают с условиями их осаждения при опытном фракционировании в малых пробах. На осаждение фермента может, например, влиять присутствие белков, которые в пробном фракционировании удаляются на предыдущих стадиях, но которые при работе с большими объемами могут вызвать осаждение фермента уже при 62% насыщения сульфатом аммония. По этой причине целесообразно проводить 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

Часто бывает очень выгодно при работе с экстрактами животных тканей 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 часто удается превратить мутный экстракт в совершенно прозрачный раствор. При этом, однако, случайно может быть осажден и фермент.

Б. ФРАКЦИОННАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ НАГРЕВАНИЕМ

Это другой способ обработки, иногда весьма удобный как предварительная ступень при работе с термостабильными 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 удается иногда нагреть на 10° выше той температуры, которая в отсутствие субстрата вызывает разрушение фермента. Это дает возможность избавиться от большого количества балластных белков [119] (ср. [367]).

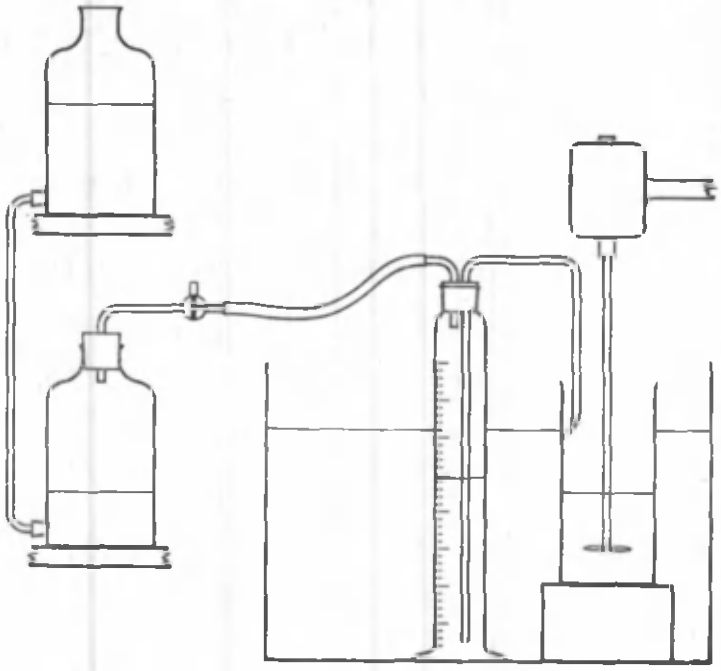
Для нагревания лучше всего иметь три водяные бани: одну с желаемой температурой, одну с несколько более высокой температурой и одну холодную. Раствор наливают в круглодонную колбу, которая должна быть наполнена не больше чем наполовину; колбу помещают в наиболее горячую баню и быстро вращают так, чтобы 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 такой же температурой, где и оставляют на определенный срок (в первой бане тем временем нагревается следующая порция раствора). После окончания прогревания колбу переносят в холодную баню, где ее 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 главных методов очистки белков. Кон и его сотрудники [470] широко использовали этанол при разделении белков крови. Исследуя возможность использовать различные растворители для разделения ферментов мышечного экстракта, Асконас [92] пришел к заключению, что лучшее разделение и наименьшие потери дает ацетон. Для получения хороших результатов при фракционировании белков ацетоном требуется низкая концентрация электролита (менее чем $M/30$), и поэтому желательно предварительно отдиализовать белковый раствор. Раствор, однако, не должен быть полностью свободен от электролита, иначе осадки не удастся отцентрифугировать. Было найдено, что наилучшие результаты при работе с мышцами получаются, когда pH поддерживается на уровне 6,5.

Поскольку большинство ферментов инактивируется органическими растворителями при комнатной температуре, необходимо принимать спе-

циальные меры для поддержания низкой температуры на всем протяжении работы. Для работы с 1 *л* раствора вполне удовлетворителен прибор, показанный на фиг. 3. Раствор фермента помещают в металлический сосуд из нержавеющей стали или алюминия, снабженный хорошей мешалкой и погруженный в баню, температура которой поддерживается на уровне —5°. 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° (чтобы предупредить замерзание), и продолжают до получения



Фиг. 3. Прибор для фракционирования ферментов с помощью органических растворителей [74].

желаемого количества осадка для первой фракции (или до тех пор, 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.

Известно некоторое число ферментов, очень устойчивых 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 будет 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 не оказывает вредного действия на бо́льшую часть ферментов. 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 общее количество выделяемого фермента во всех фракциях 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 опытной пробы удобнее 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 укажет вес соли, добавленной к раствору фермента. При осаждении белков сульфатом аммония рекомендуется ждать не менее 15 *мин*, а если возможно, то и дольше, до начала центрифугирования; в противном случае не будет хорошего 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 фильтруются через фильтровальную бумагу под собственным давлением, но такая процедура занимает много времени. Фильтрование с отсасыванием недостаточно эффективно, если не используются дополнительные фильтрующие средства; однако эти последние могут адсорбировать часть фермента, и поэтому они не очень приемлемы при фракционировании малых объемов, хотя в работе с большими объемами их применяют вполне успешно.

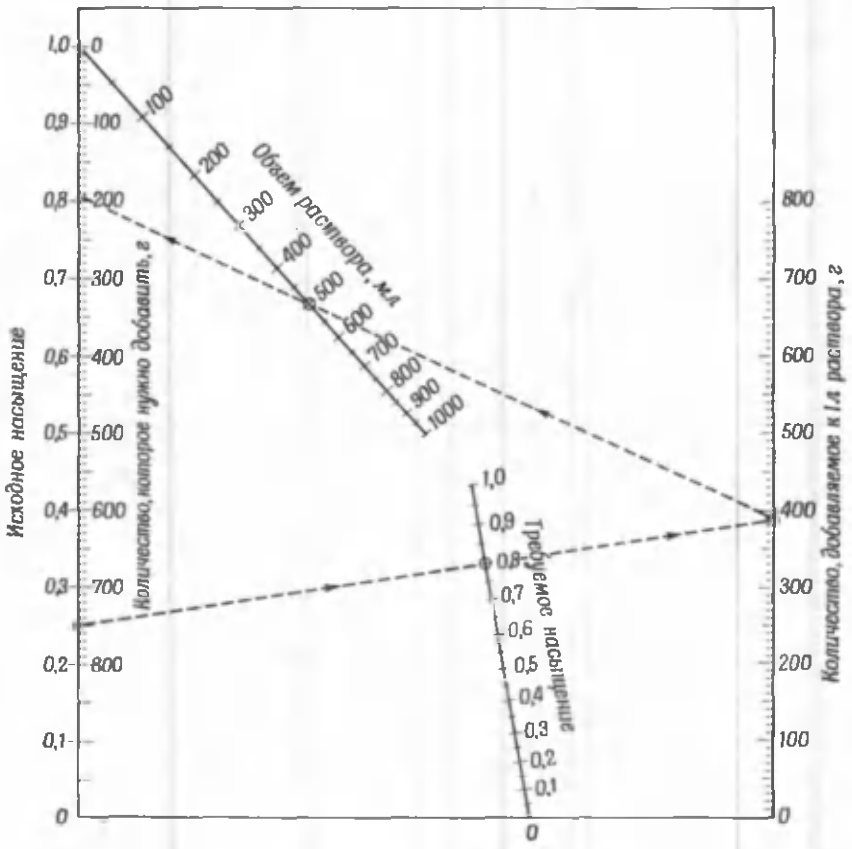
После того как первая фракция отцентрифугирована, раствор переносят в другую центрифужную пробирку и продолжают добавление соли. Осадок растворяют в малом объеме воды или буфера.

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 не возникает трудностей при повторении пробного фракционирования на основной массе раствора. 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 выражения 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 легкое 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 фиг. 4 приведена номограмма, с помощью которой можно определить количество соли, необходимое для перехода от одной



Фиг. 4. Номограмма для вычисления количества сульфата аммония, которое необходимо добавить, чтобы получить заданный процент насыщения [620].

степени насыщения к другой. Обычно при фракционировании сульфатом аммония 100%-ное насыщение принимается за полное при комнатной температуре, а не при 0°.

В основе теории фракционирования ферментов высаливанием (уже обсуждавшейся авторами [631]) лежит хорошо известное уравнение

$$\lg s = \beta' - K'_s \frac{\Gamma}{2},$$

где s — растворимость фермента, выраженная в граммах на 1 $л$ раствора; $\frac{\Gamma}{2}$ — ионная сила в молях на 1 $л$ раствора; β' и K'_s — константы. При увеличении концентрации соли наступит момент, когда растворимость фермента будет соответствовать его концентрации, и фермент начнет выпадать в осадок. При дальнейшем повышении концентрации соли большая часть

фермента перейдет 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 pH, температурой и природой соли, но также и концентрацией фермента. Таким образом, чтобы успешно повторить условия очистки по опубликованным данным, необходимо довести исходную активность фермента в растворе до тех же значений, с которыми работали авторы.

Обычно не стоит тратить время, чтобы повторять фракционирование сульфатом аммония в одних и тех же условиях несколько раз подряд. Однако если варьировать pH или температуру при фракционировании, то порядок, в котором будут осаждаться различные белки, может 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. В зависимости от условий его можно применять по-разному. Если фермент адсорбируется, то его удаляют и отделяют от других компонентов раствора, а затем экстрагируют или элюируют с адсорбента. Если же фермент не адсорбируется, то обработку адсорбентом используют для удаления большого количества балластных веществ из раствора фермента.

В настоящее время в качестве адсорбентов используются главным образом гель фосфата кальция и гель гидроокиси алюминия Cγ; они имеют очень широкое применение [1]. Для адсорбции нежелательных примесей используют древесный уголь [627, 1874]; иногда используют другие адсорбенты, например гель $Zn(OH)_2$. Однако гель фосфата кальция, по-видимому, больше всего отвечает предъявляемым требованиям.

Лучше всего адсорбция происходит в слабокислых растворах, при pH 5—6 и при низкой концентрации электролита. Присутствие сколько-нибудь значительного количества солей обычно мешает адсорбции, так что для получения одного и того же результата требуется в этом случае большее количество адсорбента. Поэтому с целью экономии адсорбента желательно 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.

---

[1] *Приготовление геля фосфата кальция* [1339]. 150 *мл* раствора хлористого кальция (132 *г* $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ в 1 *л*) разбавить до 1600 *мл* водопроводной водой и встряхивать с 150 *мл* раствора трехзамещенного фосфата натрия (152 *г* $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ в 1 *л*). Реакцию среды довести до pH 7,4 разбавленным раствором уксусной кислоты, и образовавшийся осадок 3 или 4 раза промыть большим объемом воды (15—20 *л*), каждый раз декантируя 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 декантировали, 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 Cγ [2875]. Растворить 300 *г* $(NH_4)_2SO_4$ в 6,5 *л* воды, нагреть до 60° 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* $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ в 1 *л* воды, при энергичном перемешивании. Продолжать перемешивание в течение еще 15 *мин* после добавления, поддерживая температуру не ниже 60°. Разбавить взвесь до 40 *л*, дать осадку осесть (осаждение должно быть достаточно быстрым) и жидкость декантировать. Промывание повторить несколько раз, и каждый раз декантировать водный слой; к четвертой промывной воде добавить 80 *мл* 20%-ного NH_3. После 12—20 промываний вода становится мутной; начиная с этого момента, осадок промыть еще 2 раза и оставить на несколько недель для перехода Cα-формы в Cγ-форму.

Процедура состоит в последовательном добавлении порций геля к раствору фермента, перемешивании полученной суспензии, центрифугировании и удалении одной порции геля перед добавлением следующей. В противоположность другим методам фракционирования активность фермента определяют в небольших порциях основного раствора и таким образом прослеживают 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 удаляют другие белки; затем внезапно, вероятно только одной или двумя порциями 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 с активных фракций адсорбента. 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 удобна быстродействующая мешалка. Часто фермент элюируется слабощелочными растворами буферов, например фосфатным буфером с pH 7,6. Если же этим буфером не удается элюировать фермент, то это обстоятельство следует считать весьма благоприятным, так как при повторении элюции фосфатным буфером до прекращения перехода белка в раствор 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 [119]. Этот метод элюции с успехом применялся в работе с различными ферментами.

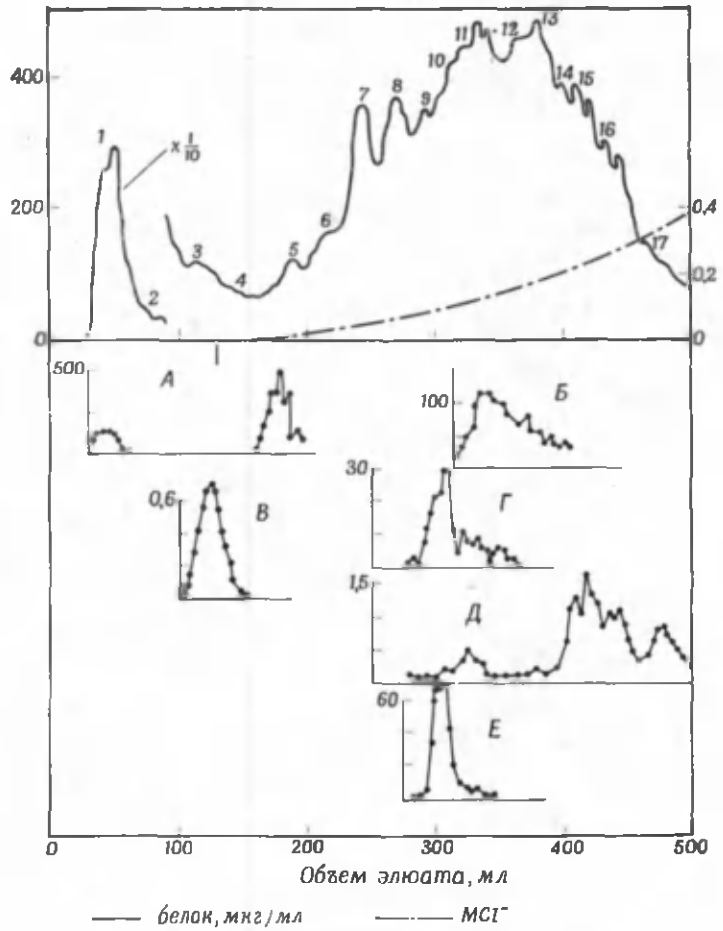
Объем элюирующей жидкости не должен быть слишком большим и не должен превышать объема отцентрифугированного геля. Лучше проводить элюцию несколько раз малыми порциями, чем один раз большим, объемом элюента.

Е. ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКЕ

За время, прошедшее с момента появления первого издания этой книги, метод разделения белков посредством хроматографии на колонках был значительно усовершенствован. Вне зависимости от того, на чем основано деление белков — на явлениях адсорбции, ионном обмене или эффекте молекулярного сита,— техника работы во всех случаях практически одинакова. Обычно процесс начинается с внесения белка, растворенного в разбавленном буфере, в колонку, предварительно уравновешенную тем же буфером. Затем колонку с внесенным в нее белком промывают этим же разбавленным буфером и после указанных процедур начинают элюцию белка с помощью «солевого градиента», т. е. при постепенном повышении концентрации соли. Элюат собирают на фракционном коллекторе, что позволяет разделить его на множество фракций. Затем в этих фракциях определяют ферментативную активность и количество белка. Иногда желательно последовательно использовать несколько солевых градиентов. Возможности метода можно видеть из фиг. 5.

Гели, используемые для фракционирования методом адсорбции (см. раздел Д), не подходят для работы на колонках. Для этой последней цели применяются специальные материалы. Так, можно, например, использовать определенные формы фосфата кальция, смешанные с суперселлом [2589] или целлюлозой [1748]. Фосфат кальция может быть превращен в микро-

кристаллический гидроксилапатит [1], который можно использовать в колонках без добавления к нему какого-либо гранулированного материала. Описание метода работы с ним дано у Тизелиуса и др. [2655].



Фиг. 5. Хроматография растворимых белков печени крысы на ДЭАЭ-целлюлозе [1354].

Вверху — кривая выхода белка; внизу — кривые выхода ряда различных ферментов, элюируемых с ДЭАЭ-целлюлозы.
А. Аспартат-аминотрансфераза (2.6.1.1). *Б.* Аланин-аминотрансфераза (2.6.1.2). *В.* Глицеролдегидрогеназа, специфически активируемая НАДФ. *Г.* Изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42). *Д.* Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (1.1.1.49). *Е.* Фосфоглюконатдегидрогеназа (1.1.1.44).

Целый ряд ферментов был успешно очищен на ионообменных смолах, в частности на смоле амберлит IRC-50 (или на ее более тонкой дисперсной

[1] *Приготовление гидроксилапатита* [1560]. 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 содержимое кипятить в течение 1 *час* 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 взвеси 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 кипятя суспензию в течение 15 *мин*. При хранении в 0,001 *М* фосфате препарат стабилен в течение года.

форме XE-64). Величина pH элюирующего буфера должна быть подобрана очень точно во избежание значительной денатурации белков [277]. Для ионообменной хроматографии ферментов [2080] широко используются различные производные целлюлозы, в том числе диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза) и карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза). На фиг. 5 приведен пример фракционирования белков на ДЭАЭ-целлюлозе, а в работе Мура и Ли [1853] дано подробное описание исследований ферментов экстракта из печени, проведенных с использованием ДЭАЭ-целлюлозы.

Сефадекс представляет собой трехмерную полисахаридную сеть. Подобные материалы действуют как молекулярные сита и могут быть использованы для разделения смеси белков по размеру молекул. В ряде случаев при использовании этих материалов было получено отличное разделение; метод основывается на том, что мелкие молекулы могут проникать внутрь частиц и удерживаться ими. Формы сефадекса, имевшиеся в продаже к моменту написания этой книги, пригодны для разделения белков, молекулярный вес которых не превышает 100 000, но был описан поперечно сшитый полиакриламид, пригодный для разделения белков с молекулярным весом до 300 000 [1113]. Все колонки, за исключением колонок из сефадекса, нуждаются в солевом градиенте для элюции.

Имеются два подробных обзора [2080, 2686] современных методов очистки ферментов путем хроматографии на колонках.

Ж. 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 иногда чисты не более чем на 50% и могут содержать ряд других ферментов. При перекристаллизации удельная активность кристаллов возрастает, так что 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.

Кристаллизацию ферментов чаще всего проводят из растворов сульфата аммония. Проводить ее следует медленно, в течение нескольких дней или даже недель, если хотят получить хорошие кристаллы. Обычный метод состоит в добавлении соли к достаточно концентрированному раствору фермента до появления слабого помутнения. Затем раствор оставляют стоять и при этом постепенно (очень медленно) повышают концентрацию соли. Это можно сделать различными способами: добавляя концентрированный раствор соли по каплям с большими интервалами или с помощью очень тоненького капилляра, добавляя соль сквозь мембрану для диализа или, наконец, просто подвергая раствор медленному испарению. Может оказаться необходимым провести работу при нескольких значениях pH и температуры, прежде чем будет получен надлежащий результат. Кристаллизацию можно проводить также при постоянной концентрации солей, используя для этого постепенное изменение pH или температуры. Нельзя дать общие правила кристаллизации ферментов — наиболее подходящие условия должны быть найдены экспериментально в каждом отдельном случае; однако обзор Цока и Бюхера [529], 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.

Известны случаи, когда удавалось кристаллизовать ферменты и другими путями, например из их растворов в органических растворителях. Там, где другие методы непригодны, может даже оказаться возможным кристаллизовать фермент в виде соли тяжелого металла; фосфопируватгидратаза (4.2.1.11) была закристаллизована в виде неактивной ртутной соли, из которой активный фермент получили после удаления металла диализом против раствора сульфата аммония, содержащего аммиак и цианид [2788].

Появление кристаллов, обладающих ферментативной активностью, отнюдь еще не является доказательством того, что закристаллизовался сам фермент; было много разочарований, когда обнаруживалось, что кристаллы либо имеют неорганическую природу, либо состоят из какого-то другого 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.

3. ЧЕРЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

Следует рассмотреть последовательность, в которой применяются различные методы фракционирования при проведении работы по очистке 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 ввиду присутствия таких ферментов (например, протеиназ), которые при более высокой температуре могут вызвать слишком большое разрушение белков, либо, наконец, просто потому, что степень достигаемой очистки все равно невелика и, следовательно, затраты труда не оправдываются.

Остается выбор между солями, органическими растворителями, адсорбентами или колонками. Наилучший порядок чередования приемов очистки определяют экспериментально, но при этом следует учесть несколько моментов. На ранних стадиях очистки чаще всего имеют 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 виде небольших удобных порций. Если осадок хорошо отделяется на центрифуге, то прежде всего можно провести осаждение белков сульфатом аммония; если же осадок отделяется плохо, то очистку вновь будут лимитировать размеры имеющейся скоростной центрифуги. При фракционировании сульфатом аммония не нужно предварительно проводить диализ, между тем как адсорбция, сама по себе очень удобная в качестве первой ступени очистки, обычно требует диализа. В настоящее время не существует прибора для удобного и быстрого диализа больших объемов жидкостей; для того же, чтобы отдиализовать 10 или 20 *л* ферментного раствора обычным путем, приходится расходовать много метров целлофановых трубок. Диализ — самый медленный процесс при очистке фермента, и хотя такие ступени обработки неизбежны, их следует сводить к минимуму и по возможности проводить в конце очистки, когда обрабатываются уже меньшие объемы жидкости. И все же методы адсорбции так удобны, что их стоит применять даже на начальных стадиях очистки, тем более что диализ перед адсорбцией не обязательно должен быть исчерпывающим.

При диализе возможна потеря активности фермента — либо за счет нестабильности самого фермента, либо за счет удаления какого-то кофактора. Кроме того, при диализе в раствор фермента попадают из воды следы ингибиторов — металлов (например, Cu), если только для диализа не применяется очень чистая вода. Фермент обычно имеет очень большое сродство к этим ингибиторам, и хотя их концентрация в омывающей воде чрезвычайно мала, фермент может присоединить все следы металла, имеющиеся в весьма большом объеме воды. Это не так важно при работе с грубыми препаратами, но зато очень важно на последних стадиях очистки фермента.

Если можно предварительно провести диализ, то адсорбцию следует считать наилучшей первой ступенью очистки. Адсорбенты обычно оседают достаточно быстро, так что через короткий промежуток времени бо́льшую часть жидкости можно слить с осадка и таким образом избежать центрифугирования большого объема жидкости.

Элюаты, полученные при адсорбционном фракционировании, содержат соли, поэтому логично вслед за адсорбцией провести фракционирование сульфатом аммония, чтобы таким образом избежать диализа между двумя названными стадиями. Диализ потребуется лишь после фракционирования сульфатом аммония (если за первым фракционированием немедленно не последует второе), но при этом мы будем уже иметь дело с меньшим объемом жидкости. Удобным методом является обессоливание на колонках из сефадекса.

В тех случаях, когда за элюцией, проведенной с помощью раствора сульфата аммония, немедленно следует фракционирование солью, при расчете процента насыщения необходимо учитывать количество сульфата аммония в элюате. Точно так же если вслед за первым идет второе фракционирование сульфатом аммония, то необходимо учитывать содержание соли в растворах, полученных после растворения осадков от первого фракционирования. Так как сухой вес белка в таком осадке мал по сравнению с его объемом, то обычно достаточно определить объем осадка после центрифугирования и обрабатывать его как равный объем раствора сульфата аммония той концентрации, которая использовалась для фракционирования.

На колонках неудобно работать с большими объемами, поэтому лучше пользоваться колонками на более поздних стадиях очистки ферментов. При сравнении этого метода фракционирования с другими не следует забывать, что набивка и промывание колонки, а также элюция фермента требуют значительного времени. Если фермент элюируется с колонки не узкой зоной, то может происходить довольно заметное его разбавление.

И. 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 сульфатом аммония, адсорбции на геле фосфата кальция (или гидроокиси алюминия Cγ), осаждения ацетоном (или спиртом) и хроматографии на колонке, например на колонке из ДЭАЭ-целлюлозы. Представляется вполне вероятным, что большинство ферментов можно очистить, пользуясь комбинацией только этих четырех методов. Однако в особых случаях применяются и другие методы. К ним следует прибегать тогда, когда перечисленные выше методы не дают результатов.

Другие осадители

Иногда на ранних стадиях очистки можно удалить большое количество белковых примесей без потери фермента путем осторожного добавления солей тяжелых металлов, например свинца [167]. (Слишком большое количество свинца приведет к потере фермента.)

Глюкозооксидазу при очистке осаждали таннином [508] и образовавшийся комплекс разрушали ацетоном. В некоторых случаях ферменты осаждали добавлением нуклеиновой кислоты [2787] и последнюю затем удаляли, осаждая ее протамином.

Денатурация хлороформом

На ранних стадиях очистки большое количество неактивного белка можно удалить по методу Цучихаши [2684], который основывается на денатурации белков при встряхивании их растворов со смесью спирта и хлороформа. Этот метод особенно пригоден для удаления всего гемоглобина из экстрактов тканей животных или из экстрактов эритроцитов [288, 1078].

Электрофорез

Электрофорез в стандартном аппарате Тизелиуса пригоден скорее для определения гомогенности полученных препаратов, нежели для препаративного их выделения в значительных количествах. Он очень удобен для контроля за ходом очистки и особенно ценен как способ получения небольших порций чистого фермента, которые могут быть использованы для определения удельной активности и чистоты различных фракций. При работе с препаративной кюветой, состоящей из двух секций, ток пропускают до тех пор, пока пики, соответствующие различным компонентам, не разделятся достаточно хорошо. Затем ток выключают и смещают раствор до тех пор, пока в верхней половине кюветы на восходящей границе не останется только самый быстрый компонент. В верхней части другой секции кюветы часто можно обнаружить только самый медленный компонент. Таким образом, при отсечении верхних половин обеих секций кюветы можно получить эти два компонента отдельно в состоянии, приближающемся к чистому, и измерить их удельные активности. Если один из этих компонентов представляет собой фермент, то его удельная активность будет значительно выше, чем средняя удельная активность исходного раствора. Если же ни один из них не является ферментом, то удельная активность каждого будет ниже средней удельной активности исходного раствора; в этом случае фермент не может быть выделен в чистом виде и его можно получить лишь в смеси с одним или несколькими другими компонентами.

Конечно, после того как препаративная очистка завершена, удельную активность выделенного препарата фермента следует сравнить с активностью чистого препарата фермента, так как указанные методы не являются совершенными.

Чтобы аппаратом Тизелиуса можно было пользоваться для препаративных целей, были сконструированы специальные кюветы.

Для разделения ферментов можно использовать и электрофорез на бумаге. Метод Грассмана и Ханнига [887] позволяет проводить процесс непрерывно и осуществлять разделение из значительного количества раствора. Раствор буфера стекает непрерывно вниз по листу фильтровальной бумаги, капая с зубцов, имеющихся на нижней части края листа, в ряд пробирок. Электрический ток пропускают под прямым углом к току жидкости, а фермент непрерывно подается на бумагу в точке, расположенной в верхней части листа. Компоненты, имеющие различные подвижности в электрическом поле, стекают к нижнему краю листа, в разной степени отклоняясь от вертикали, и достигают нижнего края в различных точках. Описание методов такого типа дано в обзоре Бира [247].

На конечных стадиях очистки небольших количеств фермента с успехом применяется [2457] зональный электрофорез в крахмальном геле, хотя

при элюировании фермента с геля иногда возникают трудности. Для несколько бо́льших количеств белка использовалась электрофоретическая колонка из целлюлозы, изготовленная по методу Пората [2106].

Концентрирование

Обычно при фракционировании ферментных растворов по одному из описанных выше методов объем раствора уменьшается, однако бывают случаи, когда требуется концентрировать раствор фермента до еще меньшего объема. Это необходимо, например, тогда, когда адсорбент характеризуется относительно высоким сродством к ферменту, вследствие чего при элюировании получают раствор недостаточно большой концентрации. Упаривание при перегонке под вакуумом нежелательно, так как при этой процедуре белковый раствор вспенивается и фермент может денатурироваться. Один из возможных методов состоит в том, что раствор частично замораживают, а затем удаляют лед; в других случаях заполняют трубки для диализа раствором белка и обдувают их током теплого воздуха. Наиболее часто применяют высушивание из замороженного состояния (так называемую лиофилизацию). Однако при всех этих методах концентрируется не только фермент, но также и соли, так что можно в конце концов получить просто большое количество соли с небольшим количеством белка, который затем потребуется подвергнуть диализу. Ценным методом можно считать концентрирование раствора с помощью ультрафильтра. При таком способе соли уходят с водой и можно даже промыть фермент на фильтре до полного освобождения от солей. Удобный ультрафильтр описал Ароншсон [88].

Другой метод концентрирования ферментного раствора состоит в добавлении к нему сухого сефадекса, который одновременно задерживает соли и связывает воду, в результате чего фермент концентрируется.

Критерий чистоты ферментов

Вероятно, ни один метод сам по себе недостаточен, чтобы доказать, что выделенный продукт состоит только из одного белка — собственно фермента. На основании данных одного теста можно лишь с известной степенью вероятности говорить о чистоте продукта, но если продукт оказывается гомогенным при проверке несколькими различными методами, то вероятность значительно увеличивается и фермент может быть признан чистым.

Для ферментов пригодны те же методы проверки гомогенности, которые используются для проверки гомогенности других белков. Это методы, основанные на определении физических свойств белка, а именно ультрацентрифугирование, электрофорез и построение кривой растворимости. Однако для ферментов имеются еще и дополнительные тесты, основанные на их каталитической активности, и эти тесты могут убедительно подтвердить данные, полученные с помощью физических методов.

Исходя из экспериментальных данных, следует признать, что седиментация белков в ультрацентрифуге в виде одного компонента не может служить столь надежным доказательством их чистоты, каким является их гомогенность при электрофорезе. Это зависит от того, что константы седиментации белков распределены не равномерно, а имеют тенденцию группироваться вокруг некоторых вероятных значений. Поэтому возможно, что в смеси, состоящей из двух белков, оба белка будут иметь приблизительно одинаковую константу седиментации и, следовательно, будут оседать как один белок. Вероятность этого тем больше, что оба эти белка и без того достаточно близки по своим свойствам, коль скоро они прошли вместе через весь процесс очистки.

С электрофоретическими подвижностями белков дело обстоит иначе, и при анализе сложной смеси белков (например, мышечного экстракта) в аппарате Тизелиуса наблюдают обычно большее число компонентов, чем с помощью ультрацентрифуги. *При анализе мышечного экстракта кролика в ультрацентрифуге* получают, например, только два пика, а при электрофорезе — восемь пиков. Если очищенный препарат дает только один пик в аппарате Тизелиуса, это можно считать удовлетворительным доказательством его чистоты. Однако известно, что даже при электрофорезе смесь двух белков может дать один пик, если проводить определения только при одном значении pH; поэтому, для того чтобы получить убедительные результаты, необходимо провести электрофорез при нескольких значениях pH.

Следует отметить, что ни один из перечисленных методов не отличается достаточной чувствительностью к присутствию малых количеств компонентов. Вполне возможно, что компоненты, составляющие менее 1% общего количества белка, могут остаться совершенно незамеченными. Мышечный экстракт, безусловно, содержит значительно больше различных белков, нежели восемь белков, обнаруженных при электрофорезе, и нередко в ходе очистки появляются пики с другими значениями электрофоретической подвижности.

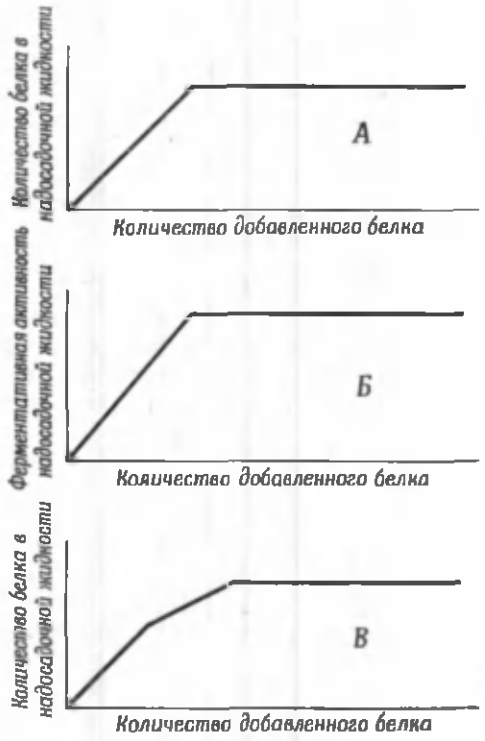
Может оказаться, что продукт, представляющий собой один белок, содержит только следы выделяемого фермента и тем не менее при проверке с помощью двух описанных методов его можно ошибочно счесть чистым ферментом. Однако если в ходе очистки сохраняется пропорциональность между количеством белка (высота пика) и ферментативной активностью, то очень вероятно, что исследуемый белок действительно представляет собой фермент. С помощью фракционирующей электрофоретической кюветы оказывается возможным делать «срезы» (отбирать пробы) в различных участках пика, и если все «срезы» обладают одинаковой удельной активностью, то ясно, что *подвижности фермента и белка совпадают*.

Для обнаружения компонентов, присутствующих в пробе в малых количествах, наиболее чувствительным оказывается метод построения кривой растворимости [1996]. 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 фиг. 6, 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 (фиг. 6, *А*). 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, причем наклон первого ее отрезка будет больше наклона второго (вследствие того, что второй компонент составляет лишь часть общего количества белка). На фиг. 6, *В* видны прямолинейные отрезки, соответствующие каждому из двух присутствующих компонентов.

Теоретически возможно получить график, подобный изображенному на фиг. 6, *А*, также и со смесью белков, если только количества присутствующих в ней белков пропорциональны их растворимости, так что раствор

окажется насыщенным всеми белками в один и тот же момент. Однако это маловероятно и еще менее вероятно, что отношение растворимостей отдельных белков будет оставаться одинаковым в разных растворителях. Поэтому если график, имеющий форму, представленную на фиг. 6, *А*, получен с несколькими разными солевыми растворами, то это можно считать очень убедительным доказательством того, что препарат состоит только из одного белка.

Так как прямая, наклон которой равен 1 : 100, мало отличается от горизонтальной линии, то возможно, что примесь белка, составляющая



Фиг. 6. Определение чистоты фермента по кривой растворимости.
Объяснение см. в тексте.

только 1% всего количества белка, останется необнаруженной (если только наблюдение не будет проведено также и в условиях значительного избытка твердой фазы).

Более простой способ определения 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 фиг. 6, *А*; если же в надосадочной жидкости второй пробирки количество белка будет бо́льшим, то это будет свидетельствовать о том, что препарат содержит более чем один компонент.

Для ферментов данные, полученные при определении растворимости, убедительно подтверждаются данными, полученными при одновременном

определении активности и количества белка в надосадочной жидкости. Если фермент присутствует в белке как примесь, то ясно, что он будет продолжать переходить в раствор (и поэтому активность раствора будет возрастать) спустя долгое время и после того, как раствор окажется насыщенным белком. Если график активности совпадет по форме с графиком растворимости белка и будет иметь отчетливый перелом в той же точке, как показано на фиг. 6,*Б*, то это послужит доказательством того, что фермент имеет такую же растворимость, как и белок. Подобный результат, полученный с несколькими различными растворителями, можно считать уже очень убедительным доказательством гомогенности и идентичности.

Доказательство чистоты препарата, основывающееся на характерной для данного фермента растворимости, можно также получить путем повторной перекристаллизации. Часто наблюдают, что при повторной перекристаллизации удельная активность фермента возрастает до некой постоянной максимальной величины, одинаковой для ряда различных препаратов фермента. Это является показателем того, что фермент получен в чистом виде.

Однако в некоторых случаях ферменты, выступающие как гомогенные белки *при центрифугировании и в аппарате Тизелиуса, могут быть разделены* методом электрофореза на колонках из крахмала [2457] или агара [2861] на несколько «изоферментов», также обладающих ферментативной активностью. Эти методы разделения, с помощью которых было обнаружено, что многие ферменты существуют в нескольких формах, открыли новый важный раздел в биологии ферментов, который рассматривается в гл. XIII.

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 желательно 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 протекает за счет другого фермента, присутствующего 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 даже всего 1 *мг* фермента, то это будет означать, что в пробе может присутствовать 10 *мкг* сопутствующего фермента, а такое количество значительно превосходит то, которое обычно необходимо, чтобы эффективно катализировать ферментативную реакцию. Опасность меньше при работе с ферментами, много раз перекристаллизованными, но она все же всегда имеется, если используют в опыте большие количества фермента.

При изучении двуферментной системы имеется опасность другого рода в тех случаях, когда один из ферментов добавляется в большом избытке. 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. Штрауб [2545] показал, что в лактатдегидрогеназной системе (1.1.1.27) реакция вообще не будет протекать, если в систему добавить достаточно большое количество фермента!

ГЛАВА IV

КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Значение изучения кинетики действия ферментов

Характерным свойством ферментов является их способность катализировать течение определенных химических реакций. 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. III).

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 [1]. 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 неизмененном виде не могут быть приложены к изучению действия ферментов, так как это последнее подчиняется особым законам. Кинетика действия ферментов — это специальный раздел, имеющий самостоятельное, и притом очень важное, значение.

Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций

Факторы, определяющие характер течения ферментативных реакций, многочисленны и разнообразны (см. гл. II). Поэтому трудно получить кине-

[1] Чувствительность клетки к внешним воздействиям связана с чувствительностью не только самих ферментов, но и тех протоплазматических структур, на которых они смонтированы. Ряд воздействий не оказывает существенного влияния на изолированные ферменты, но коренным образом изменяет их действие в живой системе.— *Прим. ред.*

тические 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. II 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. II. 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. 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 промежуток времени вызовут превращение в 2 раза большего количества субстрата, чем одна молекула; поэтому скорость реакции будет пропорциональна концентрации фермента

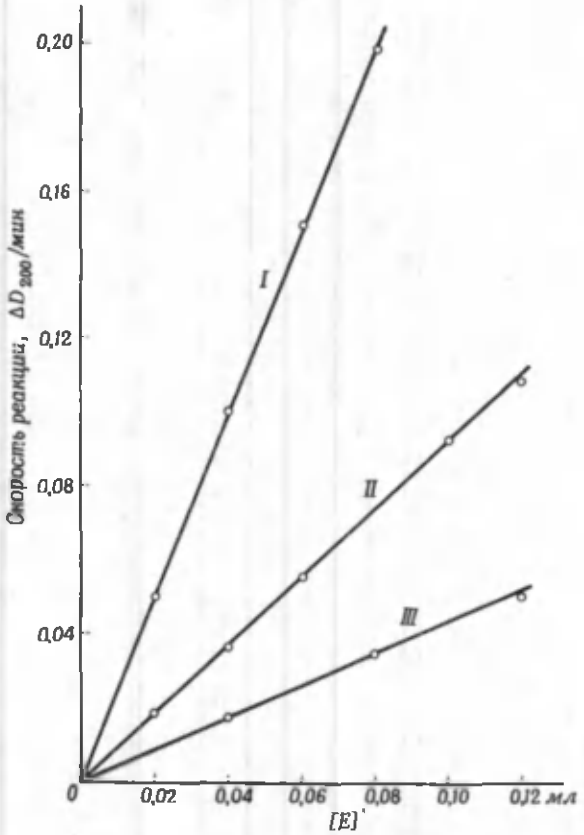
$$v = k[\mathrm{E}]. \qquad \text{(IV.1)}$$

В подавляющем большинстве случаев действительно имеет место подобное соотношение, и именно на нем основываются почти все методы определения концентрации ферментов. Типичные примеры приведены на фиг. 7. Встречающиеся в некоторых случаях отклонения по большей части можно бывает объяснить одной из следующих причин:

1. Иногда при значительном увеличении концентрации фермента наблюдается отклонение от линейной зависимости между концентрацией фермента и скоростью реакции, как это представлено на фиг. 8. Обычно отклонение это кажущееся; оно отражает лишь несовершенство метода определения и не свидетельствует об истинном понижении активности фермента. Подобное положение типично, например, для манометрических методов, в которых роль лимитирующего фактора играет скорость диффузии газа в жидкость; скорость реакции может быть определена манометрическим методом только в известных пределах. Наличие ограничений такого рода, как правило, выясняется при улучшении способа определения. Если, например, кривая *I* на фиг. 8 представляет результаты, полученные манометрическим методом при определенной скорости качания, а кривая *II* получается при увеличении скорости качания (а следовательно, и скорости диффузии газа), то очевидно, что скорость реакции пропорциональна концентрации фермента в значительно более широких пределах, чем об этом свидетельствует кривая *I*. Подобного рода ограничения, связанные с особенностями метода анализа, могут встречаться и при других способах определения активности.

В тех случаях, когда определение активности данного фермента предусматривает добавление второго фермента, активность последнего будет лимитировать скорость изучаемой реакции, в результате чего может получиться кривая, подобная кривой *I* на фиг. 8. При увеличении количества второго фермента скорость будет увеличиваться и мы получим картину, представленную кривой *II*. Те же самые рассуждения приложимы к системе, содержащей несколько ферментов, если в этой системе количество

одного фермента изменяется, а количество 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,



Фиг. 7. Типичные примеры влияния концентрации фермента на скорость реакции [2148].

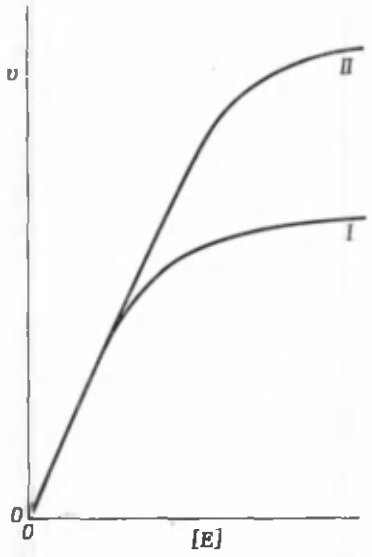
I — аспартат—аммиак-лиаза (4.3.1.1); *II* — фумаратгидратаза (4.2.1.2.); *III* — аконитатгидратаза (4.2.1.3).

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 рассматриваемого фермента и в предельном случае будет изменяться обратно пропорционально его концентрации.

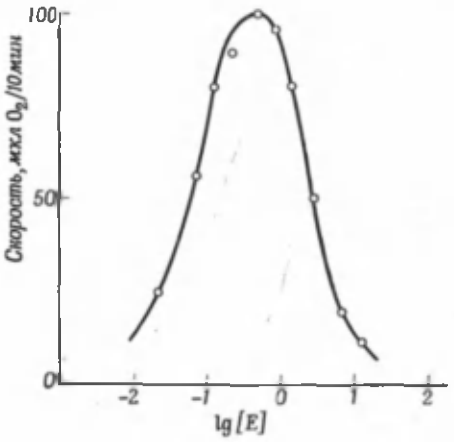
2. Как уже упоминалось в гл. III, если в распоряжении исследователя имеется чистый фермент, то становится возможным добавлять его к изучаемой системе в относительно очень большом количестве. Если при этом фермент обладает значительным сродством к одному из компонентов системы, например к коферменту, то практически весь кофермент может оказаться связанным данным ферментом, и в результате этого 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 система с участием лактата. Штрауб [2545] показал, что если значительно увеличивать

концентрацию лактатдегидрогеназы (1.1.1.27) в условиях постоянной и притом небольшой концентрации НАД и значительной концентрации флавопротеида, то ход реакции будет характеризоваться кривой, приведенной на фиг. 9. На этом графике концентрация фермента для удобства отложена в логарифмической шкале. 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 общей реакции.

3. Кривая, подобная изображенной на фиг. 8, может получаться в тех случаях, когда вместо определения начальной скорости реакции определяют изменения, происходящие в результате реакции за определенный



Фиг. 8. Ограничение скорости реакции условиями измерения.
Объяснение см. в тексте.



Фиг. 9. Влияние очень высокой концентрации фермента на скорость процесса в сложной ферментной системе [2545].
Система: Лактат + Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27) + НАД + Флавопротеид (1.6.4.3) + + Метиленовый синий + O_2.

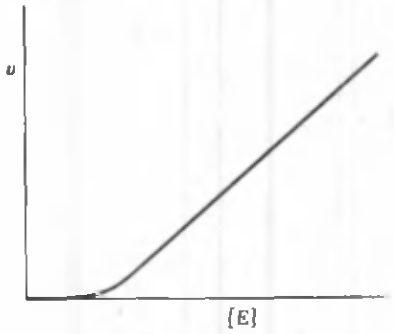
период времени, как показано на фиг. 2, *Б*. Подобный результат вызывается исчерпанием субстрата и не указывает на отсутствие пропорциональности между начальной скоростью и концентрацией фермента. Пример такого рода был приведен [1076] для действия альдолазы (4.1.2.b).

4. Очень редко получают кривую, сходную с приведенной на фиг. 10. Кривая такой формы указывает на 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 добавленного фермента полностью сохранят свою активность. На графике получают при этом нормальный тип линейной зависимости, но прямая бывает смещена от начала координат на расстояние, пропорциональное количеству токсичной примеси. Если, например, фермент, как это часто случается, чувствителен к следам ионов тяжелых металлов, то присутствие небольших количеств меди в используемом буферном растворе или в дистиллированной воде может обусловить появление кривых такого рода.

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

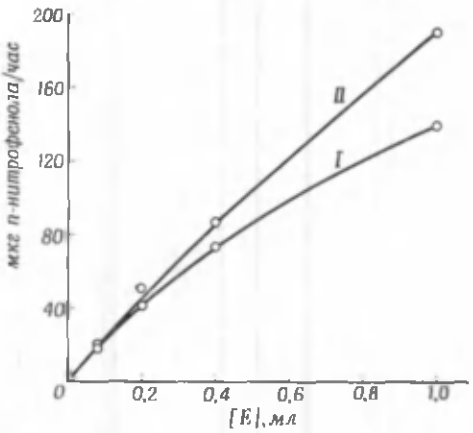
$$E + I \rightleftarrows EI, \qquad (IV.2)$$

то доля фермента, находящегося в неактивной форме, будет увеличиваться по мере увеличения концентрации ингибитора в смеси. Так как ингибитор



Фиг. 10. Влияние токсичных примесей в реагентах на скорость реакции.

добавляется вместе с ферментом, то концентрации ингибитора и фермента увеличиваются одновременно; в результате активность, наблюдаемая при высоких концентрациях фермента, оказывается ниже той, которой следовало бы ожидать, исходя из линейной зависимости. Иначе говоря, так как



Фиг. 11. Влияние ингибитора, присутствующего в препарате фермента, на скорость реакции [2808].

Фермент — арилсульфатаза (3.1.6.1). Ферментный препарат — неочищенный экстракт печени. *I* — недиализованный экстракт; *II* — диализованный экстракт.

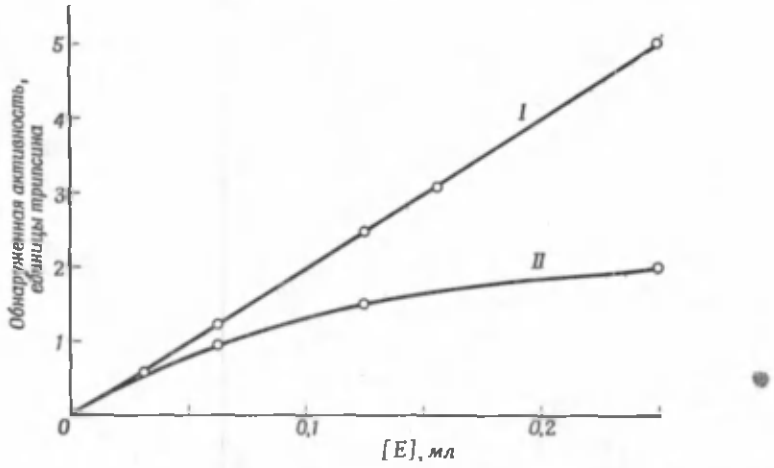
в левой части уравнения (IV.2) находятся две молекулы, а в правой части — только одна, то увеличение общей концентрации будет благоприятствовать реакции соединения и, следовательно, при высоких концентрациях в неактивной форме будет находиться большая часть фермента.

Два примера такого рода приведены на фиг. 11 и 12. Кривая *I* на фиг. 11 показывает скорость гидролиза *n*-нитрофенилсульфата недиализованным экстрактом печени крысы при различных концентрациях фермента. Кривая *II* получена для того же препарата, подвергнутого тщательному диализу. Отсутствие линейной зависимости 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* [2808].

Фиг. 12 изображает данные для модельной системы, в которой ингибитор специально добавляли к препарату фермента [1996]. Кривая *I* была получена в опытах с раствором чистого трипсина (3.4.4.4), а кривая *II* — с раствором трипсина, к которому добавили ингибитор. Вообще если кривая зависимости между скоростью реакции и концентрацией фермента изгибается подобно кривой *II* на фиг. 12, то можно предполагать присутствие диссоциирующего ингибитора и следует попытаться удалить этот ингибитор диализом или каким-либо другим способом.

6. Неоднократно отмечалось, что действие протеиназ характеризуется нелинейной зависимостью между скоростью реакции и концентрацией фер-



Фиг. 12. Влияние добавления ингибитора к препарату фермента на скорость реакции [1996].

Фермент — трипсин (3.4.4.4). *I* — чистый трипсин; *II* — трипсин + ингибитор.

мента; обычно получают кривые с небольшой вогнутостью, обращенной вниз (*вогнутые* кривые). Были сделаны многочисленные попытки найти эмпирические уравнения, описывающие такие кривые. Некоторые из этих уравнений были даже удостоены наименования «законов», но тем не менее они применимы только к ограниченному числу случаев. Наиболее известен так называемый «закон Шютца» [2345] (см. также [2346]), согласно которому скорость реакции пропорциональна корню квадратному из концентрации фермента

$$v = k\,[\mathrm{E}]^{1/2}. \qquad \text{(IV.3)}$$

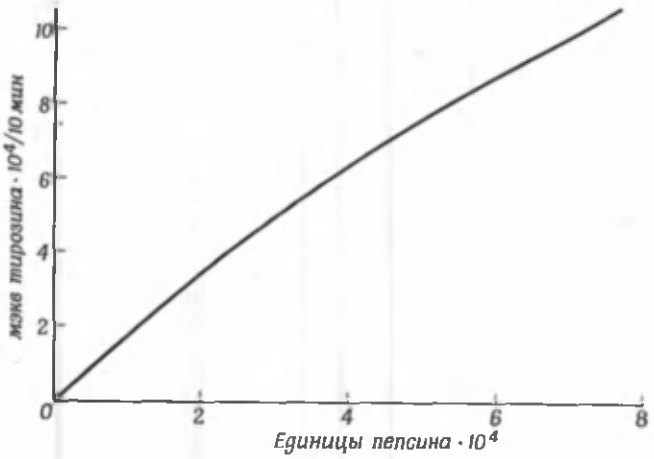
Этот закон был впервые выведен для пепсина (3.4.4.1) (следует отметить, что он приложим только к действию неочищенных препаратов фермента). Действие некоторых других протеиназ в определенных ограниченных условиях также приближенно следует подобному уравнению. Чаще всего, однако, результаты опытов не удовлетворяют такому простому уравнению, и величины протеолитической активности приходится определять эмпирически по экспериментальным кривым. Ряд кривых подобного рода был получен Энсоном [78]. Одна из них приведена в качестве примера на фиг. 13.

Особые результаты, получавшиеся иногда при работе с протеиназами, могут, вероятно, иметь одно из следующих объяснений.

А. Препараты фермента могут содержать ингибиторы. В этом случае результаты будут такими же, как те, которые мы описывали выше, в п. 5.

Неочищенные препараты пепсина, с которыми работал Шютц, должны были, например, содержать заметные количества диссоциирующего ингибитора пепсина, освобождаемого в процессе активации пепсиногена [1081] [1]. Это могло бы объяснить, почему кривая на фиг. 13, полученная с чистым пепсином, значительно лучше описывается уравнением (IV.1), нежели уравнением (IV.3); однако ясно, что такое объяснение отсутствия линейности нельзя считать исчерпывающим.

Б. Большинство отклонений наблюдалось лишь в тех случаях, когда субстратами протеиназ служили белки. При использовании в качестве субстратов для тех же ферментов не белков, а простых пептидов, наблюдалась



Фиг. 13. Нелинейная зависимость между скоростью реакции, катализируемой протеиназой, и концентрацией фермента [78].
Стандартная калибровочная кривая для пепсина (3.4.4.1), действующего на гемоглобин.

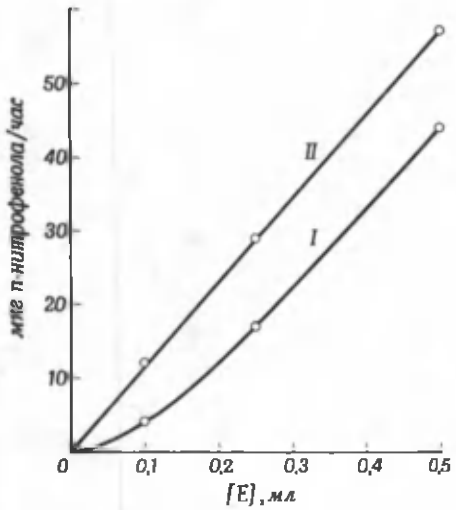
строгая линейная зависимость. Много примеров такого рода было получено Бергманом и его сотрудниками в опытах с синтетическими пептидами [1215]. Гидролиз белка представляет собой одновременное или последовательное расщепление многих различных пептидных связей, и кинетика этих процессов чрезвычайно сложна. Высказывалось также мнение, что для субстратов с большим молекулярным весом, подобных белкам, картина гидролиза может осложняться в результате действия фактора времени, необходимого для диффузии субстрата к молекулам фермента.

В. Сам метод определения активности может явиться причиной отсутствия линейности. Так, многие принятые методы основываются на определении суммарного количества всех тех продуктов гидролиза белка, которые не осаждаются трихлоруксусной кислотой или другими аналогичными реагентами. «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» [1215].

Г. Если ферментативная активность измеряется количеством продукта, образовавшегося за известный промежуток времени, без определения начальной скорости реакции, то не исключено, что причиной отсутствия линейности являются продукты реакции, оказывающие ингибирующее действие, как это показал для пепсина Нортроп [1989].

[1] По имеющимся данным, ингибитор пепсина, образующийся при активации пепсиногена, проявляет свое действие при pH $> 5{,}0$.— *Прим. перев.*

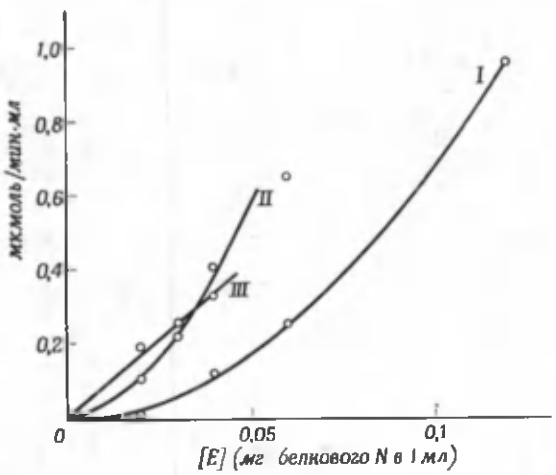
Д. Если препарат фермента содержит диссоциирующий активатор или кофермент, то будет наблюдаться результат, противоположный тому, который был описан в п. 5. По мере увеличения концентрации препарата фермента доля фермента, находящегося в активированной форме, будет все



Фиг. 14. Влияние активатора, присутствующего в препарате фермента, на скорость реакции [2808].

Фермент — арилсульфатаза (3.1.6.1). *I* — частично очищенная арилсульфатаза после диализа против NaCl; *II* — то же в присутствии активатора (0,05 *M* NaCl).

возрастать, и график зависимости скорости реакции от концентрации будет представлять собой *выпуклую* кривую, т. е. кривую, обращенную вогнутостью вверх. Следует ожидать, что при большом разведении скорость



Фиг. 15. Влияние активатора [1215].

Гидролиз бензоиларгининамида фицином (3.4.4.12). *I* — активатор не добавлен; *II* — активирование цианидом; *III* — активирование тиогликолатом.

реакции будет пропорциональна квадрату концентрации фермента, а при высоких концентрациях, когда фермент насыщен активатором, она будет пропорциональна первой степени концентрации фермента. Подобный эффект изображен на фиг. 14. На этой фигуре кривая *I* показывает активность частично очищенной арилсульфатазы (3.1.6.1), которая была диализована

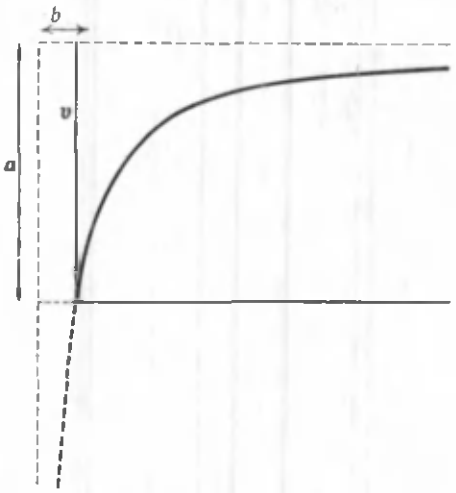
против раствора хлористого натрия. В действительности фермент активируется ионами хлора, и если активность определять при постоянной и оптимальной концентрации ионов хлора, то график будет представлять собой прямую (фиг. 14, *II*) [2808, 2809]. Сходные кривые были получены [1215] для ряда протеиназ, нуждающихся в активаторе (фиг. 15); 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 выпуклые кривые. При активации тиогликолатом концентрация тиоловых групп не изменяется с изменением концентрации фермента и зависимость бывает почти линейной.

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

Теория Михаэлиса

Концентрация субстрата — один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативных реакций. Почти во всех случаях график



Фиг. 16. Типичная кривая зависимости между скоростью реакции и концентрацией субстрата, имеющая форму гиперболы.

зависимости между начальной скоростью и концентрацией субстрата представляет собой часть равнобочной гиперболы, как показано на фиг. 16. Соответствующее уравнение имеет следующий вид:

$$(a - v)(b + s) = \text{const} \qquad \text{(IV.4)}$$

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

Подобный результат получается всякий раз, когда процесс зависит от простой диссоциации. Если процесс диссоциации $XY \rightleftharpoons X + Y$ происходит при постоянной [Y], то кривая зависимости [XY] от [X] бывает подобна кривой, изображенной на фиг. 16.

Теория, основывающаяся на диссоциации такого типа, была выдвинута в 1913 г. Михаэлисом и Ментен [1815]. Эта теория послужила основой

для большинства работ по кинетике действия ферментов. Она исходит из ранее высказанного предположения Анри [1065], который считал, что фермент вначале образует комплекс со своим субстратом, а затем этот комплекс распадается с освобождением свободного фермента и продуктов реакции. Рассмотрим ферментативный процесс, идущий в две стадии:

$$E + S \rightleftarrows ES, \tag{IV.5}$$

$$ES\ (+ \textit{какой-либо второй реагент}) \longrightarrow E + \textit{Продукты реакции}, \tag{IV.6}$$

и обозначим концентрацию свободного субстрата через s (ее можно принять равной общей концентрации субстрата, если количество фермента относительно невелико, как это обычно и бывает), *общую* концентрацию фермента через e и концентрацию фермент-субстратного комплекса через p. Тогда, принимая во внимание, что концентрация *свободного* фермента будет равна $(e - p)$, мы можем написать

$$K_s = \frac{(e-p)\,s}{p}, \tag{IV.7}$$

где K_s — константа равновесия диссоциации ES на E и S, соответствующая субстратной константе, которую мы рассматривали в гл. II. Это уравнение приложимо к условиям равновесия, при которых игнорируется всякое влияние реакции (IV.6) на равновесие в реакции (IV.5).

Если равновесие (IV.5) не достигается столь быстро, чтобы комплекс ES все время находился в равновесии с E и S во время действия фермента, то величина p будет меньшей, чем это следует из уравнения (IV.7); но в данный момент мы можем предположить, как это и сделал Михаэлис, что эту величину можно определить путем соответствующего преобразования уравнения (IV.7), а именно

$$p = \frac{es}{K_s + s}. \tag{IV.8}$$

Скорость ферментативной реакции определяется скоростью распада комплекса в соответствии с уравнением (IV.6)

$$v = kp, \tag{IV.9}$$

где k — константа скорости распада ES. Если в реакции участвует второй реагент, то его концентрация входит в величину k. Подставляя в уравнение (IV.9) значение p из уравнения (IV.8), получаем

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s}{s}}. \tag{IV.10}$$

Если s становится большим по сравнению с K_s, то v будет равно ke; можно обозначить эту максимальную скорость, полученную в условиях насыщения фермента субстратом, через V, так что

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{s}}. \tag{IV.11}$$

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

$$(V - v)(K_s + s) = VK_s, \tag{IV.12}$$

которое имеет такую же форму, как и уравнение (IV.4). Можно отметить, что когда s равно K_s, то v будет равно $V/2$. Величина s, при которой в эксперименте наблюдается скорость, равная половине максимальной (*константа Михаэлиса*), обычно обозначается через K_m, так что в рассмат-

риваемых условиях $K_m = K_s$. Это равенство оказывается справедливым, если выполняется предположение, сделанное при выводе уравнения (IV.8), а именно что ES, E и S находятся в равновесии. Между тем дело не всегда обстоит именно так. Обоснованность этого допущения в отдельных случаях и соответствующие значения K_m рассматриваются ниже в этой главе (см. стр. 86).

Уравнение (IV.11) упрощается в двух крайних случаях: если s велико, то $v = V$; если же s очень мало, то

$$v = \frac{V}{K_s} s.$$

Хотя допущения, сделанные при выводе уравнения Михаэлиса, приводят к результату, который удовлетворяет экспериментальным данным, это еще не доказывает их правильности, ибо многие другие допущения приводят к тем же результатам; в частности, можно указать на такие механизмы, как адсорбция по изотерме Ленгмюра [1515] 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 имеет один и тот же 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:

$$\sigma = \frac{s}{K_m}, \qquad \text{(IV.13)}$$

и, кроме того, ввести понятие *относительной скорости*

$$\varphi = \frac{v}{V}, \qquad \text{(IV.14)}$$

то уравнение Михаэлиса можно написать в форме

$$\varphi = \frac{\sigma}{1+\sigma}. \qquad \text{(IV.15)}$$

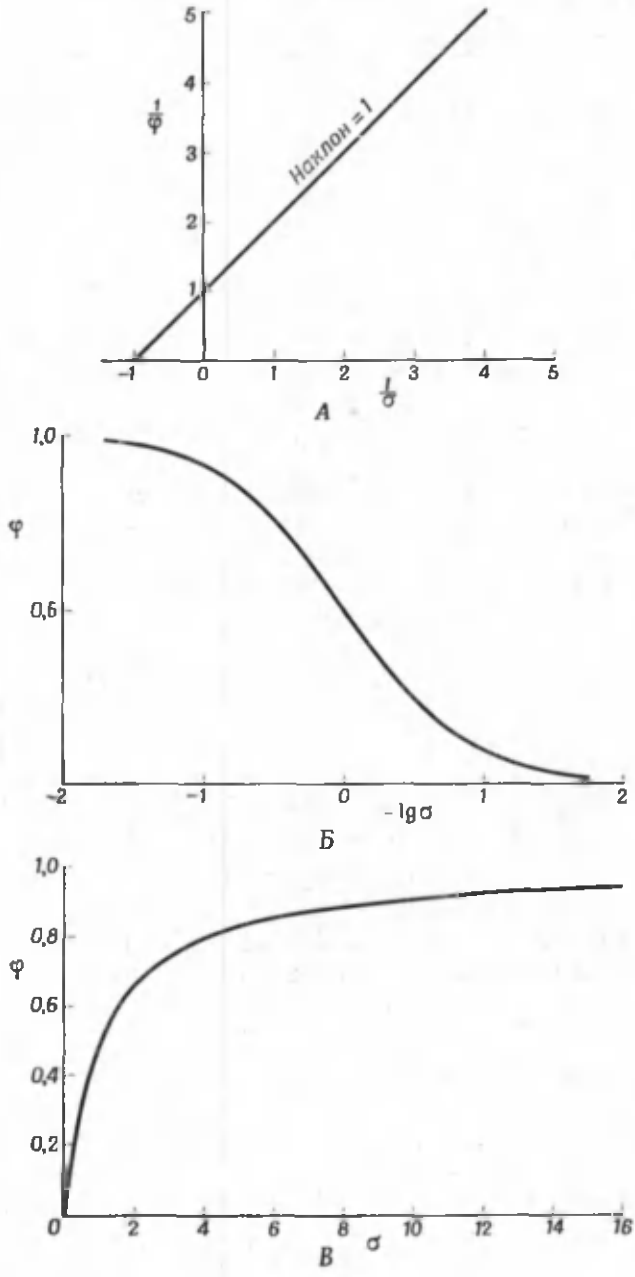
При графическом изображении последнего уравнения получают приведенные на фиг. 17 *нормированные кривые*, которые могут быть применены для анализа действия любого фермента.

Из уравнения (IV.15) следует, что если концентрация субстрата высока, то $\varphi = 1$, если же она очень мала, то $\varphi = \sigma$.

Для любого данного фермента график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата определяется двумя величинами, а именно V и K_m.

Из приведенного выше простого вывода уравнения Михаэлиса видно, что если K_m (в данном случае принимаемая равной K_s) есть константа равновесия реакции (IV.5), то V — константа скорости распада фермент-субстратного комплекса. Таким образом, эти две величины относятся соответственно к двум постулированным выше стадиям ферментативной реакции. Следует отметить, что в рассматриваемых условиях K_m — величина, обратная величине сродства фермента к субстрату.

Важно понять, что факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций, могут осуществлять свое действие двумя различными путями — либо путем влияния на образование фермент-субстратного комплекса, либо путем влияния на его распад (или же на оба эти процесса одновременно). Определение K_m и V позволяет изучать эти два пути влияния раздельно; K_m зависит от образования комплекса, тогда как V служит мерой скорости его распада.



Фиг. 17. Нормированные кривые зависимости между скоростью реакции и концентрацией субстрата.

Объяснение см. в тексте.

Определение V и K_m

Для определения V и K_m по данным ряда измерений скорости при различных концентрациях субстрата график уравнения Михаэлиса (IV.11) может быть построен несколькими путями.

1. Если построить график зависимости v от s, как это сделано на фиг. 18, *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. Различные ферменты характеризуются, естественно, различными кривыми в зависимости от величин V и K_m.

2. Второй метод графического изображения представлен на фиг. 18, *Б*, на которой изображена 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

$$pS = pK_m + \lg \frac{V - v}{v}. \qquad \text{(IV.16)}$$

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 Бэрку [1] [1596], обходит упомянутое выше затруднение. Если построить график зависимости $1/v$ от $1/s$, как это представлено на фиг. 18, *В*, т. е. воспользоваться *методом двойных обратных величин*, то он будет представлять собой прямую, описываемую уравнением

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V} \qquad \text{(IV.17)}$$

и пересекающую ось абсцисс в точке $-1/K_m$. Это легко показать, если подставить $1/v = 0$ в уравнение (IV.17); 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.

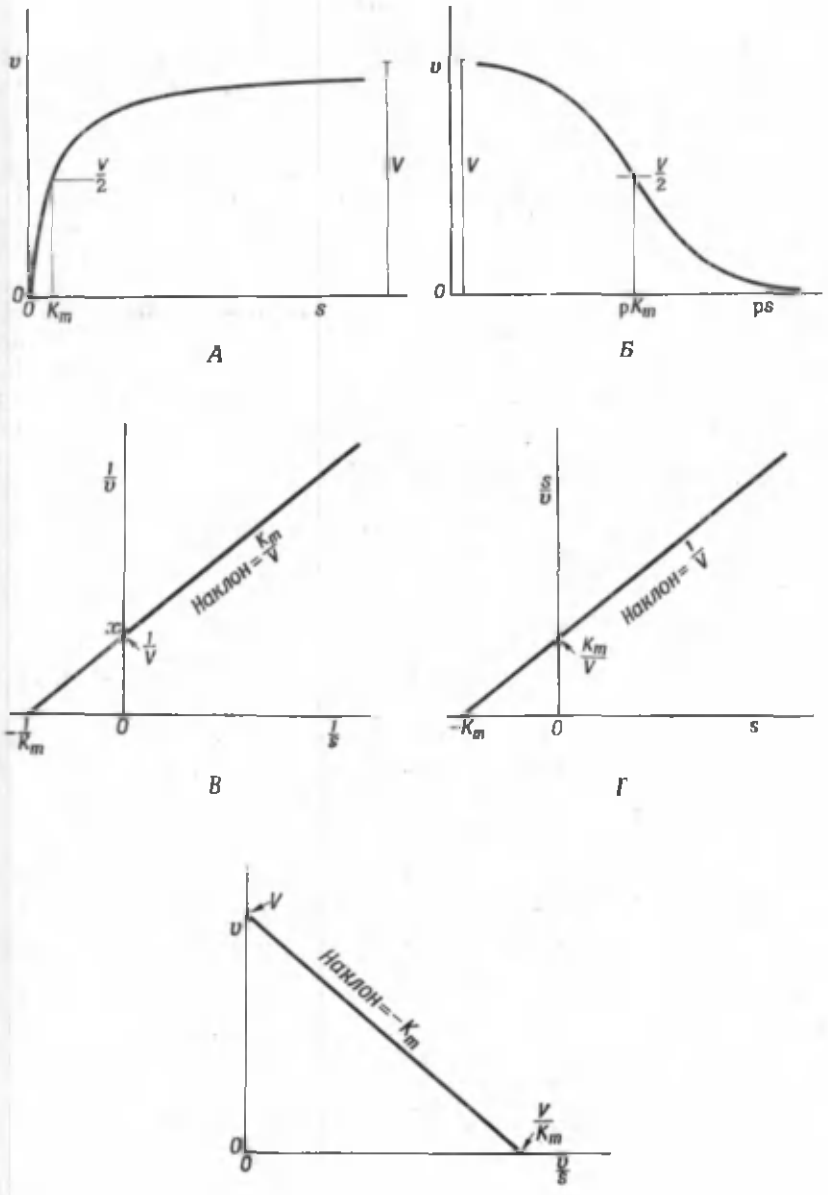
4. Четвертый метод, с помощью которого получают прямую, довольно сходную с той, какую дает предыдущий метод, состоит в построении графика зависимости s/v от s в соответствии с уравнением, полученным [996] в результате умножения обеих частей уравнения (IV.17) на s

$$\frac{s}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V} \cdot s. \qquad \text{(IV.18)}$$

В этом случае наклон равен $1/V$ и отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен K_m/V, как это показано на фиг. 18, *Г*. Величину $-K_m$ получают путем продолжения прямой до пересечения с осью абсцисс.

5. Метод, впервые предложенный Вулфом [2914] и усиленно поддержанный Хофсти [1125], иллюстрирует фиг. 18, *Д*. В этом случае строят

[1] Этот метод графического изображения был первоначально предложен Вулфом [2914] (цит. Холдейном и Стерном в 1932 г., т. е. за 2 года до появления в печати работы Лайнуивера и Бэрка). Вулф также использовал величины отрезков, отсекаемых приведенными прямыми на осях координат.



Фиг. 18.

А — Д. Пять способов графического определения величин K_m и V по влиянию концентрации субстрата на скорость реакции.

график зависимости v от v/s по уравнению

$$v = V - K_m \frac{v}{s}, \qquad \text{(IV.19)}$$

которое представляет собой другую форму уравнения (IV.11). Величину K_m получают путем деления величины отрезка, отсекаемого на оси ординат, на величину отрезка, отсекаемого на оси абсцисс.

Наиболее широко используемый прием графического построения — это *метод двойных обратных величин* (метод 3). Высказывались соображения [1125], что метод 5 лучше, однако авторы [633] критиковали эту точку зрения. Основное возражение против метода 3 сводится к тому, что при откладывании на графике значений, характеризующих скорость реакции в условиях равномерно возрастающей концентрации субстрата, соответствующие точки группируются в левой части графика, тогда как при построении по методу 5 они распределяются более равномерно. Мы не считаем этот аргумент убедительным, поскольку можно, если только это окажется целесообразным, провести опыты при концентрациях, характеризующихся равным инкрементом pS, а не s (например, при концентрациях, находящихся в отношении 1, 2, 4, 8 . . .). В этом случае и на графике, построенном по методу двойных обратных величин, распределение точек будет более равномерным. Кроме того, данный аргумент неубедителен еще и потому, что положение прямой линии более точно определяется теми точками, которые находятся около ее концов, а не теми, которые располагаются ближе к центру. При построении графика зависимости v от v/s отсутствует шкала концентрации субстрата и точки трудно идентифицировать. Более того, ошибка в величине v будет приводить к «косому» смещению соответствующей точки. В силу всех высказанных соображений мы предпочитаем метод двойных обратных величин.

Был опубликован также и статистический метод [2865] для определения величин K_m и V по экспериментальным данным; мы, однако, полагаем, что приведенные выше графические методы применимы почти во всех возможных случаях.

Реакции с участием двух субстратов

Подавляющее большинство ферментативных реакций протекает по типу

$$A + B = C + D, \qquad \text{(IV.20)}$$

т. е. в реакцию вовлекаются две молекулы субстрата. Классическая теория, развитая в предыдущем разделе, рассматривала влияние на скорость реакции концентрации только одного субстрата; поэтому она приложима только к сравнительно необычным случаям, а именно к тем, где в реакцию вступает одиночная молекула субстрата. Дальнейшее свое развитие с рассмотрением случая, когда в соединение с ферментом вступают молекулы A и B (уравнение IV.20), теория получила в работах Холдейна [979] (см. также [2466]).

Исходя из наличия четырех равновесных реакций

$$E + A \rightleftarrows EA, \qquad \text{(IV.21)}$$

$$E + B \rightleftarrows EB, \qquad \text{(IV.22)}$$

$$EA + B \rightleftarrows EAB, \qquad \text{(IV.23)}$$

$$EB + A \rightleftarrows EAB, \qquad \text{(IV.24)}$$

получаем четыре соответствующих уравнения:

$$(e - p_a - p_b - p)\, a = K_a p_a, \qquad \text{(IV.25)}$$

$$(e - p_a - p_b - p)\, b = K_b p_b, \qquad \text{(IV.26)}$$

$$p_a b = K'_b p, \qquad \text{(IV.27)}$$

$$p_b a = K'_a p, \qquad \text{(IV.28)}$$

где a, b, p, p_a, p_b — концентрации соответственно A, B, EAB, EA и EB; K_a, K_b, K'_a, K'_b — соответствующие константы диссоциации четырех равновесных реакций. Скорость общей реакции пропорциональна концентрации EAB. Таким образом,

$$v = kp. \tag{IV.29}$$

Исключая член p из приведенных выше уравнений, получаем

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K'_a}{a} + \frac{K'_b}{b} + \frac{K_a K'_b}{ab}}. \tag{IV.30}$$

Это уравнение содержит только три из четырех констант равновесия; оно может быть выражено с помощью любых трех констант. Четвертая оказывается «излишней», так как между нею и остальными тремя константами существует зависимость

$$K_a K'_b = K'_a K_b. \tag{IV.31}$$

При выводе уравнения (IV.30) не было сделано оговорок о влиянии, которое может оказать взаимодействие фермента с одним из субстратов на взаимодействие его с другим субстратом.

Для какой-либо постоянной концентрации субстрата B зависимость скорости реакции от изменения концентрации субстрата A выражается кривой, принадлежащей к тому же типу, что и кривая Михаэлиса, и описываемой уравнением

$$v = \frac{\frac{keb}{K'_b + b}}{1 + \frac{1}{a}\,\frac{K_a K'_b + K'_a b}{K'_b + b}}, \tag{IV.32}$$

в котором величина кажущегося сродства фермента к A *зависит от концентрации* B. Это уравнение приводится к простым приближенным уравнениям в двух крайних случаях — когда концентрация B становится очень большой или очень малой по сравнению с K'_b:

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K'_a}{a}} \tag{IV.33}$$

или соответственно

$$v = \frac{\frac{keb}{K'_b}}{1 + \frac{K_a}{a}}. \tag{IV.34}$$

Таким образом, в первом случае $K_m = K'_a$ и во втором случае $K_m = K_a$, так что можно определить обе эти константы. При постоянной концентрации субстрата A и изменяющейся концентрации субстрата B можно определить две другие константы.

K'_a и K'_b можно быстро определить с помощью следующего графического метода [753]. Строя *график зависимости* $1/v$ *от* $1/b$ *при постоянном* a, получают прямую, пересекающую ось ординат в точке $1/V_a = \{1 + (K'_a/a)\}/ke$. Затем строят график зависимости $1/V_a$ от $1/a$ при различных значениях a. В результате получают прямую, которая пересекает ось абсцисс в точке $-1/K'_a$. Аналогичным путем, строя график зависимости $1/v$ от $1/a$ при различных значениях b, а затем строя новый график зависимости между соответствующими точками пересечения с осью ординат и $1/b$, получают прямую.

пересекающую ось абсцисс в точке $-1/K'_b$. Прямые, описывающие зависимость $1/v$ от $1/b$ для ряда различных значений a, пересекаются в точке $1/b = -1/K_b$; прямые, описывающие зависимость $1/v$ от $1/a$ для ряда различных значений b, пересекаются в точке $1/a = -1/K_a$.

Таким путем могут быть быстро определены все четыре константы. Этот метод был использован Дальцилем [534] (см. фиг. 33).

Если каждый из субстратов соединяется только с определенным специфическим участком на поверхности фермента и не оказывает влияния на сродство фермента к другому субстрату, тогда $K_a = K'_a$ и $K_b = K'_b$. Уравнение (IV.30) в этом случае упрощается:

$$v = \frac{ke\,\frac{ab}{K_a K_b}}{\left(1+\frac{a}{K_a}\right)\left(1+\frac{b}{K_b}\right)}. \qquad \text{(IV.35)}$$

Используя величины относительных концентраций в соответствии с данным выше определением (уравнение IV.13) и полагая $\alpha = \frac{a}{K_a}$ и $\beta = \frac{b}{K_b}$, имеем

$$\varphi = \frac{\alpha}{1+\alpha}\cdot\frac{\beta}{1+\beta}. \qquad \text{(IV.36)}$$

При сравнении этого уравнения с (IV.15) видно, что оно является произведением двух функций Михаэлиса, каждая из которых относится к одному из субстратов. Так как в этом случае сродство к ферменту каждого из субстратов не зависит от соединения фермента с другим субстратом, то истинные значения констант Михаэлиса могут быть определены путем изменения концентрации одного из субстратов при фиксированной концентрации другого.

Если фермент катализирует реакцию между двумя идентичными молекулами, характеризующимися, следовательно, одной и той же величиной сродства, то $\alpha = \beta = \sigma$ и

$$\varphi = \frac{\sigma^2}{(1+\sigma)^2} \qquad \text{(IV.37)}$$

или

$$\frac{1}{\varphi} = 1 + \frac{2}{\sigma} + \frac{1}{\sigma^2}. \qquad \text{(IV.38)}$$

Откладывая на осях координат значения $\frac{1}{\varphi}$ и $\frac{1}{\sigma}$, получают выпуклую кривую, подобную кривой *II* на фиг. 26 (характеризующей тот случай, когда субстрат является также и активатором). Касательная к кривой, проведенная в точке пересечения этой кривой с осью ординат, пересекает ось абсцисс в точке $-\frac{1}{2K_s}$. Это означает, что величина кажущейся константы Михаэлиса в 2 раза больше величины константы Михаэлиса, определенной в отдельности для каждого из тех участков фермента, которые взаимодействуют с субстратом.

Можно представить себе, что реакция между двумя субстратами протекает таким образом, что один из них не вступает в прямое взаимодействие с ферментом, а участвует только в бимолекулярной реакции с комплексом фермента и другого вещества. В этом случае

$$E + A = EA, \qquad \text{(IV.39)}$$

$$EA + B = E + C + D \qquad \text{(IV.40)}$$

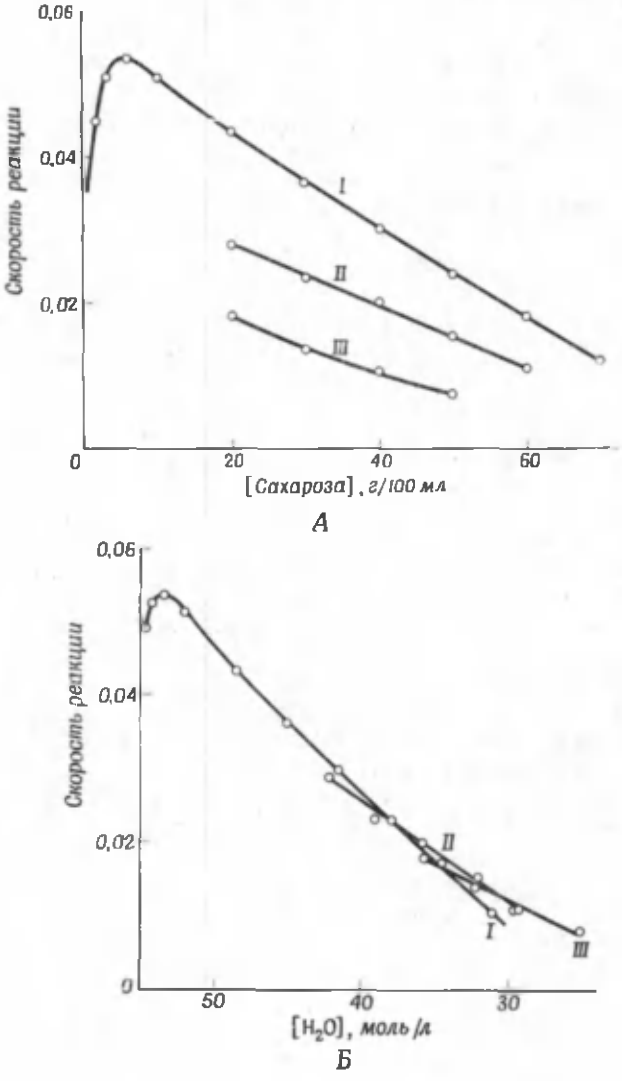
и уравнение (IV.9) должно быть заменено уравнением

$$v = k'bp_a, \qquad \text{(IV.41)}$$

где k' — константа скорости на этот раз бимолекулярной реакции, а p_a, как и раньше, — концентрация ЕА. Уравнение (IV.36) в этом случае заменяется уравнением

$$\varphi = \frac{a}{1+a} \cdot b. \qquad \text{(IV.42)}$$

Отсюда следует, что при увеличении концентрации субстрата А скорость реакции увеличивается до определенного предела, а при увеличении концентрации субстрата В она возрастает линейно. Это, однако, справедливо только



Фиг. 19. Гидролитическое действие дрожжевой β-фруктофуранозидазы (3.2.1.26) в условиях высокой концентрации сахарозы — влияние уменьшения концентрации воды [1937].

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.

в том случае, если K_a действительно представляет собой константу диссоциации реакции (IV.39). Рассмотрение случаев, когда K_a имеет более сложное кинетическое значение, приведено ниже (см. стр. 88).

Действие многих ферментов переноса, например креатинкиназы (2.7.3.2) [1480], может служить примером механизма, представленного уравнениями (IV.21)—(IV.24); константы Михаэлиса были определены для обоих реагентов. Действие пероксидазы (1.11.1.7) [418] служит примером механизма, характеризуемого уравнениями (IV.39) и (IV.40); константа Михаэлиса была определена для перекиси водорода, но скорость реакции в этом случае пропорциональна концентрации донора водорода.

В реакциях, катализируемых гидролитическими ферментами, также участвует второе вещество, а именно вода. В большинстве случаев не представляется возможным определить влияние даже значительного изменения концентрации воды, но, например, для дрожжевой β-фруктофуранозидазы (3.2.1.26) уменьшение скорости реакции при очень высоких концентрациях сахарозы было приписано уменьшению концентрации воды [1937]. Показано, что в широком диапазоне скорость реакции является функцией концентрации воды независимо от того, вызывалось ли уменьшение концентрации воды добавлением сахарозы или добавлением спирта (фиг. 19). В то же время следует отметить, что в ходе этих опытов имели место некоторые осложнения, поскольку в присутствии спирта фермент наряду с гидролизом катализировал также трансфруктозилирование на спирт и это могло приводить к кажущемуся уменьшению скорости гидролиза [126]; однако торможение скорости реакции высокими концентрациями сахарозы не может быть объяснено переносом фруктозильной группы на сахарозу [125].

Торможение высокими концентрациями субстрата

Довольно часто наблюдается, что реакция подчиняется закону Михаэлиса при низких концентрациях субстрата, но при высоких концентрациях субстрата скорость реакции начинает падать. Подобное явление может быть следствием различных причин.

1. Изучение специфичности ферментов дает основание предполагать, что многие ферменты имеют несколько химических групп (не менее двух, а может быть, и больше), каждая из которых соединяется с определенной частью молекулы субстрата. В эффективном фермент-субстратном комплексе молекула субстрата соединена со всеми этими группами; однако можно представить себе образование неэффективного комплекса, в котором молекула субстрата может соединяться только с одной из таких групп, поскольку другие группы уже соединены с другими молекулами субстрата. 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, которую, по существу, следует рассматривать как случай конкурентного торможения, вызываемого самим субстратом (ср. стр. 283), была проанализирована теоретически Холдейном [979, стр. 84].

Реакции могут быть представлены следующим образом:

$$E + S \rightleftarrows ES, \qquad (IV.43)$$

$$ES + S \rightleftarrows ES_2, \qquad (IV.44)$$

$$ES \rightleftarrows E + \text{Продукты}. \qquad (IV.45)$$

Соответствующие уравнения для равновесия будут иметь вид

$$(e - p - q)\, s = K_s p, \qquad (IV.46)$$

$$ps = K'_s q, \qquad (IV.47)$$

где q — концентрация комплекса ES_2; K'_s — его константа диссоциации, т. е. константа равновесия реакции (IV.44). Из этих уравнений, принимая,

что скорость реакции пропорциональна p, получаем

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s}{s} + \frac{s}{K'_s}} . \qquad (IV.48)$$

Используя еще раз относительные концентрации и введя для удобства *относительную константу торможения* (r), определяемую выражением

$$r = \frac{K'_s}{K_s} , \qquad (IV.49)$$

получаем

$$\varphi = \frac{1}{1 + \frac{1}{\sigma} + \frac{\sigma}{r}} . \qquad (IV.50)$$

На фиг. 20 это стандартное уравнение представлено графически различными способами, причем величина r произвольно принята равной 100, что согласуется, однако, с экспериментально найденной величиной r при действии печеночной карбоксилэстеразы (3.1.1.1) на этиловый эфир миндальной кислоты [150].

Необходимо отметить, что, хотя величины K_s существенно отличаются друг от друга, определяемая максимальная величина φ значительно меньше 1; другими словами, v начинает уменьшаться, так и не достигнув V. Следовательно, попытки рассчитать K_s по графику фиг. 20, *А* или фиг. 20, *Б* дали бы ошибочные результаты, если принять экспериментально определяемую максимальную скорость за V. График, в котором по обеим осям отложены обратные величины (фиг. 20, *В*), позволяет избежать этой ошибки, так как на этом графике удачно используются данные для низких концентраций субстрата; в результате этого большая часть кривой находится в области, в которой соблюдается закон Михаэлиса. Истинная величина $1/V$ может быть определена по экспериментальным данным с помощью графика, построенного при откладывании обратных величин, так как этот график пересекает вертикальную ось при $1/\varphi = 1$. Используя это значение V, можно определить величину r по графику *А* или *Б*, как это показано на фиг. 20. Наибольшая относительная скорость $\sqrt{r}/(2 + \sqrt{r})$ получается при концентрации субстрата, равной $\sqrt{(K_s K'_s)}$, что соответствует относительной концентрации, равной $\sqrt{r}$. Логарифмическая кривая (фиг. 20, *Б*) расположена симметрично относительно этой величины. При графическом определении зависимости φ от σ величина r может быть определена непосредственно (как это показано на фиг. 20, *Г*) путем продолжения прямой, полученной при высоких значениях σ, до пересечения с осью абсцисс. Это является следствием того, что при высокой концентрации субстрата величина K_s/s в уравнении (IV.48) становится пренебрежимо малой и основное значение приобретает величина, определяющая торможение. Подставив в уравнение V вместо ke, получим

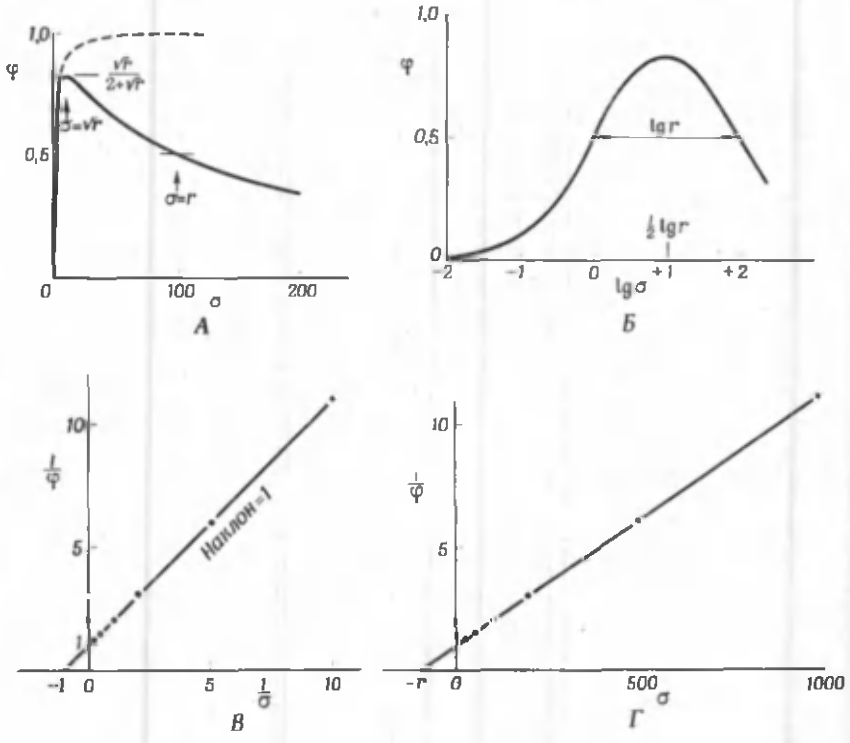
$$v = \frac{VK'_s}{s + K'_s} \qquad (IV.51)$$

или, записав его в виде взаимного уравнения,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{s}{K'_s V} . \qquad (IV.52)$$

На фиг. 21 изображен график зависимости $1/v$ от s для случая действия печеночной карбоксилэстеразы при высоких концентрациях субстрата, рассчитанный по данным Мэррея [1902]. Отрезок, отсекаемый данной прямой на оси абсцисс, дает величину K'_s, равную 0,010 *М*. Величина, рассчитанная Мэрреем по тем же данным, но более трудоемким путем, равна 0,0097 *М*.

В том случае, когда ферментативная реакция является двустадийной (см. стр. 261), 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 тормозить деацилирование. Субстратное торможение ацетилхолинэстеразы обусловлено, по-видимому, подобного рода взаимодействием [1471].



Фиг. 20. Торможение реакции при высокой концентрации субстрата — нормированные кривые, построенные для произвольно выбранной величины $r = K_s'/K_s = 100$ (ср. фиг. 17).

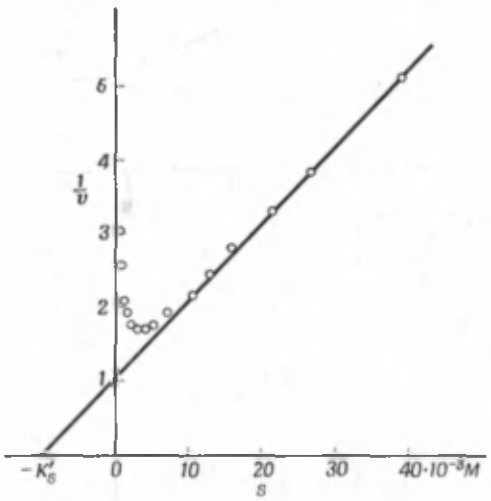
А. Зависимость φ от σ. (Пунктирная линия показывает ход кривой при отсутствии торможения избытком субстрата.) *Б*. Зависимость φ от lg σ. (Следует обратить внимание на то, что при изменении знака левая ветвь кривой соответствует графику на фиг. 17, *Б*. Кривая симметрична относительно величины $\sigma = \sqrt{r}$ и при $\varphi = 0{,}5$ ширина ее максимума 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. фиг. 17, *А*). Небольшой изгиб кривой вверх при малых значениях $1/\sigma$ отражает торможение реакции избытком субстрата.) *Г*. Зависимость $1/\varphi$ от σ. (Точки, лежащие на прямой, соответствуют условиям торможения реакции избытком субстрата; те же точки, которые на фиг. 20, *В* лежат на прямой, теперь расположены на загибающейся вверх части кривой, т. е. при малых значениях σ.)

2. Так как все ферменты действуют в водной среде, то при очень высокой концентрации субстрата будет уменьшаться концентрация воды, что может привести к понижению скорости реакции, особенно в тех случаях, когда вода является одним из реагирующих веществ. Пример влияния такого рода был уже приведен ранее (фиг. 19).

3. На фиг. 22 показана скорость восстановления метиленового синего различными концентрациями гипоксантина в присутствии ксантиноксидазы (1.2.3.2) [630]. Торможение 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 A до B. Это особый случай *конкурентного торможения, при котором один субстрат является конкурентным* ингибитором другого. Аналогичным примером может служить действие полученной из змеиного яда оксидазы L-аминокислот (1.4.3.2) [2411]. В последнее время этот фермент подвергся довольно детальному изучению, причем в качестве субстрата использовался лейцин, а в качестве акцептора водорода — метиленовый синий [629]. На фиг. 23 графически изображена зависимость $1/v$ от концентрации лейцина при различных концентрациях метиленового синего.

При сравнении этого графика с графиком на фиг. 75, A (см. также фиг. 20, $Г$ и фиг. 21) становится очевидным, что лейцин действует как ингибитор, конкурирующий с метиленовым синим. Точка пересечения кривых

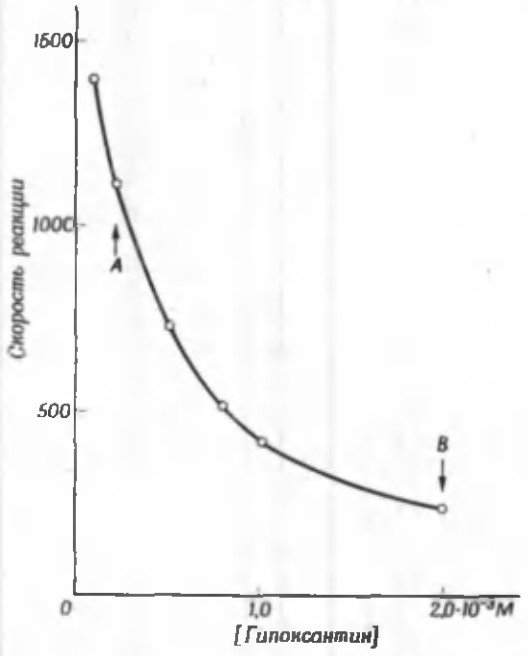


Фиг. 21. *Определение величины K_s' по торможению реакции избытком субстрата* [1902].
Гидролиз этилбутирата алиэстеразой (3.1.1.1) из печени овцы.

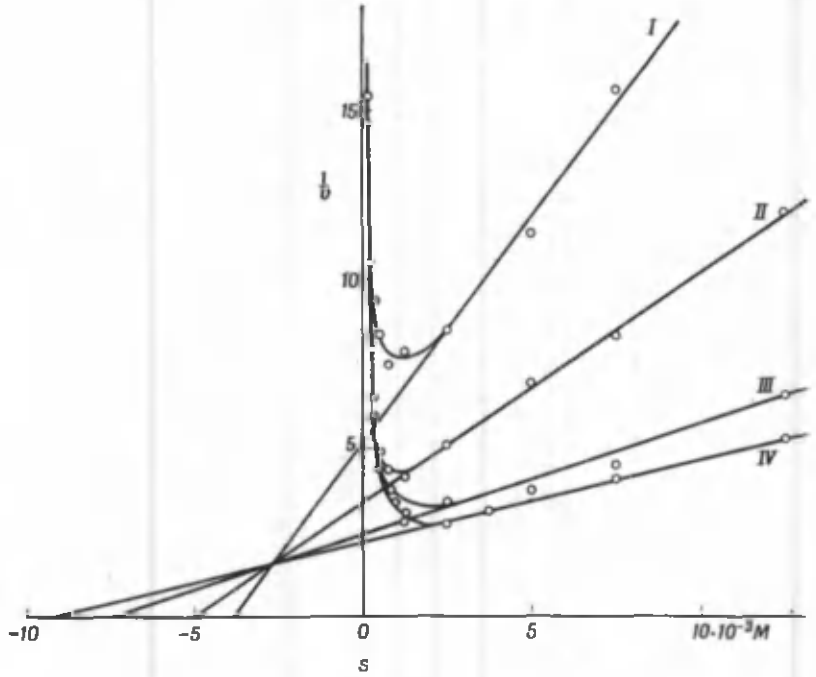
(соответствующая $-K_i$ в случае обычного ингибитора) характеризует величину константы диссоциации субстрата, когда он действует как ингибитор.

4. Случай кажущегося торможения при высокой концентрации субстрата наблюдается при действии неорганической пирофосфатазы (3.6.1.1) [137]. В реакции участвует дополнительный фактор, Mg, который функционирует как необходимый активатор (см. гл. IX). На фиг. 24 показано влияние различных концентраций пирофосфата на величину относительной скорости φ при постоянной концентрации Mg, равной 0,004 M. Концентрации пирофосфата, вызывающие торможение, значительно превышают те, которые необходимы для насыщения фермента субстратом, так что максимальная скорость наблюдается в широком диапазоне концентраций пирофосфата.

Два различных объяснения были предложены для этого случая торможения; оба они исходят из образования комплекса магний — пирофосфат. Первое объяснение [1068] состоит в том, что избыток субстрата связывает магний и таким образом понижает эффективную концентрацию активатора фермента, в результате чего падает скорость реакции; когда же концентрация свободных ионов Mg^{2+} упадет до нуля, фермент становится неактивным. Другое объяснение [275] связано с допущением (в пользу которого говорят

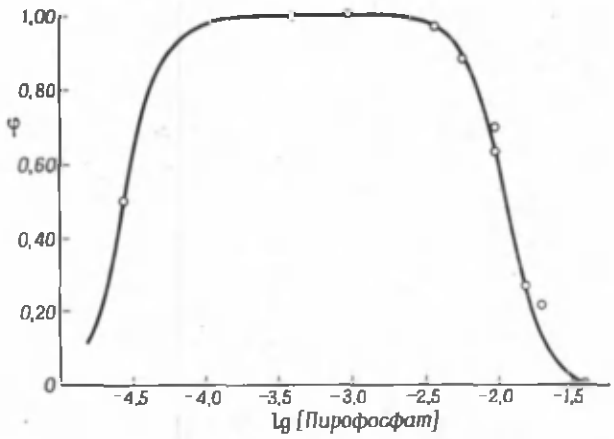


Фиг. 22. Торможение реакции при повышении концентрации субстрата [630].
Фермент — ксантиноксидаза (1.2.3.2).



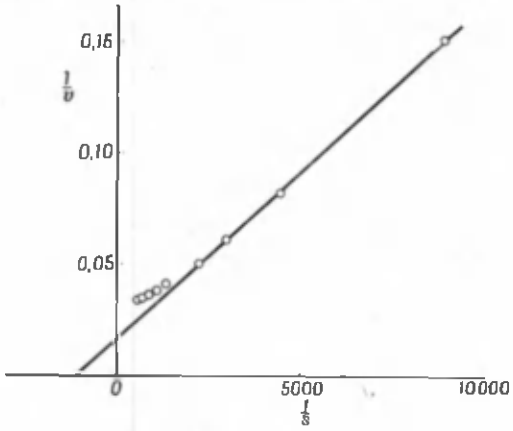
Фиг. 23. Конкурентное торможение избытком субстрата [629].
Окисление лейцина метиленовым синим под действием оксидазы L-аминокислот из змеиного яда (1.4.3.2). Кривые построены для различных концентраций метиленового синего: *I* — $0{,}344 \cdot 10^{-4}$ М; *II* — $0{,}67 \cdot 10^{-4}$ М; *III* — $1{,}34 \cdot 10^{-4}$ М; *IV* — $2{,}67 \cdot 10^{-4}$ М.

некоторые данные), что истинным субстратом фермента служит ион $(MgP_2O_7)^{2-}$, а не свободный пирофосфат. Полагают, что торможение является следствием конкуренции пирофосфата с истинным субстратом. Во всяком случае, рассматриваемое влияние высоких концентраций пирофосфата нельзя считать



Фиг. 24. Зависимость скорости реакции, катализируемой неорганической пирофосфатазой (3.6.1.1), от концентрации субстрата в присутствии 0,004 *М* $MgCl_2$ [137].

истинным торможением, так как если изменять соотношение концентраций Mg и пирофосфата таким образом, чтобы удерживать пирофосфат в форме Mg-комплекса, то торможение оказывается значительно меньшим (фиг. 25). При работе с ферментами, активность которых зависит от активатора, как



Фиг. 25. График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (построенный по методу Лайнуивера — Бэрка) для действия неорганической пирофосфатазы (3.6.1.1) в условиях постоянной величины отношения молярных концентраций $MgCl_2/Na_2P_2O_7 = 3{,}8$ [275].

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 торможение [297].

Субстрат, действующий одновременно как активатор фермента

В предыдущем разделе рассматривались случаи, когда субстрат одновременно действовал как ингибитор. Возможно, что иногда субстрат функционирует и как активатор фермента. Фумаратгидратаза (4.2.1.2), например, активируется анионами [1744], 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 фермента. Массей [1746] предположил, что молекулы субстрата могут соединяться с фумаразой не только в активном центре, но и в других участках.

Последовательность реакций может быть представлена следующим образом:

$$E + S \rightleftarrows ES, \tag{IV.53}$$

$$E + S \rightleftarrows ES_a, \tag{IV.54}$$

$$ES_a + S \rightleftarrows ES_aS. \tag{IV.55}$$

S_a означает в этом случае субстрат, присоединившийся к ферменту как активатор, так что уравнение (IV.54) выражает превращение свободного фермента в активную форму ES_a, а уравнения (IV.53) и (IV.55) отражают присоединение субстрата соответственно к свободному и активированному ферменту. При рассмотрении этого случая предполагается, что активирующая молекула субстрата и молекула, выступающая в роли истинного субстрата, присоединяются к различным участкам фермента, так что они не конкурируют друг с другом.

Соответствующие уравнения для равновесия будут иметь вид

$$(e - p - q - r)\, s = K_s q, \tag{IV.56}$$

$$(e - p - q - r)\, s = K_{sa} r, \tag{IV.57}$$

$$rs = K'_s p, \tag{IV.58}$$

где p, q и r — концентрации ES_aS, ES и ES_a; K_s, K_{sa} и K'_s — соответствующие константы диссоциации, т. е. константы равновесия для реакций (IV.53—55).

Если принять, что комплекс ES совершенно неактивен (хотя возможно, что в некоторых случаях он способен медленно распадаться), то скорость реакции будет пропорциональна p, как и в предыдущих случаях. Отсюда выражение для скорости имеет вид

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K'_s}{s}\left(1 + \frac{K_{sa}}{K_s} + \frac{K_{sa}}{s}\right)} \tag{IV.59}$$

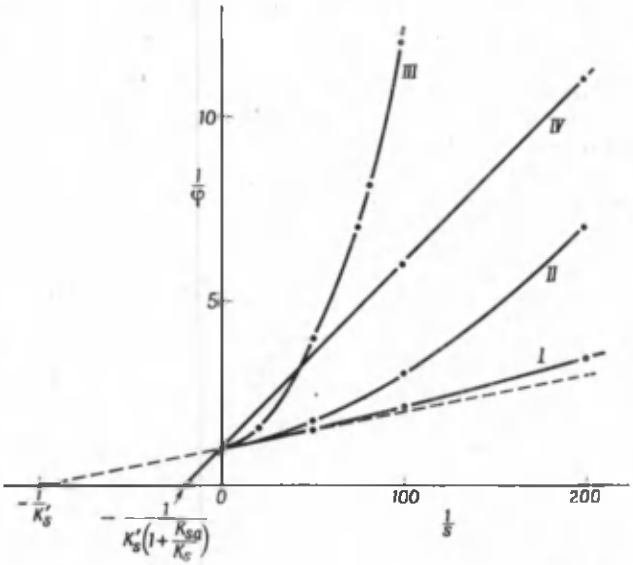
или

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K'_s}{V}\left(1 + \frac{K_{sa}}{K_s}\right)\frac{1}{s} + \frac{K_{sa} \cdot K'_s}{V} \cdot \frac{1}{s^2}. \tag{IV.60}$$

В общем случае это уравнение изображается не прямой, а кривой благодаря члену, содержащему s^2 в знаменателе (как разультат того, что активный комплекс содержит две молекулы субстрата). При высоких концентрациях субстрата последним членом уравнения (IV.60) можно пренебречь, особенно в том случае, когда K_{sa} невелико по сравнению с K'_s. При этих условиях кривая, описываемая данным уравнением, будет приближаться к прямой, положение которой позволяет определить кажущуюся константу Михаэлиса $K'_s \cdot \left(1 + \frac{K_{sa}}{K_s}\right)$. Разница между этой величиной и истинной константой

Михаэлиса будет равна величине члена в скобках, который отражает конкурирующее влияние реакции (IV.53), приводящей в соответствии со сделанным выше допущением к образованию неактивного комплекса.

На фиг. 26 приведено несколько теоретических кривых, построенных в соответствии с этим уравнением; истинная константа Михаэлиса K_s' произвольно выбрана равной 0,01 для всех кривых. На графике видно, что все кривые значительно отклоняются от пунктирной линии, которая построена для данного значения константы Михаэлиса при отсутствии активирующего



Фиг. 26. Влияние субстрата, действующего как активатор.
Приведены теоретические кривые, рассчитанные для комбинаций различных значений констант. Для всех кривых $K_s = 0{,}01$. *I* — $K_s \to \infty$, $K_{sa}=0{,}001$; *II* — $K_s \to \infty$, $K_{sa} = 0{,}01$; *III* — $K_s \to \infty$, $K_{sa} = 0{,}1$; *IV* — $K_s = 0{,}00025$; $K_{sa} = 0{,}001$.

влияния субстрата. Для иллюстрации влияния последнего члена уравнения (IV.60) при построении кривых *I*, *II* и *III* эффект конкуренции исключен путем увеличения K_s до бесконечности; это эквивалентно допущению, что только активный центр формы ES_a способен соединяться с субстратом. Можно показать, что при $1/s = 0$ все кривые имеют тот же самый наклон, что и пунктирная линия, но расходятся, загибаясь вверх в различной степени в зависимости от величины K_{sa}. Если K_{sa} мало по сравнению с K_s' (кривая *I*, для которой $K_{sa}/K_s' = 0{,}1$), то отклонение от прямой сравнительно невелико; в тех же случаях, когда величина K_{sa} возрастает (кривые *II* и *III*, для которых K_{sa}/K_s' равно 1,0 и 10 соответственно), кривизна может становиться столь большой, что определение величины константы Михаэлиса оказывается невозможным.

Влияние члена, характеризующего эффект конкуренции, показано на графике *IV*; при построении этого графика K_{sa} принято равным той же величине, что и при построении кривой *I*, но K_s принято равным 0,00025. Это вызывает заметное торможение, приводящее к увеличению наклона линии, которая, однако, остается прямой. Такую прямую трудно отличить от прямой, полученной обычным методом построения графика для величин, обратных концентрации субстрата и скорости. Однако кажущаяся величина константы Михаэлиса, полученная таким путем, значительно отличается от истинного значения; в данном случае получается величина, в 5 раз превышающая истинную, так как для выбранных данных $1 + \frac{K_{sa}}{K_s} = 5$.

Рассмотренные в этом разделе особенности протекания ферментативных реакций вряд ли широко распространены, так как, по-видимому, только небольшое число ферментов активируется таким путем; действительно, мы не нашли в литературе каких-либо экспериментальных данных, к которым эта количественная теория могла бы быть приложена.

Ферменты, катализирующие одновременно две реакции

Если фермент не обладает абсолютной специфичностью, т. е. если он не действует только на один-единственный субстрат, то мы можем допустить, что такой фермент способен действовать на два одновременно присутствующих различных субстрата. Этот случай не может рассматриваться как осуществление двух независимых параллельных реакций, так как одни и те же активные центры действуют на оба субстрата, и поэтому между субстратами будет иметь место конкуренция.

Для фермента, действующего на два субстрата A и B, имеем

$$E + A \rightleftarrows EA, \tag{IV.61}$$

$$EA \rightarrow E + \text{Продукты}_{(A)}, \tag{IV.62}$$

$$E + B \rightleftarrows EB, \tag{IV.63}$$

$$EB \rightarrow E + \text{Продукты}_{(B)}. \tag{IV.64}$$

Когда рассматривается превращение A, то B ведет себя просто как конкурентный ингибитор, и наоборот. Поэтому скорость превращения A по аналогии с уравнением (VIII.16) (см. ниже) будет выражаться уравнением

$$v_a = \frac{V_a}{1 + \frac{K_a}{a}\left(1 + \frac{b}{K_b}\right)}, \tag{IV.65}$$

а скорость превращения B — уравнением

$$v_b = \frac{V_b}{1 + \frac{K_b}{b}\left(1 + \frac{a}{K_a}\right)}. \tag{IV.66}$$

Сумма скоростей реакций (IV.65) и (IV.66), обозначенная через v_t, будет равна

$$v_t = v_a + v_b = \frac{V_a \frac{a}{K_a} + V_b \frac{b}{K_b}}{1 + \frac{a}{K_a} + \frac{b}{K_b}}. \tag{IV.67}$$

Величина суммарной скорости реакции v_t для смеси, содержащей A и B соответственно в концентрациях a и b, должна находиться между значениями величин скоростей, которые наблюдались бы в опытах с такими же концентрациями субстратов A и B, взятых раздельно. Если для удобства рассмотрения сделать допущение, что константа скорости реакции (IV.62) больше, чем константа скорости реакции (IV.64), то максимальная скорость, достижимая для смеси субстратов A и B, будет V_a. Можно поэтому определить величину относительной скорости φ_t как

$$\varphi_t = \frac{v_t}{V_a}. \tag{IV.68}$$

Тогда уравнение (IV.67) можно представить в виде

$$\varphi_t = \frac{\alpha + R\beta}{1 + \alpha + \beta}, \tag{IV.69}$$

где α и β — относительные концентрации, а R, которое должно быть меньше 1, введено для обозначения отношения V_b/V_a.

Если оба субстрата присутствуют в одной и той же концентрации, т. е. $a = b$, то можно представить себе два случая, имеющих специальный 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 A и B в эквимолярной смеси находим в первом случае путем деления уравнения (IV.65) на уравнение (IV.66), что дает

$$\frac{v_a}{v_b} = \frac{V_a K_b}{V_b K_a}. \qquad \text{(IV.70)}$$

Во втором случае [2646, 2857], считая $a = b = s$ и обозначив скорость реакции в эквимолярной смеси v_M, по уравнению (IV.67) находим

$$v_M = \frac{\frac{V_a}{K_a} + \frac{V_b}{K_b}}{\frac{1}{s} + \frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_b}}. \qquad \text{(IV.71)}$$

Максимальная скорость, достигаемая в эквимолярной смеси, имеет значение

$$V_M = \frac{\frac{V_a}{K_a} + \frac{V_b}{K_b}}{\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_b}}, \qquad \text{(IV.72)}$$

откуда после преобразования получаем

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{V_a - V_M}{V_M - V_b}. \qquad \text{(IV.73)}$$

Таким образом, отношение величин сродства фермента к двум субстратам может быть определено по данным определений скорости в трех случаях, а именно по величинам максимальных скоростей для каждого из субстратов в отдельности и для их эквимолярной смеси. При изучении специфичности действия ферментов необходимо 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 других субстратов может быть рассчитано на основании уравнения (IV.73) по данным измерений скоростей при использовании смеси субстратов. С помощью этого метода [7] была изучена холинэстераза (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, осуществляются ли две рассматриваемые реакции одним и тем же или разными ферментами. В одном из таких случаев скорость гидролиза бензоилхолина препаратом холинэстеразы из сыворотки лошади [2998] выражалась величиной 440 *мкл/час*, скорость гидролиза изоамилацетата — 131 *мкл/час*, а смесь этих двух субстратов гидролизовалась со скоростью 314 *мкл/час*. Если бы гидролиз осуществлялся двумя различными ферментами, то скорость его должна была бы равняться сумме скоростей гидролиза отдельных субстратов, а именно 571 *мкл/час*. 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 концен-

трации α и β этих субстратов (т. е. если известны константы Михаэлиса) [2809]. Если оба субстрата атакуются одним и тем же ферментом, то из уравнения (IV.67)

$$v_t = \frac{V_a\alpha + V_b\beta}{1+\alpha+\beta}\,. \qquad \text{(IV.74)}$$

Когда присутствует только один из субстратов, то

$$v_a = \frac{V_a\alpha}{1+\alpha} \qquad \text{(IV.75)}$$

и

$$v_b = \frac{V_b\beta}{1+\beta}. \qquad \text{(IV.76)}$$

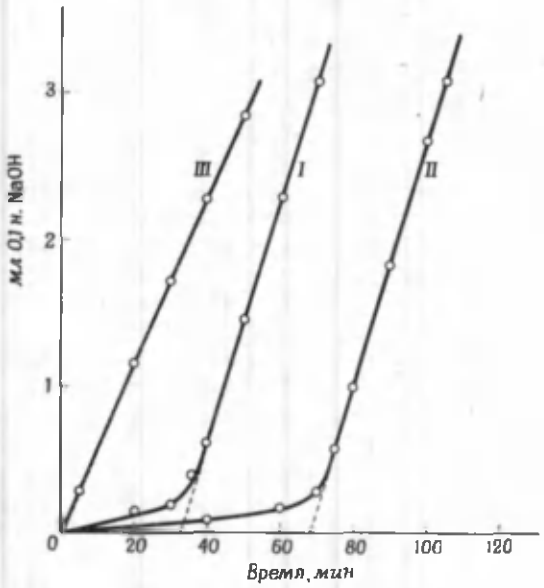
Подставляя (IV.75) и (IV.76) в (IV.74), получаем

$$v_t = \frac{v_a(1+\alpha)+v_b(1+\beta)}{1+\alpha+\beta}\,. \qquad \text{(IV.77)}$$

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

$$v_t = (v_a + v_b)\cdot\frac{1+\sigma}{1+2\sigma}\,. \qquad \text{(IV.78)}$$

Следовательно, скорость превращения смеси субстратов падает от значения, равного сумме скоростей превращения каждого из субстратов (при



Фиг. 27. Латентный период, обусловленный наличием примесей в субстрате [2876].

Гидролиз этилового эфира миндальной кислоты карбоксилэстеразой из печени. *I* — 0,008 *M* редистиллированного субстрата; *II* — 0,016 *M* редистиллированного субстрата; *III* — 0,008 *M* перекристаллизованного субстрата.

отсутствии второго) для случая, когда σ очень мало, до $^3/_4$ этой суммы при $\sigma = {}^1/_2$, до $^2/_3$ при $\sigma = 1$ и до $^1/_2$, когда σ очень велико.

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 [2876] при изучении гидролиза редистиллированного этилового эфира миндальной кислоты печеночной карбоксилэстеразой (3.1.1.1). Субстрат содержал небольшие количества соответствующего кетоэфира, который обладал очень высоким сродством к ферменту, но медленно им расщеплялся. Благодаря высокому сродству кетоэфир почти полностью вытеснял основной субстрат из комплекса с ферментом и, действуя как конкурентный ингибитор, снижал наблюдаемую скорость реакции почти до нуля. При этом, однако, кетоэфир подвергался медленному, но непрерывному гидролизу, и когда после завершения его гидролиза основной субстрат получал, наконец, доступ к ферменту, скорость гидролиза основного субстрата внезапно и резко увеличивалась, как показано на фиг. 27. Таким образом, в этом случае наблюдался длительный латентный период, продолжительность которого была пропорциональна количеству взятого субстрата (и, следовательно, количеству загрязняющей примеси). После латентного периода наступала нормальная реакция, при которой количество образовавшейся кислоты линейно зависит от времени. Если же эфир подвергали очистке путем перекристаллизации, то в этом случае не наблюдалось латентного периода.

Два фермента, действующие на один субстрат

Превращение субстрата может быть результатом одновременного действия двух или более ферментов.

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

$$v_t = \frac{V_1}{1+\frac{K_1}{s}} + \frac{V_2}{1+\frac{K_2}{s}}, \qquad \text{(IV.79)}$$

откуда

$$\frac{1}{v_t} = \frac{1+\frac{K_1+K_2}{s}+\frac{K_1K_2}{s^2}}{V_1+V_2+\frac{V_1K_2+V_2K_1}{s}}. \qquad \text{(IV.80)}$$

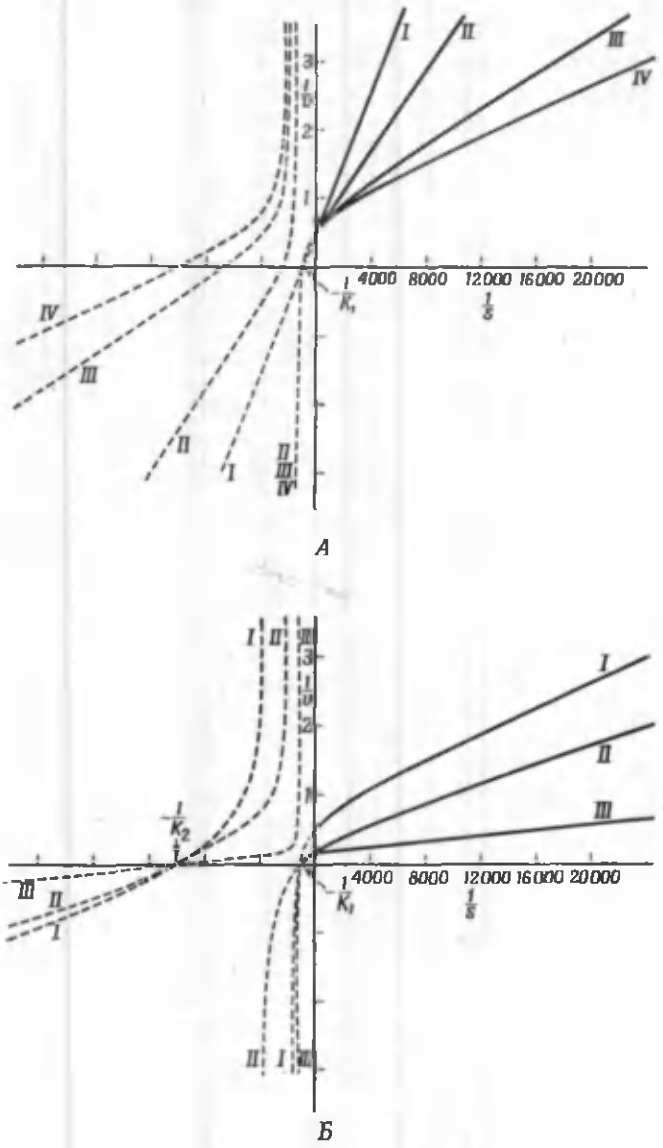
Форма кривой, описываемой этим уравнением, будет зависеть от соотношения величин K_1 и K_2. Если $K_1 = K_2$, то кривая превращается в прямую, как в случае действия одного фермента (фиг. 28, *А*, *I*). Величины отрезков, отсекаемых этой прямой на осях координат, равны в этом случае $1/(V_1 + V_2)$ и $-1/K_1$ $(= -1/K_2)$. Если константы K_1 и K_2 не равны друг другу, то зависимость не будет линейной и результаты будет трудно интерпретировать. Ряд теоретических кривых, полученных по уравнению (IV.80) и изображенных на фиг. 28, *А*, показывает влияние изменения K_2 на форму кривых при $V_1 = V_2 = 1$ и постоянном $K_1 = 10^{-3}$; кривые, изображенные на фиг. 28, *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. В каждой гиперболе 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 легко можно убедиться при анализе уравнения (IV.80).

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.

Во всех случаях считается, что $K_1 > K_2$. По мере уменьшения величины $1/s$ кривые изгибаются, потому что, как было указано выше, их



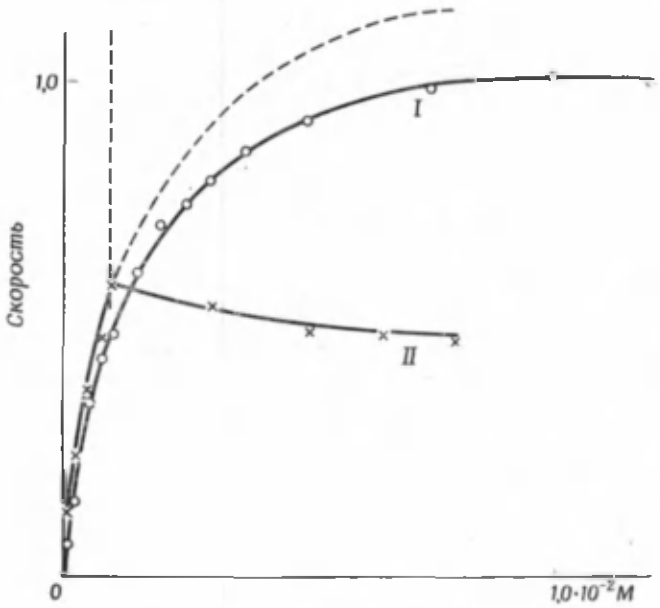
Фиг. 28. Гидролиз одного субстрата двумя ферментами. Теоретические кривые, построенные по уравнению (IV.80).

А. $V_1 = V_2 = 1$, $K_1 = 10^{-3}$ *M*. *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*. $K_1 = 10^{-3}$ *M*, $K_2 = 10^{-4}$ *M*. *I* — $V_1 = 1$, $V_2 = 1$; *II* — $V_1 = 5$, $V_2 = 1$; *III* — $V_1 = 1$, $V_2 = 5$.

воображаемые продолжения должны пересечь ось абсцисс в точке $-1/K_1$. В некоторых случаях, например для условий, соответствующих кривой *IV* на фиг. 28, *А* и кривой *III* на фиг. 28, *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.

Нерастворимые субстраты

Обычно ферменты действуют на субстраты, находящиеся в растворе. Если количество добавленного субстрата превышает предел его растворимости, то избыток субстрата не участвует в ферментативной 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



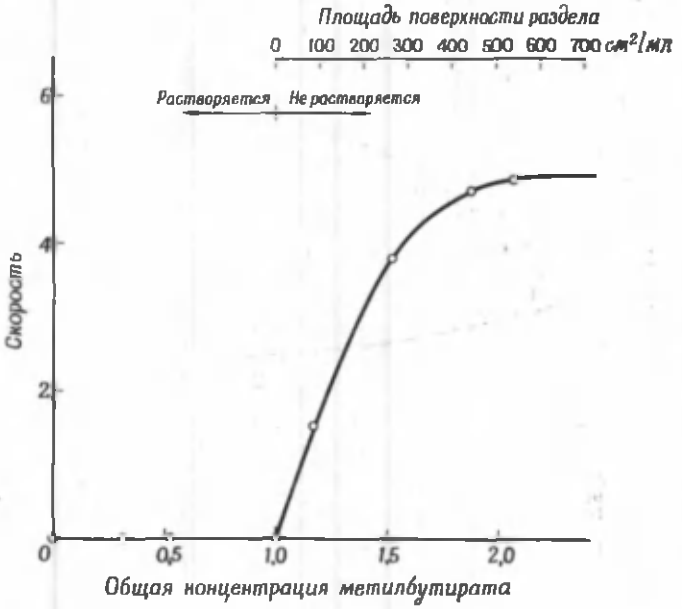
Фиг. 29. Зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата при действии карбоксилэстеразы [2808].
I — гидролиз этилбутирата; *II* — гидролиз трибутирина. Вертикальная пунктирная кривая показывает предел растворимости трибутирина.

добавлении субстрата скорость увеличиваться не будет. Величина V (уравнение IV.11) никогда не будет достигнута, так как концентрация субстрата, которая насыщает водный раствор, будет недостаточной для насыщения фермента. На фиг. 29 приведены результаты типичного опыта с карбоксилэстеразой печени (3.1.1.1), гидролизующей этилбутират и трибутирин. Весь добавленный этилбутират находился в растворенном состоянии. Трибутирин, который относительно мало растворим, добавляли в форме эмульсии. Достигаемая конечная концентрация показана на графике. В области слева от пунктирной линии (см. график) трибутирин полностью растворялся и образовывал прозрачный водный раствор; в области справа от пунктирной линии только часть эмульсии растворялась, и в этой области концентрация трибутирина в растворе была предположительно постоянна.

Сарда и Данъюэл [2302] показали, что панкреатическая липаза (3.1.1.3) не действует на растворенные субстраты; она активна только при абсорбции на поверхности раздела гидролизуемый эфир — вода (очевидно, вследствие того, что только в этом случае обнажается ее активный центр). При работе с очень мало растворимым субстратом, например триолеином, применяемым в виде эмульсии, получают типичную кривую Михаэлиса, начинающуюся в начале координат. В то же время с более растворимым субстратом, например метилбутиратом, не обнаруживается активности в области полного его растворения, т. е. слева от пунктирной линии; кривая Михаэлиса начи-

нается в этом случае от точки, в которой водная фаза оказывается насыщенной эфиром (фиг. 30). Таким образом, получается картина, полностью противоположная той, которая представлена на фиг. 29 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



Фиг. 30. Зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата (метилбутират) при действии панкреатической липазы [2302].

Скорость выражена в процентах от максимальной скорости, определяемой в опытах по гидролизу триолеина; концентрация эфира выражена по отношению к концентрации насыщенного раствора, принятой за 1,0.

в обычной теории, в выражении для константы участвует площадь поверхности раздела; она зависит от степени эмульгирования, а также от количества присутствующего субстрата. Сарда и Дэньюэл выражают свои результаты в форме константы Михаэлиса, определяемой как *молярная поверхностная концентрация* при скорости реакции, равной половине максимальной. Под молярной поверхностной концентрацией понимают площадь всех поверхностей раздела в одном литре эмульсии, деленную на площадь поверхности, занимаемой одним молем 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.

Теория Бриггса — Холдейна

Как уже указывалось выше (см. стр. 64), теория Михаэлиса исходит из допущения, согласно которому равновесие между ферментом и субстратом (реакция IV.5) достигается гораздо быстрее, чем успевает распасться комплекс ES (реакция IV.6), так что на всем протяжении действия фермента комплекс ES всегда находится в равновесии с E и S. Принимая во внимание

очень высокие значения каталитических констант, обнаруженные у многих ферментов, можно считать весьма вероятным, что сделанное выше допущение не всегда оказывается справедливым и что реальное значение p будет отличаться от его значения в условиях равновесия. Анализ кинетики реакции с учетом этого обстоятельства был предложен Бриггсом и Холдейном [328] 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. p, может рассматриваться как постоянная в течение короткого периода времени, необходимого для измерения скорости. В течение более продолжительного периода времени p, конечно, будет изменяться по ходу реакции в связи с падением концентрации субстрата; однако скорость изменения величины p всегда будет относительно незначительной по сравнению со скоростью протекания ферментативной реакции. Используя указанный выше постулат для установления теоретической зависимости между скоростью реакции и концентрацией субстрата, можно пренебречь медленно протекающими изменениями p и считать, что данная система находится в стационарном состоянии.

Теория рассматривает следующие константы скорости [1] для отдельных стадий ферментативной реакции:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + \text{Продукты}. \qquad \text{(IV.81)}$$

Отсюда скорость образования ES будет равна $k_{+1}(e-p)s$, а скорость распада ES будет равна сумме двух скоростей: скорости распада ES до E и S и скорости распада ES до E и продуктов, т. е. $k_{-1}p$ и $k_{+2}p$ соответственно. Следовательно, результирующая скорость изменения p будет иметь значение

$$\frac{dp}{dt} = k_{+1}(e-p)s - (k_{-1}+k_{+2})p. \qquad \text{(IV.82)}$$

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

$$p = \frac{es}{\frac{k_{-1}+k_{+2}}{k_{+1}} + s}. \qquad \text{(IV.83)}$$

Это новое значение p заменяет значение, полученное на основе простой равновесной теории (уравнение IV.8). Скорость ферментативной реакции, измеряемая по образованию продуктов реакции, будет равна

$$v = k_{+2}p = \frac{k_{+2}es}{\frac{k_{-1}+k_{+2}}{k_{+1}} + s}. \qquad \text{(IV.84)}$$

Максимальная скорость определяется выражением

$$V = k_{+2}e, \qquad \text{(IV.85)}$$

так что уравнение (IV.84) может быть написано в форме

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{s}} \qquad \text{(IV.86)}$$

Это уравнение идентично уравнению Михаэлиса (IV.11), за исключением того, что вместо K_s стоит K_m, определяемое выражением

$$K_m = \frac{k_{-1}+k_{+2}}{k_{+1}} = K_s + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}. \qquad \text{(IV.87)}$$

[1] Константы скорости обозначены в соответствии с рекомендациями Комиссии по ферментам.

Если k_{+2} значительно меньше k_{-1}, то последним членом можно пренебречь и K_m становится равным отношению k_{-1}/k_{+1}; это последнее, представляющее собой не что иное, как отношение констант скоростей реакции (IV.5), протекающей в прямом и в обратном направлении, равно константе равновесия K_s.

Следовательно, для рассмотренной выше реакционной системы, в которой участвует один субстрат и один промежуточный комплекс, анализ по Бриггсу — Холдейну и по Михаэлису приводит к идентичным результатам, если величиной k_{+2} можно пренебречь по сравнению с k_{-1}. Однако в более сложных реакционных системах анализ, основанный на рассмотрении стационарного состояния, приводит к более сложным выражениям для V и K_m или даже к таким уравнениям для скорости реакции, которые существенно отличаются по форме от уравнения Михаэлиса. Некоторые из таких случаев рассматриваются в следующих разделах.

Общие методы составления уравнений для стационарного состояния

Для ферментативной реакции с определенной последовательностью стадий можно составить ряд 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 при стационарном состоянии; в эти последние уравнения входят константы скорости всех тех превращений, в которых участвует рассматриваемый комплекс. В некоторых случаях этот ряд уравнений можно решить обычными методами, как это было сделано для простой системы, рассмотренной в предыдущем разделе, и найти выражение для концентрации интересующего нас промежуточного комплекса, аналогичное уравнению (IV.83); умножение полученной величины на константу скорости распада этого комплекса даст значение скорости общей реакции.

Для ряда специальных случаев путем прямого расчета были получены соответствующие уравнения; две наиболее ранние сводки по этому вопросу составлены Сегалом, Кахмаром и Бойером [2363] в 1952 г. и Ингрехемом и Маковером [1212] в 1954 г.; дальнейшая разработка вопроса проведена Дальцилем [534] и Ольберти [33].

Кинг и Альтман [1383] для решения рассмотренной выше системы уравнений применили метод детерминантов и на основании полученных результатов сформулировали ряд важных правил, которые позволяют составить 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 через EXY). Система реакций с константами скорости и промежуточными комплексами показана на фиг. 31. Это один из нескольких примеров, рассмотренных Уонгом и Ханесом [2905] на основе метода Кинга и Альтмана.

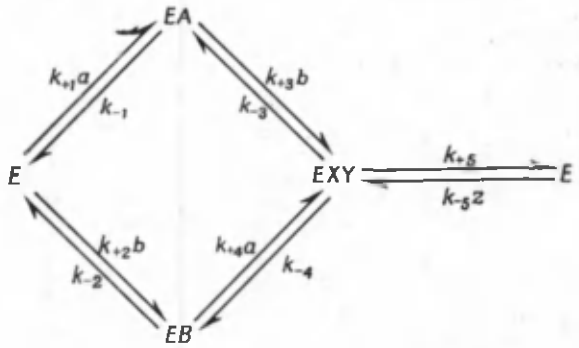
Этот метод состоит в составлении серии комбинаций стрелок, обозначающих переходы между различными состояниями фермента; комбинации составляются в соответствии с определенными правилами, и каждая из них отвечает определенному члену в уравнении скорости общей реакции. Для получения членов числителя строят 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 кольца;

в) может быть показано только одно направление какой-либо стадии.

Следует напомнить, что первым и последним элементом схемы на фиг. 31 является свободный фермент. Для схемы, приведенной на фиг. 31, имеется восемь возможных комбинаций стрелок (они показаны на фиг. 32), удовлетворяющих приведенным выше требованиям для членов числителя. Каждая комбинация представляет собой произведение соответствующих констант



Фиг. 31. Схема реакций для ферментной системы, рассматриваемой на фиг. 32.

Суммарная реакция: $A + B \rightleftarrows Z$.

скорости. Половина членов числителя относится к прямой реакции и 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 фиг. 31 все возможные нециклические комбинации стрелок, содержащие на одну стрелку меньше, чем члены числителя. Должны быть выполнены 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 фиг. 32. Под каждой комбинацией стрелок показан соответствующий член, входящий в уравнение скорости.

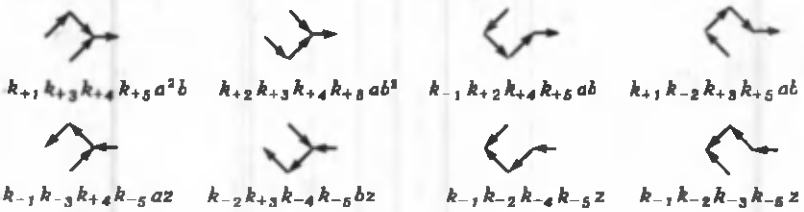
Таким путем получают уравнение скорости реакции для обратимой системы, показанной на фиг. 31:

$$v = \frac{(c_1ab + c_2a^2b + c_3ab^2 - c_4z - c_5az - c_6bz)\,e}{c_7 + c_8a + c_9b + c_{10}ab + c_{11}a^2 + c_{12}b^2 + c_{13}a^2b + c_{14}ab^2 + c_{15}z + c_{16}az + c_{17}bz + c_{18}abz}, \qquad \text{(IV.88)}$$

где

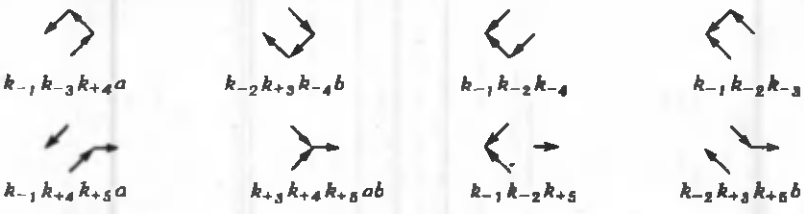
$$c_1 = k_{+1}k_{-2}k_{+3}k_{+5} + k_{-1}k_{+2}k_{+4}k_{+5},$$
$$c_2 = k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{+5},$$
$$c_3 = k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5},$$
$$c_4 = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5},$$
$$c_5 = k_{-1}k_{-3}k_{+4}k_{-5},$$
$$c_6 = k_{-2}k_{+3}k_{-4}k_{-5},$$
$$c_7 = k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_{+5},$$
$$c_8 = k_{+1}k_{-2}k_{-3} + k_{+1}k_{-2}k_{-4} + k_{+1}k_{-2}k_{+5} + k_{-1}k_{-3}k_{+4} + k_{-1}k_{+4}k_{+5},$$
$$c_9 = k_{-1}k_{+2}k_{-3} + k_{-1}k_{+2}k_{-4} + k_{-1}k_{+2}k_{+5} + k_{-2}k_{+3}k_{-4} + k_{-2}k_{+3}k_{+5},$$

8 членов числителя

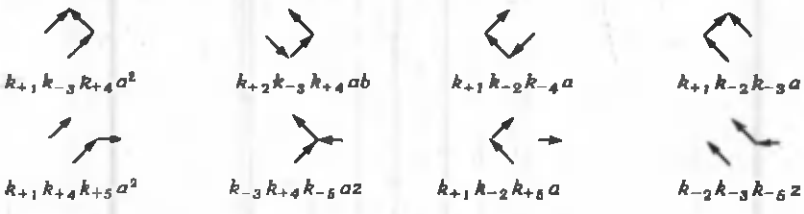


32 члена знаменателя:

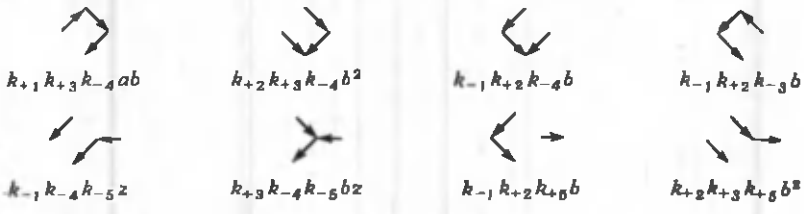
8 членов, оканчивающихся на E:



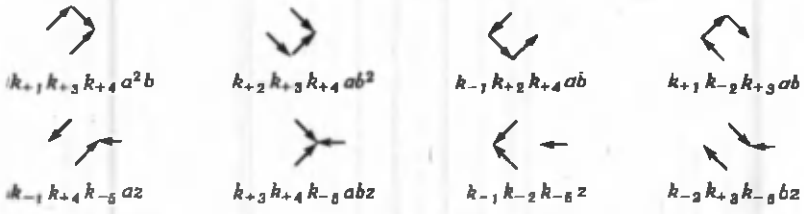
8 членов, оканчивающихся на EA:



8 членов, оканчивающихся на EB:



8 членов, оканчивающихся на EXY:



Фиг. 32. Схема составления членов выражения для скорости реакции по методу Кинга и Альтмана.

$$c_{10} = k_{+1}k_{-2}k_{+3} + k_{-1}k_{+2}k_{+4} + k_{+1}k_{+3}k_{-4} + k_{+2}k_{-3}k_{+4} + k_{+3}k_{+4}k_{+5},$$
$$c_{11} = k_{+1}k_{-3}k_{+4} + k_{+1}k_{+4}k_{+5},$$
$$c_{12} = k_{+2}k_{+3}k_{-4} + k_{+2}k_{+3}k_{+5},$$
$$c_{13} = k_{+1}k_{+3}k_{+4},$$
$$c_{14} = k_{+2}k_{+3}k_{+4},$$
$$c_{15} = k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5},$$
$$c_{16} = k_{-1}k_{+4}k_{-5} + k_{-3}k_{+4}k_{-5},$$
$$c_{17} = k_{-2}k_{+3}k_{-5} + k_{+3}k_{-4}k_{-5},$$
$$c_{18} = k_{+3}k_{+4}k_{-5}.$$

В уравнение (IV.88) входят члены, содержащие концентраций обоих субстратов и продукта. Скорости реакции v приписывают положительное значение для прямого направления. Выражение для скорости может быть упрощено при рассмотрении начальных скоростей в любом из направлений. Подставляя $z = 0$ или $a = b = 0$, получают в первом случае

$$v_f = \frac{(c_1ab + c_2a^2b + c_3ab^2)\,e}{c_7 + c_8a + c_9b + c_{10}ab + c_{11}a^2 + c_{12}b^2 + c_{13}a^2b + c_{14}ab^2} \qquad \text{(IV.89)}$$

и во втором

$$v_b = \frac{c_4ze}{c_7 + c_{15}z}\,. \qquad \text{(IV.90)}$$

Последнее уравнение имеет тот же вид, что и уравнение Бригса — Холдейна (IV.84), однако выражения для V и K_m более сложны, а именно

$$V = \frac{c_4e}{c_{15}} = \frac{(k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5})\,e}{k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}} \qquad \text{(IV.91)}$$

и

$$K_m = \frac{c_7}{c_{15}} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_{+5}}{k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}}\,. \qquad \text{(IV.92)}$$

Уравнение (IV.89) для прямой реакции не может быть сокращено до вида уравнения (IV.84), поскольку даже в том случае, если концентрацию одного из субстратов — либо a, либо b — сохранять постоянной, то все еще будет оставаться член, содержащий b^2 или a^2.

При постоянной концентрации b получаем

$$v_f = \frac{(ia^2 + ja)\,e}{k + la^2 + ma}\,, \qquad \text{(IV.93)}$$

где

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

Уонг и Ханес называют эту систему «системой второй степени относительно a». Такая форма объясняется тем, что А связывается как со свободным ферментом, так и с комплексом EB. В этом случае система не может анализироваться в рамках «константы Михаэлиса», и график, в котором по обеим осям отложены величины, обратные скорости и концентрации, не будет линейным. Можно представить себе две основные причины такого рода поведения. Первая, как в данном случае,— это наличие параллельных путей, по которым субстрат взаимодействует с ферментом, образуя промежуточный тройной фермент-субстратный комплекс, и притом так, что это

взаимодействие происходит в случайной последовательности. Например, в рассматриваемом случае субстрат А может взаимодействовать как с Е, так и с ЕВ. При исключении одного из этих путей взаимодействия, например в случае $k_{+4} = 0$, коэффициенты членов, содержащих a^2, становятся равными нулю, и в результате выражение для скорости принимает обычный вид уравнения Михаэлиса. Вторая возможная причина отклонения от уравнения Михаэлиса — участие в реакции, в ходе которой образуется тройной комплекс, двух идентичных молекул субстрата.

Системы с несколькими последовательными стадиями

Даже в том случае, 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 форма уравнения сохранится. 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 в предыдущем разделе. Чтобы продемонстрировать влияние дополнительных промежуточных стадий, ниже приведены соответствующие выражения для одного, двух и трех промежуточных комплексов.

Для одного комплекса:

$$\mathrm{E} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}s}{\rightleftarrows}} \mathrm{ES} \underset{k_{-2}z}{\overset{k_{+2}}{\rightleftarrows}} \mathrm{E}, \tag{IV.94}$$

$$V = k_{+2}e, \tag{IV.95}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}. \tag{IV.96}$$

Для двух комплексов:

$$\mathrm{E} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}s}{\rightleftarrows}} \mathrm{ES} \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftarrows}} \mathrm{EZ} \underset{k_{-3}z}{\overset{k_{+3}}{\rightleftarrows}} \mathrm{E}, \tag{IV.97}$$

$$V = \frac{k_{+2}k_{+3}e}{k_{+2} + k_{-2} + k_{+3}}, \tag{IV.98}$$

$$K_m = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}}{k_{+1}(k_{+2} + k_{-2} + k_{+3})}. \tag{IV.99}$$

Для трех комплексов:

$$\mathrm{E} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}s}{\rightleftarrows}} \mathrm{ES} \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftarrows}} \mathrm{EX} \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftarrows}} \mathrm{EZ} \underset{k_{-4}z}{\overset{k_{+4}}{\rightleftarrows}} \mathrm{E}, \tag{IV.100}$$

$$V = \frac{k_{+2}k_{+3}k_{+4}e}{k_{+2}k_{+3} + k_{+2}k_{-3} + k_{-2}k_{-3} + k_{+2}k_{+4} + k_{-2}k_{+4} + k_{+3}k_{+4}}, \tag{IV.101}$$

$$K_m = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{+4} + k_{-1}k_{+3}k_{+4} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}}{k_{+1}(k_{+2}k_{+3} + k_{+2}k_{-3} + k_{-2}k_{-3} + k_{+2}k_{+4} + k_{-2}k_{+4} + k_{+3}k_{+4})}. \tag{IV.102}$$

Различные константы скорости могут, вероятно, весьма существенно варьировать; некоторые из констант прямой реакции будут столь велики, а некоторые из констант обратной реакции столь малы, что кинетика общей реакции будет в основном определяться другими константами. Часто бывает так, что какая-нибудь одна стадия из-за очень малой величины константы скорости прямой реакции контролирует всю кинетику системы. Допустим, что скорость обратных реакций в системе (IV.100) незначительна, и потому всеми членами, имеющими отрицательные константы, можно пренебречь.

Допустим далее, что k_{+3} значительно меньше остальных констант прямых реакций. Тогда выражения упрощаются до

$$K_m = \frac{k_{+2}k_{+3}k_{+4}}{k_{+1}k_{+2}k_{+4}} = \frac{k_{+3}}{k_+} \qquad \text{(IV.103)}$$

и

$$V = \frac{k_{+2}k_{+3}k_{+4}e}{k_{+2}k_{+4}} = k_{+3}e. \qquad \text{(IV.104)}$$

В общем случае, если обратными реакциями можно пренебречь и превращение m-го комплекса в $(m+1)$-ный комплекс является наиболее медленной стадией прямой реакции, то V/e будет определяться константой скорости этого превращения, а K_m — этой константой, деленной на k_{+1}. Допущение, что $k_{-1} = 0$, приводит к выражению, характерному для крайнего случая Бриггса — Холдейна, только с заменой их константы k_{+2} на константу наиболее медленной из реакций, участвующих в распаде ES. Этот случай невозможно отличить от того, в котором лимитирующей является константа k_{+2}, если нельзя в отдельности определить концентрации комплексов и вычислить соответствующие кинетические константы (методы, с помощью которых это можно сделать, рассматриваются ниже). В тех случаях, когда фермент имеет высокое сродство к продукту, скорость диссоциации EZ на E и Z может быть столь малой, что этот процесс окажется лимитирующей стадией, которая и будет в основном определять величины V и K_m.

Реакции с участием двух субстратов

На стр. 68 двусубстратная система была рассмотрена с точки зрения кинетики Михаэлиса (т. е. при допущении, что между комплексом EAB и свободными компонентами быстро устанавливается равновесие) и было показано, что для каждого субстрата получается уравнение михаэлисовского типа, соответствующее линейному графику для величин, обратных скорости и концентрации. Это справедливо даже в том случае, если субстраты соединяются с ферментом в случайной последовательности. В то же время на стр. 88—92 было показано, что в рамках кинетики стационарного состояния выражение для скорости такой системы не приводит к уравнению михаэлисовского типа при отсутствии определенной очередности взаимодействия субстратов с ферментом, и график, выражающий зависимость обратных величин скорости и концентрации, имеет нелинейный характер.

Ниже перечислены три условия, каждого из которых достаточно, чтобы график зависимости обратных величин для двусубстратных систем имел линейный характер.

1. Тройной комплекс не образуется и взаимодействие бинарного фермент-субстратного комплекса со вторым субстратом дает продукт и свободный фермент, как, например, в рассматриваемом ниже случае пероксидазы.

2. Один из субстратов взаимодействует со свободным ферментом настолько быстрее, чем другой, что практически функционирует только один путь образования тройного комплекса, т. е. как бы имеет место определенная очередность взаимодействия субстратов с ферментом. Этот случай уже рассматривался на стр. 92.

3. Распад тройного комплекса в направлении прямой реакции происходит столь медленно, что комплекс остается в равновесии с субстратами, т. е. превалируют условия Михаэлиса и приложимо уравнение (IV.30). Дальциль [534] считает, что дрожжевая алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) относится к ферментам этой последней категории.

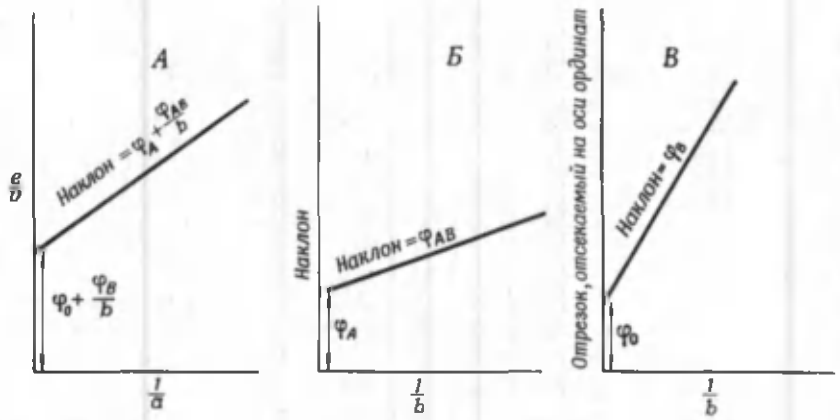
В тех случаях, когда уравнения не содержат квадратов концентраций компонентов и остаются только члены, содержащие a, b и ab, а также постоянный член, выражение для скорости может быть представлено в следующем виде:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{c_A}{a} + \frac{c_B}{b} + \frac{c_{AB}}{ab}}. \qquad \text{(IV.105)}$$

Метод графического определения констант, сходный с методом, описанным на стр. 69, был предложен Дальцилем [534], который вводит следующее выражение для скорости реакции:

$$\frac{e}{v} = \varphi_0 + \frac{\varphi_A}{a} + \frac{\varphi_B}{b} + \frac{\varphi_{AB}}{ab}. \qquad \text{(IV.106)}$$

Если построить график зависимости e/v от $1/a$ при постоянной концентрации B, то мы получим прямую с наклоном $\varphi_A + \frac{\varphi_{AB}}{b}$, отсекающую

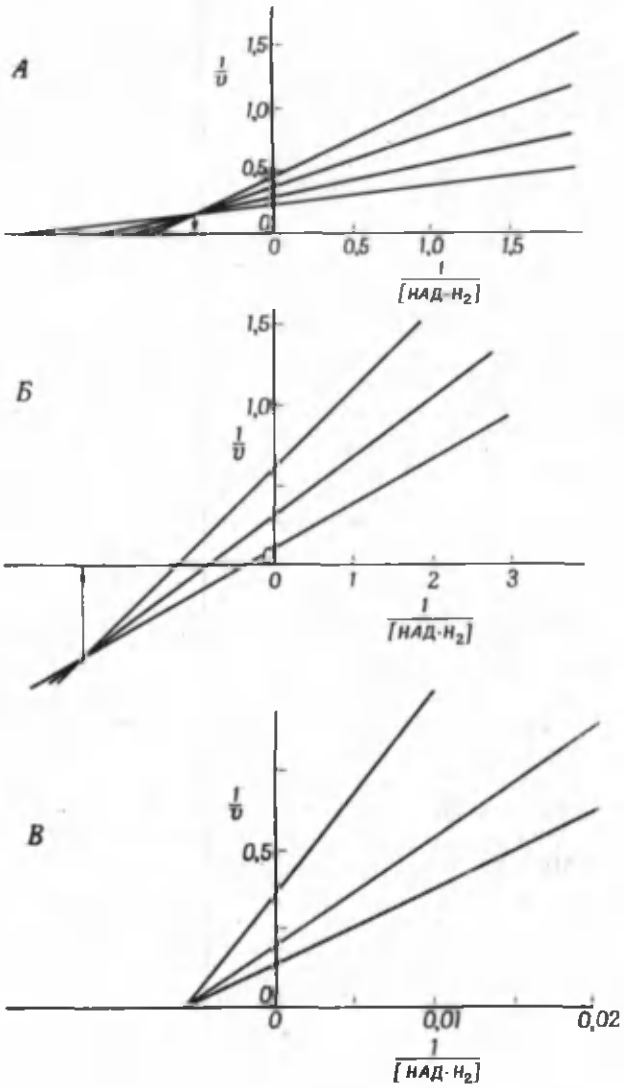


Фиг. 33. Графический метод Дальциля для определения φ-констант [534].

на оси ординат отрезок, равный $\varphi_0 + \frac{\varphi_B}{b}$, как показано на фиг. 33, *А*. Строят ряд подобных графиков для различных концентраций B. Затем строят еще два графика, один — зависимости значений наклонов, полученных в исходной серии графиков, от $1/b$ и другой — зависимости ординаты точек пересечения с вертикальной осью от той же величины. Первый из графиков представляет собой прямую (фиг. 33, *Б*) с наклоном φ_{AB}, отсекающую на оси ординат отрезок, равный φ_A; второй (фиг. 33, *В*) — прямую с наклоном φ_B, пересекающую ось ординат в точке φ_0. Таким образом определяют все четыре константы уравнения (IV.106); достоверность полученных величин может быть проверена путем выполнения аналогичной процедуры с заменой $1/a$ на $1/b$. Все четыре величины φ являются функциями констант скорости. Дальциль составил таблицу, в которой приведены значения этих функций для различных реакционных систем.

Фриден [779] показал, что для систем, к которым применимо уравнение (IV.105), первичные графики пересекаются в точке, которая соответствует концентрации $-c_{AB}/c_B$, если график выражает зависимость e/v от $1/a$, и $-c_{AB}/c_A$, если он выражает зависимость e/v от $1/b$; точка пересечения может лежать выше оси абсцисс, на ней или под ней. Для субстрата A, который первым взаимодействует с ферментом (в механизме, предусматривающем определенную очередность взаимодействия субстратов с ферментом), т. е. для субстрата, который соединяется со свободным ферментом,

Фриден показал, что c_{AB}/c_B равно K_s. Это дает метод для определения истинной величины сродства фермента к А. Однако для того, чтобы применить этот метод, необходимо знать, какой из двух субстратов первым взаимодействует с ферментом; другими словами, необходимо иметь независимый метод для обнаружения взаимодействия одного из субстратов со свободным



Фиг. 34. Метод Фридена для определения сродства фермента к первому присоединяющемуся субстрату [779].

А. Лактатдегидрогеназа. *Б.* Алкогольдегидрогеназа печени. *В.* Дрожжевая алкогольдегидрогеназа.

ферментом. На фиг. 34 показаны данные, полученные с тремя дегидрогеназами, для которых известно, что они соединяются с НАД·H_2 в отсутствие других субстратов. Величины K_s для НАД·H_2, полученные из этих графиков, достаточно хорошо согласуются со значениями констант диссоциации, определенными физическими методами.

Если субстраты соединяются с ферментом в случайной последовательности, то метод можно применить в тех случаях, когда выполняются усло-

вия Михаэлиса; в других случаях получаемые графики оказываются нелинейными.

Фриден [781] распространил данный метод на систему из трех субстратов, соединяющихся с ферментом в определенном порядке; в этом случае скорость реакции выражается уравнением

$$v = 1 + \frac{V}{\frac{c_A}{a} + \frac{c_B}{b} + \frac{c_C}{c} + \frac{c_{AB}}{ab} + \frac{c_{BC}}{bc} + \frac{c_{ABC}}{abc}}. \qquad \text{(IV.107)}$$

Измерение констант скоростей

В небольшом числе случаев можно непосредственно определить (обычно спектрофотометрическим путем) концентрацию комплекса ES, и это позволяет вычислить значение отдельных кинетических констант. Чанс [418] впервые изучал таким способом действие пероксидазы (1.11.1.7) — гематинового фермента, который, как показали Кейлин и Манн [1347], изменяет свой спектр поглощения при соединении с H_2O_2. Этот объект обладает дополнительным преимуществом, которое состоит в том, что при отсутствии донора водорода комплекс ES может образоваться и существовать без протекания пероксидазной реакции. Благодаря этому комплекс ES можно изучать либо в условиях равновесия, либо в условиях протекания реакции. Более того, при использовании такого донора, как лейкомалахитовый зеленый, течение пероксидазной реакции можно также измерять спектрофотометрически по возникновению зеленой окраски. Изящное приложение проточного метода Хартриджа — Рафтона позволяет следить за концентрацией[1] комплекса ES и количеством образовавшегося продукта в течение очень короткого периода времени (около 2 *сек*) после смешивания; за это время реакция обычно завершается при работе с очень малыми количествами реагентов. В настоящее время Чанс довел подобные методы до высокой степени совершенства и чувствительности.

При смешивании фермента с H_2O_2 в отсутствие донора водорода и при определении изменения концентрации p во времени было найдено, что соединение происходило очень быстро и практически полностью. Величина константы скорости бимолекулярной реакции k_{+1} оказалась равной $1.2 \cdot 10^7$ *л/моль·сек*. Наибольшее найденное значение константы равновесия K_s было равно $2 \cdot 10^{-8}$ *моль/л*; следовательно, k_{-1} должно было иметь значение 0,2 $сек^{-1}$ или меньше.

Если фермент, субстрат и донор водорода присутствуют одновременно, то имеют место следующие реакции:

$$E + H_2O_2 \rightleftarrows ES, \qquad \text{(IV.108)}$$

$$ES + AH_2 \rightarrow E + A + 2H_2O. \qquad \text{(IV.109)}$$

Поэтому скорость реакции (IV.109) будет пропорциональна концентрации a донора AH_2. При какой-либо постоянной концентрации донора удобно рассматривать реакцию как мономолекулярную реакцию с константой скорости k_{+2}; следовательно, величина k_{+2} будет включать концентрацию донора, так что

$$k_{+2} = k'_{+2}a, \qquad \text{(IV.110)}$$

где k'_{+2} — истинная константа скорости бимолекулярной реакции (ср. с уравнением IV.41).

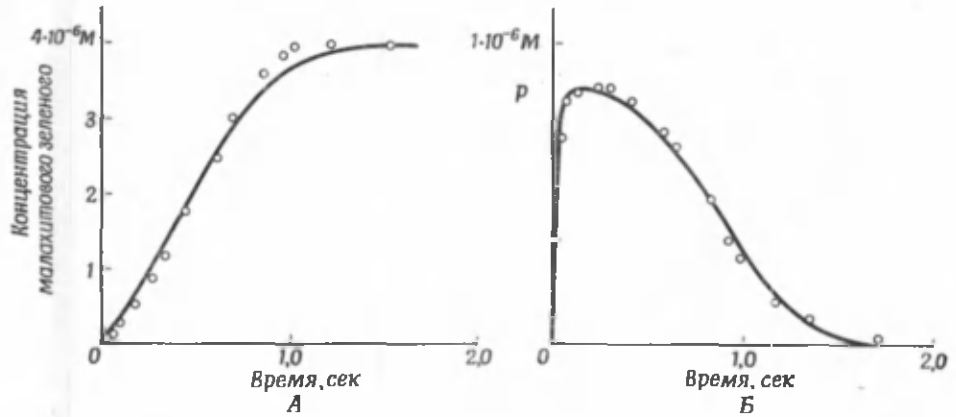
---

[1] Более поздними работами 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. VII.

Величина k_{+2} была найдена двумя путями. Если скорость окисления донора (v) и концентрацию комплекса ES (p) определять одновременно, то величина k_{+2} может быть вычислена из уравнения

$$v = k_{+2}p. \qquad \text{(IV.111)}$$

Типичный опыт с пероксидазой представлен на фиг. 35. Обе кривые (фиг. 35, *А* и фиг. 35, *Б*) определялись в этом случае одновременно. На фиг. 35, *Б* видно, что комплекс образуется быстро и что концентрация его остается постоянной в течение непродолжительного времени, а затем падает по мере исчерпания субстрата. Скорость образования продукта, которую характеризует наклон кривой на фиг. 35, *А*, изменяется, как это



Фиг. 35. Кривые, описывающие кинетику действия пероксидазы (1.11.1.7), полученные по методу Чанса [418].

Начальные концентрации: 10^{-8} *М* пероксидазы из хрена, $4 \cdot 10^{-6}$ *М* H_2O_2, $15 \cdot 10^{-6}$ *М* лейкомалахитового зеленого. Ацетатный буфер с pH 4,0. *А*. Количество образовавшегося продукта. *Б*. Изменение концентрации комплекса пероксидаза — перекись водорода. Кружки соответствуют экспериментальным точкам; кривые построены по расчетным данным.

можно видеть, пропорционально концентрации комплекса. Она увеличивается в период образования комплекса, достигает максимума ко времени, соответствующему пику на кривой фиг. 35, *Б*, и затем медленно падает до нуля. Значения величин v по кривой на фиг. 35, *А* и p по кривой на фиг. 35, *Б*, относящиеся к одному моменту времени, позволяют определить k_{+2} по уравнению (IV.111).

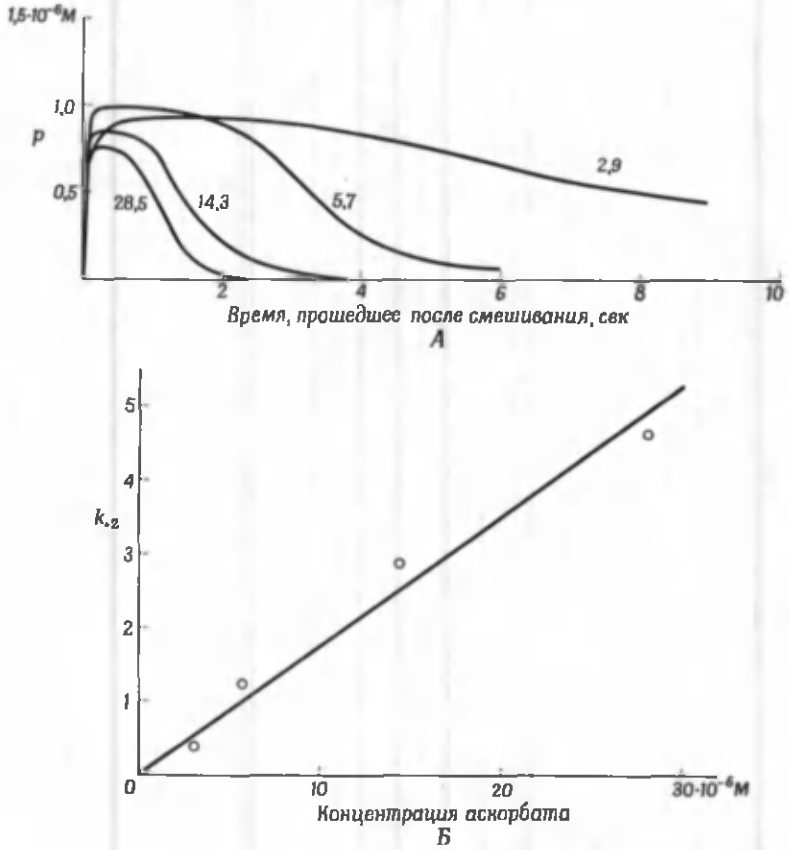
Второй метод определения величины k_{+2} состоит в измерении площади, ограниченной кривой на фиг. 35, *Б* и осями координат. Так как количество донора водорода, окисляемого за короткий промежуток времени dt, равно (по уравнению IV.111) $k_{+2}\,pdt$, то все количество окисленного донора будет равно $k_{+2}\int_0^\infty pdt$. Этот интеграл представляет площадь под кривой на фиг. 35, *Б*. Принимая, что все количество окисленного донора равно s_0, т. е. исходному количеству перекиси водорода, которое известно, имеем

$$s_0 = k_{+2}\int_0^\infty pdt, \qquad \text{(IV.112)}$$

откуда можно определить k_{+2}. Этот метод определения не связан с измерением количества продукта окисления и может быть применен по отношению к донорам водорода, образующим бесцветные продукты. На фиг. 36, *А* приведены данные нескольких типичных опытов с аскорбиновой кислотой

в качестве донора водорода, а на фиг. 36, *Б* показана пропорциональность между рассчитанными величинами k_{+2} и концентрацией донора водорода; величина k'_{+2} по этим данным имеет значение $1{,}8 \cdot 10^5$ *л/моль·сек*.

Зная величины трех констант скорости k_{+1}, k_{-1} и k_{+2}, можно рассмотреть значение величины K_m для данного фермента. Подставляя в уравнение (IV.87) соответствующие величины из опыта, результаты которого



Фиг. 36. Кривые, описывающие кинетику действия пероксидазы [418].
Начальные концентрации: 10^{-6} *M* пероксидазы из хрена, $4 \cdot 10^{-6}$ *M* H_2O_2. Ацетатный буфер с pH 4,2. *А*. Экспериментальные кривые (цифры на кривых указывают концентрацию аскорбиновой кислоты в микромолях); *Б*. Определение величин k_{+1} по второму из двух методов, описанных в тексте.

изображены на фиг. 35, получаем $K_m = \frac{0{,}2 + 4{,}2}{1 \cdot 10^7}$, или $4{,}4 \cdot 10^{-7}$ *M*. Это значение вполне сопоставимо с величиной $5 \cdot 10^{-7}$ *M*, рассчитанной для этих условий по данным Манна [1704] при допущении, что величина K_m пропорциональна концентрации донора водорода, как это и должно быть в том случае, когда величиной k_{-1} можно пренебречь вследствие ее незначительности.

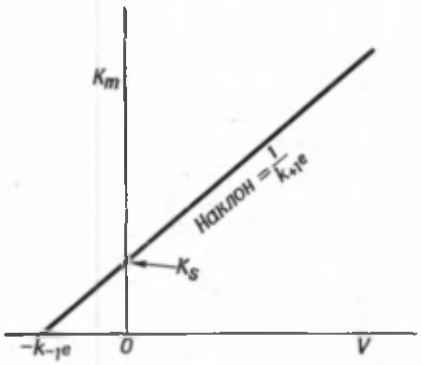
K_m можно также определить по максимальному значению величины p и уравнению (IV.83). Преобразуя последнее уравнение и обозначив максимальное значение p, которое соответствует стационарному состоянию, через p_{max}, имеем

$$K_m = \frac{(e - p_{max}) s_m}{p_{max}}. \qquad \text{(IV.113)}$$

Величина s_m, т. е. концентрация перекиси водорода при $p = p_{max}$, равна площади под участком кривой зависимости p от t, ограниченным слева вре-

менем смешивания реагирующих веществ, а справа временем, соответствующим максимальному значению p. Подобные расчеты для опыта, результаты которого представлены на фиг. 35, приводят к величине $K_m = 4{,}1 \cdot 10^{-7}$. Эти выводы подтверждаются также совпадением экспериментальных кривых с кривыми, полученными путем расчета по уравнениям при использовании следующих значений: $k_{+1} = 0{,}9 \cdot 10^7$ *л/моль·сек*, $k_{-1} = 0$, $k_{+2} = 4{,}5$ *сек*$^{-1}$ (фиг. 35). Совпадение значений K_m, определенных различными путями, дает уверенность в правильности результата.

Полученные величины ясно показывают, что в рассматриваемых условиях K_m для пероксидазы почти равно k_{+2}/k_{+1}, так что оно скорее выражает



Фиг. 37. Экстраполяция K_m для определения величины K_s.

динамическое состояние, нежели термодинамическое равновесие. K_s в действительности составляет только небольшую долю K_m. Однако k_{+2} зависит от концентрации донора и при уменьшении последней k_{+2} может стать равным или даже меньшим, чем k_{-1}. Таким образом, для одного и того же фермента можно изменять величину K_m между двумя крайними значениями $K_m = K_s$ и $K_m = k_{+2}/k_{+1}$. Величина K_s представляет собой экстраполированное значение K_m, полученное при k_{+2}, приближающемся к нулю.

В случаях, подобных рассмотренному выше, когда имеются возможности для изменения k_{+2} независимо от k_{+1} и k_{-1}, например путем изменения концентрации второго реагента, участвующего в реакции распада, можно определить значения величины K_s и трех констант скорости. Слейтер и Боннер [2428] считали, что если построить график зависимости K_m от V, то этот график будет представлять собой прямую, отсекающую на оси ординат и оси абсцисс отрезки, равные K_s и $-k_{-1}e$ соответственно, как показано на фиг. 37. В этом легко убедиться следующим путем. По уравнению (IV.87) $K_m = K_s + k_{+2}e/k_{+1}e$. Подставляя $V = k_{+2}e$ из уравнения (IV.85), получаем

$$K_m = K_s + \frac{V}{k_{+1}e}. \qquad \text{(IV.114)}$$

Для определения абсолютных значений констант скоростей необходимо знать концентрацию фермента, но даже если она неизвестна, то можно определить отношение величин констант скоростей.

Можно было бы применить этот метод для изучения кинетики действия многих ферментов, но в настоящее время в литературе имеются только отрывочные данные, к которым он может быть применен. Слейтер [2425] применил рассматриваемый метод для анализа результатов, полученных другими исследователями, изучавшими некоторые ферменты, в частности глюкозооксидазу из плесневого гриба (1.1.3.4) и НАД·H_2-цитохром-*c*-редуктазу (1.6.2.1). Так как в этих случаях полученная прямая проходила через

начало координат, то Слейтер сделал заключение, что k_{-1} должно быть равно нулю. Однако Диксон [624] отметил, что такое заключение неправомочно для случаев, в которых флавиновая группа фермента восстанавливается субстратом и вновь окисляется, вероятно, только после диссоциации продукта. Применение кинетики стационарного состояния к такому механизму реакции показывает, что график должен всегда проходить через начало координат, при любых значениях отдельных констант скорости, а следовательно, по данному признаку нельзя делать вывод относительно величины этих констант. С этой критикой согласился и Слейтер [2426], и это означает, что следует соблюдать осторожность в выводах в тех случаях, когда графики проходят через начало координат, так как объяснение может заключаться либо в том, что $k_{-1} = 0$, либо в том, что продукт реакции освобождается на какой-то из промежуточных стадий в серии реакций.

В предыдущем разделе мы упоминали о методе Фридена, с помощью которого величину K_s для первого субстрата в двусубстратной системе определяют, экстраполируя графики зависимости обратных величин, полученные для одного из субстратов при различных концентрациях другого, до их пересечения в общей точке (фиг. 34). Майн [1693] использовал аналогичный метод получения K_s для гидролитической системы, а именно системы холинэстеразы (3.1.1.8). Графики, выражающие зависимость обратных величин скорости и концентрации при различных концентрациях бутанола (в присутствии которого скорость реакции увеличивается), пересекались при экстраполяции в точке, положение которой, по мнению автора, определяет значение K_s.

Если при действии какого-либо фермента можно пренебречь величиной k_{-1}, то следует ожидать, что любой фактор, вызывающий изменение V, будет вызывать вместе с тем пропорциональное изменение величины K_m. Результаты такого рода были получены в опытах с карбоксипептидазой А (3.4.2.1) Э. Смитом и его сотрудниками [1632], которые нашли, что при изменении в определенных пределах величины pH, концентрации D_2O и структуры субстрата параллельно изменяются и величины V и K_m.

Следует отметить, что хотя величина k_{-1} может быть мала, она, однако, никогда не может быть равна нулю для фермента, катализирующего обратимую реакцию; при течении реакции в обратном направлении скорость диссоциации продукта из комплекса с ферментом определяется величиной k_{-1}, и если бы в действительности величина k_{-1} была равна нулю, то обратная реакция не смогла бы осуществляться. Имея в виду то обстоятельство, что в большинстве ферментативных реакций субстрат и продукт представлены довольно сходными молекулами, можно с большой долей вероятности считать, что в тех случаях, когда диссоциация субстрата оказывается медленной, медленной будет также и диссоциация продукта. Другими словами, в тех случаях, когда k_{-1} представляет собой очень малую величину, будет иметь место тенденция к ограничению скорости всей ферментативной реакции скоростью этапа диссоциации продукта реакции и фермента.

Гутфрейнд [956, 957] и Рафтон [2258] разработали еще один метод для определения констант скоростей. Этот метод основывается на измерении количества продукта, образующегося в течение очень короткого начального периода времени, когда образуется фермент-субстратный комплекс и ход реакции ускоряется, т. е. до установления стационарного состояния. Начальное ускорение видно на фиг. 35, *А*; оно длится всего лишь доли секунды и измерить его можно только с помощью специальной методики.

Рассматривая систему типа, представленного уравнением (IV.81), получаем из уравнений (IV.82)

$$\frac{dp}{dt} = k_{+1}es - (k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})\,p \qquad \text{(IV.115)}$$

и из уравнения (IV.84), обозначив концентрацию продукта через z,

$$v = \frac{dz}{dt} = k_{+2}p, \tag{IV.116}$$

откуда

$$\frac{d^2z}{dt^2} = k_{+2}\frac{dp}{dt}. \tag{IV.117}$$

Из уравнений (IV.115) и (IV.117) получаем

$$\frac{d^2z}{dt^2} + \frac{dz}{dt}(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2}) - k_{+1}k_{+2}es = 0. \tag{IV.118}$$

Решение этого уравнения, которое приложимо как к начальному периоду, так и к стационарному состоянию (до тех пор, пока s можно считать существенно не изменяющимся по сравнению с его начальной величиной s_0), имеет следующий вид:

$$z = z_0 + \frac{k_{+2}s_0et}{s_0 + \frac{k_{-1}+k_{+2}}{k_{+1}}} + \frac{k_{+1}k_{+2}s_0e}{(k_{+1}s_0 + k_{-1} + k_{+2})^2}\left(e^{-(k_{+1}s_0+k_{-1}+k_{+2})t} - 1\right), \tag{IV.119}$$

где z_0 — начальная концентрация продукта (эта величина включена 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 *упрощенное уравнение, приложимое только к начальной фазе ускорения реакции*,

$$z - z_0 = \frac{k_{+1}k_{+2}es_0t^2}{2}. \tag{IV.120}$$

Таким образом, *измеряя z в течение этой начальной фазы реакции*, можно вычислить величину $k_{+1}k_{+2}e$. Путем измерения V в соответствии с уравнением (IV.85) можно получить значение $k_{+2}e$; далее можно вычислить величину k_{+1}; в то же время, определив величину K_m, мы получаем значение $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$. На основании этих величин и концентрации фермента можно рассчитать все три константы скорости.

Уравнение (IV.119) можно использовать и другим путем [957]. Если построить график зависимости $z - z_0$ от t, то получится определенной формы кривая, приведенная на фиг. 38. Кривизна ее является следствием *наличия экспоненциального члена; когда t становится достаточно большим*, так что этим членом можно пренебречь (стационарная фаза), кривая переходит в прямую (пунктирная линия на фиг. 38), описываемую уравнением

$$z - z_0 = \frac{k_{+2}s_0et}{s_0 + K_m} - \frac{k_{+2}s_0e}{k_{+1}(s_0 + K_m)^2}. \tag{IV.121}$$

Если концентрация субстрата достаточно высока для насыщения фермента (s_0 велико по сравнению с K_m), то можно воспользоваться уравнением

$$z - z_0 = k_{+2}et - \frac{k_{+2}e}{k_{+1}s_0}. \tag{IV.122}$$

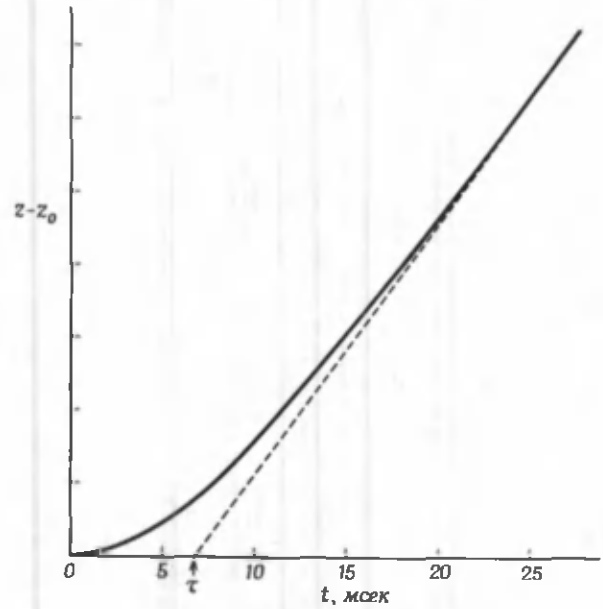
Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс (τ), который можно получить в результате подстановки $z - z_0 = 0$, равен

$$\tau = \frac{1}{k_{+1}s_0}. \tag{IV.123}$$

Таким образом, измерение τ позволяет непосредственно определить k_{+1}.

Применимость рассмотренных выше уравнений связана с допущением, что K_m выражено уравнением (IV.87) 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. Они неприменимы к системам, рассматриваемым в следующем разделе, в которых имеется два или более промежуточных комплекса. В таких случаях, например для системы, характеризуемой уравнением (IV.100), 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 в этих случаях не обязательно пропорциональна концентрации комплекса ES, и K_m характеризуется более сложным



Фиг. 38. Кинетика предстационарного состояния — метод определения k_{+1} [957].

выражением. Вполне возможно, что скорость образования продукта лимитируется одной из промежуточных стадий, например реакцией с константой скорости k_{+3}, и в этом случае величина $1/\tau$ не будет определять 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 (IV.123) 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 [956, 957] изучил ряд реакций гидролиза синтетических эфиров аминокислот, катализируемого протеолитическими ферментами. При гидролизе этилового эфира бензоил-L-аргинина трипсином (3.4.4.4) было найдено, что $k_{+1} > 4 \cdot 10^6$, а $k_{+2} = 15$ *сек*$^{-1}$. Так как $K_m = 10^{-5}$ [233], то k_{-1} должно быть больше 25 *сек*$^{-1}$; но это только минимальное значение, и возможно, что в действительности величина k_{-1} значительно превышает его. При гидролизе этилового эфира ацетил-L-фенилаланина химотрипсином (3.4.4.5) k_{+1} оказалось больше 10^6, k_{+2} было равно примерно 10 *сек*$^{-1}$ и $K_m = 10^{-4}$; поэтому k_{-1} должно быть больше 90 *сек*$^{-1}$ [959]. При гидролизе этилового эфира бензоил-L-аргинина фицином (3.4.4.12) k_{+1} было равно $5 \cdot 10^2$, $K_m = 1{,}5 \cdot 10^{-2}$ и «k_{+2}» $= 1{,}5$ *сек*$^{-1}$; отсюда k_{-1} имеет значение

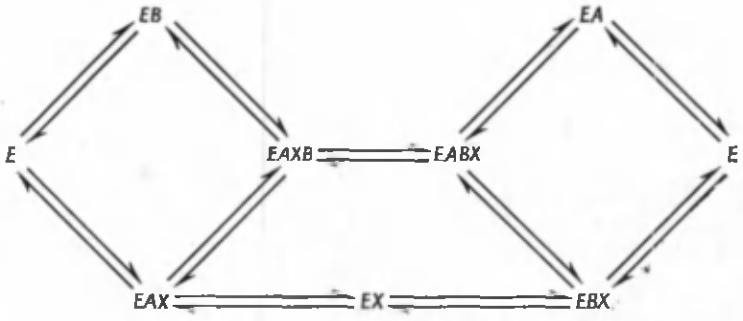
6 *сек*$^{-1}$ («k_{+2}» здесь по-прежнему константа скорости, определяющая скорость распада ES; кавычки же даны потому, что при действии фицина расщепление, вероятно, осуществляется в две стадии и скорость распада может определяться второй из них, так как «k_{+2}» имеет одинаковое значение для гидролиза амидов и для гидролиза эфиров [990]).

Можно видеть, что во всех этих случаях k_{+2} значительно меньше k_{-1}, так что K_m практически равно K_s. Совпадение может быть даже большим, чем это явствует из приведенных величин, так как, за исключением гидролиза под действием фицина, для k_{-1} были определены только минимальные значения. Можно сделать вывод, что для действия этих ферментов, особенно химотрипсина, справедливо первоначальное допущение Михаэлиса.

Следует отметить, что фаза начального ускорения реакции, с которой имеют дело в этом методе, столь кратковременна, что она не может быть обнаружена обычными способами измерений. Выражение «начальная скорость», которым мы пользовались до сих пор, относится не к этой фазе, а к стационарной скорости, устанавливающейся после образования комплекса ES.

Кинетические данные о последовательности стадий в сложной реакции

Как видно из приведенных выше данных, различным механизмам реакций соответствуют различные кинетические уравнения, и можно было бы полагать, что кинетические исследования позволят однозначно определить



Фиг. 39. Общая схема реакции при действии X-трансферазы [2905].
Суммарная реакция: AX + B ⇄ A + BX.

последовательность стадий сложной реакции. Однако ряд различных механизмов кинетически бывает весьма трудно различить. Многие авторы констатируют, что их результаты «согласуются» с определенным механизмом, но ценность этого утверждения невелика, если одновременно не показано, что полученные данные не согласуются ни с одним из других механизмов.

Для осуществления такого рода анализа необходимо систематизировать кинетические данные, характеризующие различные механизмы. Подобный подход еще только разрабатывается; недавно Уонг и Ханес [2905] провели анализ поведения двусубстратных систем. Они свели в таблицы характерные кинетические особенности двадцати трех реакционных систем, которые представляют собой частные случаи общей системы, показанной на фиг. 39.

Уонг и Ханес ввели, в частности, понятие о «степени» системы в отношении каждого из субстратов и продуктов. «Степень» в отношении данного реагента означает наибольший показатель степени концентрации данного реагента, имеющийся в уравнении скорости; она соответствует числу различных ферментсодержащих комплексов, которые реагируют с данным

реагентом. Так, например, система, приведенная на фиг. 31, является системой второй степени относительно A и B и первой степени относительно Z. Если степени системы выше первой, то графики в случаях, подобных тем, которые изображены на фиг. 18, *В*, *Г* или *Д*, не будут линейными. Теория этого вопроса быстро развивается и нет сомнения в том, что в ближайшем будущем она будет использована для кинетического анализа конкретных ферментативных реакций.

Константа равновесия суммарной реакции, выраженная через V и K_m

В обратимой односубстратной системе начальную скорость обратной реакции, как и начальную скорость прямой реакции, можно выразить уравнением Михаэлиса; тогда вся система будет характеризоваться четырьмя константами V_f, V_b, K_{mf} и K_{mb}, где индексы f и b обозначают соответственно прямую и обратную реакции. Через некоторое время такая система достигает равновесия, при котором скорости прямой и обратной реакций становятся равными. Если только величины сродства фермента к субстрату и продукту не равны, то константа равновесия K не будет равна отношению V_f/V_b; однако с помощью перечисленных выше четырех констант ее можно выразить следующим образом.

Рассмотрим в качестве примера систему, представленную реакциями (IV.97); отношение V_f/K_{mf} можно получить из уравнений (IV.98) и (IV.99), следовательно,

$$\frac{V_f}{K_{mf}} = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}e}{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}}. \qquad \text{(IV.124)}$$

Чтобы написать соответствующее выражение для обратной реакции, необходимо заменить величины k_{-3}, k_{+3}, k_{-2}, k_{+2} и k_{-1} на k_{+1}, k_{-1}, k_{+2}, k_{-2} и k_{+3} соответственно. Это приводит к выражению

$$\frac{V_b}{K_{mb}} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3}e}{k_{+2}k_{+3} + k_{-1}k_{+3} + k_{-1}k_{-2}}. \qquad \text{(IV.125)}$$

Разделив одно выражение на другое, получаем

$$\frac{V_f K_{mb}}{V_b K_{mf}} = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}}{k_{-1}k_{-2}k_{-3}} = K_1K_2K_3 = K, \qquad \text{(IV.126)}$$

где K_1, K_2, K_3 — константы равновесия трех стадий реакции (IV.97).

Это важное соотношение впервые выведено Холдейном [979, стр. 80]. Оно приложимо ко всем односубстратным системам, если только субстрат не выступает одновременно как активатор или ингибитор. В двусубстратной системе положение оказывается более сложным. В ряде случаев, например когда соблюдаются условия Михаэлиса и два субстрата взаимодействуют с ферментом независимо друг от друга, применимо уравнение, аналогичное уравнению (IV.126), а именно

$$\frac{V_f K_Y K_Z}{V_b K_A K_B} = K, \qquad \text{(IV.127)}$$

где V_f — скорость в условиях избытка обоих субстратов A и B. Для других условий могут быть получены более сложные формы типа выражения Холдейна; некоторые из них были сведены в таблицы Олберти [33] и Дальцилем [534]. В полученных выражениях фигурируют либо квадраты, либо кубы величины V_f/V_b. Если V_f значительно отличается от V_b и если известно значение K, то полученные выражения могут помочь в выяснении характера функционирующей реакционной системы. В случае неупорядоченного взаимодействия субстратов с ферментом система будет второй степени относительно субстратов и вследствие этого нельзя будет получить ни константы Михаэлиса, ни выражения Холдейна.

Интегрирование уравнений Михаэлиса

В начале этой главы мы уже говорили о том, что вследствие существования многочисленных факторов, способных влиять на скорость ферментативной реакции, трудно вывести общие уравнения, которые удовлетворительно отражали бы ход кривых такого рода реакций. Поэтому до сих пор речь шла о начальных скоростях. Однако в особом случае, когда понижение скорости в ходе реакции зависит исключительно от уменьшения насыщения фермента по мере падения концентрации субстрата, кривая хода реакции может быть найдена путем интегрирования уравнения Михаэлиса.

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

$$\frac{dy}{dt} = \frac{V(s_0 - y)}{K_m + s_0 - y}. \qquad \text{(IV.128)}$$

Интегрируя, получаем

$$Vt = \int_0^y \frac{s_0 - y + K_m}{s_0 - y} \cdot dy = y + K_m \ln \frac{s_0}{s_0 - y}. \qquad \text{(IV.129)}$$

Уравнение такого вида было предложено в 1902 г. Анри [1065]. 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 определение начальной скорости реакции затруднено. Преобразуя, получаем

$$\frac{2{,}303}{t} \lg \frac{s_0}{s_0 - y} = \frac{V}{K_m} - \frac{1}{K_m} \cdot \frac{y}{t}. \qquad \text{(IV.130)}$$

Таким образом, если величину y измерить через определенные промежутки времени и построить график зависимости $\frac{2{,}303}{t} \lg \frac{s_0}{s-y}$ от y/t, то получим прямую с наклоном $-1/K_m$, отсекающую на оси абсцисс отрезок, по величине которого можно будет определить V. Ту же самую прямую можно получить по данным определений, проведенных через определенный промежуток времени от начала реакции, но в условиях различных значений s_0. Поэтому на одном и том же графике могут быть отложены данные измерений для различных величин t и s_0. На фиг. 40 приведены изображенные по этому методу [2762] результаты серии опытов с гистидин — аммиак-лиазой (4.3.1.3). В незначительной модификации метод был применен также для изучения действия тестостерон-17-β-дегидрогеназы (1.1.1.j) [2582].

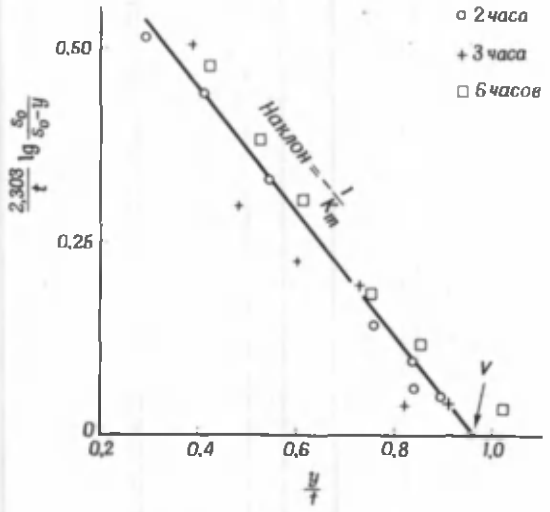
Подобно самому уравнению Михаэлиса, уравнение (IV.129) сокращается до простой формы, когда s_0 становится либо очень большим, либо очень малым. Если s_0 очень велико по сравнению с y и с K_m, то $Vt = y$. Это соответствует характеризующемуся постоянной скоростью участку нулевого порядка в начале кривой хода реакции при высокой концентрации субстрата. Если s_0 (а следовательно, и y) очень мало по сравнению с K_m, то получаем обычное уравнение реакции первого порядка

$$\frac{2{,}303}{t} \lg \frac{s_0}{s_0 - y} = \frac{V}{K_m}. \qquad \text{(IV.131)}$$

Для данного эксперимента величина V/K_m постоянна. Таким образом, при очень низкой концентрации субстрата реакция подчиняется уравнению первого порядка с константой скорости V/K_m. Это, конечно, не дает возможности определить V и K_m по отдельности. Поэтому специфичность ферментов нельзя выразить через константы скорости реакций первого порядка, полученные в опытах с различными веществами; этот способ не дает ответа

на вопрос о том, чем объясняются наблюдаемые различия: влиянием данного фактора на сродство фермента к субстрату или его влиянием на скорость превращения.

Уравнение (IV.131) приложимо только в ограниченных условиях. Чтобы убедиться в том, что измерения проводятся именно в таких условиях,



Фиг. 40. Использование уравнения Михаэлиса в интегральной форме для определения V и K_m [2762].

Фермент — гистидин — аммиак-лиаза (4.3.1.3). Ход реакции определяли по образованию NH_3 в течение трех интервалов времени при различных начальных концентрациях субстрата.

следует построить график зависимости $\lg \frac{s_0}{s_0 - y}$ от t (см. [685]). Если уравнение применимо, то получается прямая и могут быть использованы константы реакции первого порядка; если же получается линия с заметной кривизной, то необходимо использовать уравнение (IV.129).

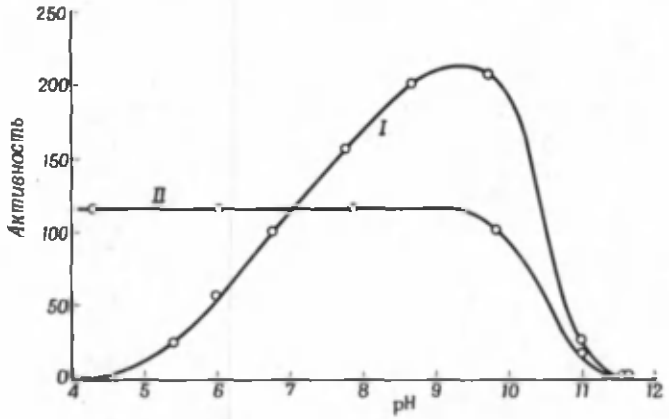
В. ВЛИЯНИЕ pH

Ферменты вообще 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 обратимое 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 по одну или по обе стороны от оптимума pH. 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 исходному стандартному значению. На фиг. 41 приведены результаты опытов такого рода для моноаминоксидазы (1.4.3.4), из которых видно, что падение активности в щелоч-

ной зоне (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,



Фиг. 41. Влияние pH на активность моноаминоксидазы (1.4.3.4) [1004].
I — активность при значениях pH, указанных на оси абсцисс; *II* — активность при pH 7,3 после инкубации в течение 5 мин при значениях pH, указанных на оси абсцисс.

чтобы насытить фермент при всех изучаемых значениях pH. Так как величина сродства может значительно изменяться при сдвиге pH, то мы отнюдь не вправе считать, что концентрация субстрата, достаточная для насыщения фермента при одном из значений pH, будет также достаточной для его насыщения и при других значениях pH. Чтобы определить влияние изменений собственно pH на активность фермента, необходимо получить достаточное количество данных по зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при каждом значении pH, а затем с помощью одного из графических методов, обсуждавшихся в гл. II, найти значения V и K_m. Большинство приводимых в литературе кривых, характеризующих влияние pH на активность фермента, представляет собой сложные кривые, форма которых зависит частично от изменений V и частично от изменений K_m. Кривые, демонстрирующие влияние изменений pH на V, очень редки. Среди небольшого числа примеров можно отметить данные, полученные для прямой и обратной реакций в системах фумаратгидратазы (4.2.1.2) [2990] и холинэстеразы (3.1.1.8) [1019] (фиг. 46 и 47), и данные для папаина (3.4.4.10) при трех значениях температуры [2997].

Влияние pH на активность ферментов, подобно всем другим видам влияния pH, осуществляется путем изменения в состоянии ионизации отдельных компонентов системы при изменении pH. Такие изменения может претерпевать свободный фермент, фермент-субстратный комплекс или субстрат. Так как ферменты представляют собой белки, в молекуле которых содержится большое число ионизирующихся групп, то они существуют в виде целой серии различных ионных форм, причем распределение всего количества фермента между этими ионными формами зависит от pH и от констант ионизации различных групп. Поскольку, однако, каталитическая

активность наблюдается обычно в относительно небольшом интервале значений pH, можно думать, что только одна из ионных форм фермента (или, точнее, его активного центра) каталитически активна, как это и предполагали Михаэлис и Дэвидсон [1814] 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, оказывает очень большое влияние.

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 поблизости от него, а именно тех групп, которые в первую очередь будут ионизироваться (или, наоборот, деионизироваться) при сдвиге pH в кислую или щелочную сторону от оптимума. Эти группы иногда обозначают как кислую и основную группы фермента. Мы не будем рассматривать другие возможные процессы ионизации, возникающие при сдвиге pH 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, по-видимому, маловероятно, чтобы в активном центре присутствовало одновременно более одной такой группы. В силу рассмотренных выше обстоятельств влияние pH на скорость ферментативных реакций обсуждают часто с учетом только двух ионизирующихся групп, используя при этом уравнения, приложимые к двуосновным кислотам или простым амфолитам, хотя, без сомнения, такой подход является слишком упрощенным.

pH-функции Михаэлиса

Чтобы облегчить дальнейшее обсуждение вопроса о влиянии pH на активность ферментов и упростить уравнения, рассмотрим вначале свойства некоторых pH-функций, которые играют доминирующую роль в рассматриваемом вопросе. Михаэлис в 1913 г. первым обратил внимание на важность этих функций [1812, стр. 48]. pH-функции Михаэлиса определяются следующим образом:

$$f = 1 + \frac{K_1}{H} + \frac{K_1 K_2}{H^2}, \qquad \text{(IV.132)}$$

$$f^- = 1 + \frac{H}{K_1} + \frac{K_2}{H}, \qquad \text{(IV.133)}$$

$$f^{2-} = 1 + \frac{H}{K_2} + \frac{H^2}{K_1 K_2}, \qquad \text{(IV.134)}$$

где H — концентрация ионов водорода [1].

Эти функции описывают поведение веществ, имеющих две стадии ионизации с константами K_1 и K_2, например поведение симметричной двуосновной кислоты AH_2, такой, как янтарная кислота, которая существует в трех формах:

$$AH_2 \underset{\leftarrow}{\overset{K_1}{\rightarrow}} AH^- \underset{\leftarrow}{\overset{K_2}{\rightarrow}} A^{2-}. \qquad \text{(IV.135)}$$

---

[1] Мы будем использовать в этой книге просто термин «ион водорода», а не такие термины, как «протон», «ион оксония», «ион гидрония», «ион гидроксония» и т. д. Три последних термина относятся к гидратированной форме иона водорода, т. е. к OH_3^+. В химической термодинамике принято не учитывать гидратацию реагирующих веществ; поэтому, хотя в водных растворах ион водорода существует в гидратированной форме [988, стр. 41], в уравнениях, в которых участвует этот ион, мы используем символ H^+, а не OH_3^+.

Следует отдавать себе отчет в том, что K_1 и K_2 характеризуют первую и вторую ступень ионизации молекулы и определяются уравнениями (IV.137); они не являются константами ионизации индивидуальных карбоксильных групп. Важность этого разграничения станет ясной позже.

Для обозначения суммы концентраций всех различных форм данного вещества удобно использовать индекс t; так, для системы (IV.135) имеем

$$A_t = [AH_2] + [AH^-] + [A^{2-}]. \qquad (IV.136)$$

Отсюда, подставляя определения констант

$$K_1 = \frac{[AH^-]\,H}{[AH_2]}, \quad K_2 = \frac{[A^{2-}]\,H}{[AH^-]} = \frac{[A^{2-}]\,H^2}{[AH_2]\,K_1}, \qquad (IV.137)$$

получаем

$$A_t = [AH_2]\left(1 + \frac{K_1}{H} + \frac{K_1K_2}{H^2}\right) = [AH_2]\cdot f, \qquad (IV.138)$$

$$A_t = [AH^-]\,f^-, \qquad (IV.139)$$

$$A_t = [A^{2-}]\,f^{2-}. \qquad (IV.140)$$

Таким образом, количество какой-либо ионной формы вещества находят путем деления всего количества вещества на значение соответствующей pH-функции.

Все три pH-функции взаимосвязаны, и для дальнейшего рассмотрения удобно выразить отношения между этими функциями и тремя различными формами вещества в следующем виде:

$$\begin{aligned} A_t &= [AH_2]\cdot f = [AH_2]\cdot f^- \frac{K_1}{H} = [AH_2]\cdot f^{2-}\frac{K_1K_2}{H^2} \\ &= [AH^-]\cdot f\frac{H^2}{K_1} = [AH^-]\cdot f^- = [AH^-]\cdot f^{2-}\frac{K_2}{H} \\ &= [A^{2-}]\cdot f\frac{H^2}{K_1K_2} = [A^{2-}]\cdot f^-\frac{H}{K_2} = [A^{2-}]\cdot f^{2-}. \end{aligned} \qquad (IV.141)$$

На фиг. 42, *А* изображены кривые зависимости $1/f$, $1/f^-$ и $1/f^{2-}$ от pH (напомним, что $1/f$, $1/f^-$ и $1/f^{2-}$ пропорциональны количеству неионизированной, неполностью ионизированной и полностью ионизированной форм вещества). При построении этих графиков исходили из допущения, что $K_1 = 10^{-5}$, а $K_2 = 10^{-10}$. Подобные кривые могут быть получены для любой системы с двумя последовательными стадиями ионизации; они отражают ход ионизации не только двуосновных кислот, у которых промежуточная форма имеет один отрицательный заряд, но могут столь же успешно характеризовать ионизацию аминокислоты, у которой промежуточная форма представляет собой диполярный ион с нулевым суммарным зарядом. Кривая для промежуточной формы ($1/f^-$) может вполне представлять долю той фракции фермента, которая находится в каталитически активной ионной форме, даже если мы и не знаем, каким именно зарядом эта форма обладает. Действительно, именно сходство между такими кривыми и кривыми, характеризующими зависимость активности многих ферментов от pH, и привело Михаэлиса и Дэвидсона к построению соответствующей теории.

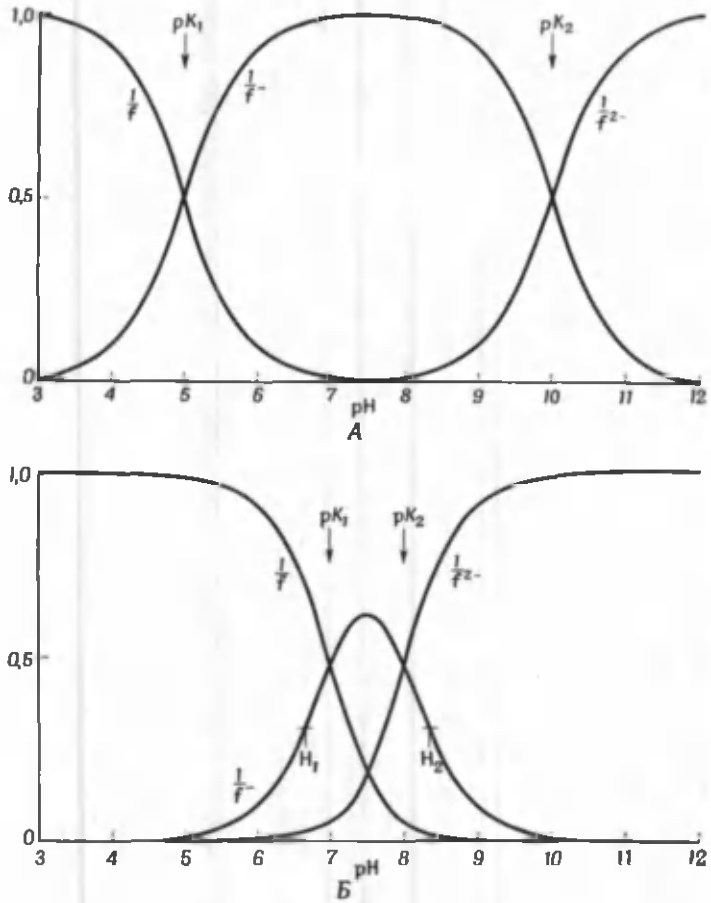
Кривая для промежуточной формы достигает максимума при значении pH (pH_0, соответствующее оптимуму pH в случае фермента), находящемся посредине между двумя величинами pK [1]. Это означает, что

$$H_0 = \sqrt{K_1K_2}. \qquad (IV.142)$$

Если величины pK значительно различаются, как в рассматриваемом случае (фиг. 42, *А*), то при pH_0 практически все вещество будет находиться

[1] $pK = -\lg K$.

в промежуточной форме; дело, однако, обстоит иначе, если константы почти равны по величине, как это показано на фиг. 42, *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 из pH-функций равны 1 и все три формы вещества присутствуют в равных количествах.



Фиг. 42. Характер изменения pH-функций при изменении pH.

А. Изменение величин, обратных pH-функциям, для системы с двумя ионизирующимися группами, у которых pK равно 5 и 10. *Б*. Изменение величин, обратных pH-функциям, для симметричной системы с pK 7 и 8.

В том случае, когда величины 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 фиг. 42, *А*. Если же величины pK весьма близки, то этот метод расчета неприложим, так как он приводит к большим ошибкам, как это видно из фиг. 42, *Б*. Правило для определения в таких случаях величин K предложили Олберти и Массей [38]; они вывели его из уравнений, описывающих действие ферментов, но это правило является общим и может быть легко выведено из определения величины f^- следующим образом. Из уравнений (IV.133) и (IV.142) сле-

дует, что высота пика кривой $1/f^-$ при pH_0 имеет значение

$$\frac{1}{f_0^-} = \frac{1}{1+2\sqrt{\frac{K_2}{K_1}}}. \qquad (IV.143)$$

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

$$\frac{1}{f^-} = \frac{K_1 H}{K_1 H + H^2 + K_1 K_2} = \frac{1}{2+4\sqrt{\frac{K_2}{K_1}}}. \qquad (IV.144)$$

Это выражение можно упростить до

$$H^2 - (K_1 + 4H_0)H + H_0^2 = 0. \qquad (IV.145)$$

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

$$H_1 + H_2 = K_1 + 4H_0. \qquad (IV.146)$$

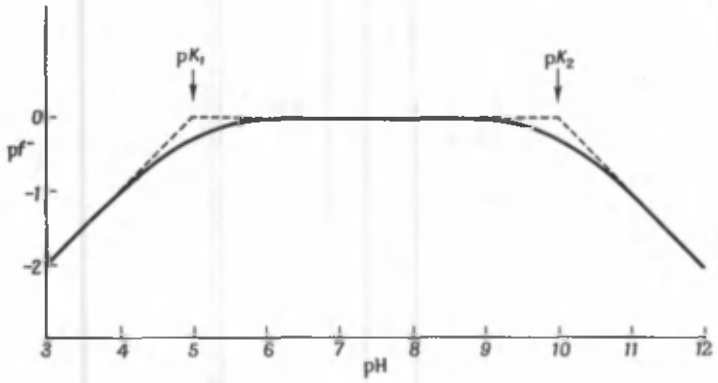
Это простое правило дает возможность вычислить K_1, поскольку нам известны величины концентраций ионов водорода в точках, соответствующих максимуму нашей функции, и в обеих точках, соответствующих половине максимума. K_2 после этого может быть определено из уравнения (IV.142). Рассмотренный метод весьма ценен для определения величин 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 фиг. 42, *Б* как иллюстрацию применения изложенного выше метода, отмечаем, что если ориентироваться только на «средние точки» обеих ветвей кривой для $1/f^-$, то величины pK окажутся равными 6,64 и 8,36 вместо истинных значений 7,0 и 8,0. Однако, применяя правило (IV.146), 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 $1{,}00 \cdot 10^{-7}$.

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 величинами двух других членов, как сравнительно очень малыми, можно пренебречь. В случае, приведенном на фиг. 42, *А* (уравнение IV.133), 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 доминирующим является второй член. При pH 7 второй и третий члены имеют значения 10^{-2} и 10^{-3} соответственно и оба они малы по сравнению с 1; при pH 12 второй член равен 10^{-7}, а третий член равен 100, что в сравнении с двумя другими членами можно рассматривать как большую величину. Между этими областями имеются ограниченные участки, где одновременно два члена pH-функции определяют ее значение.

Если построить график зависимости $-\lg f^-$ (который мы будем называть pf^- и который равен $\lg \frac{1}{f^-}$) от pH, то полученный график 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 участкам, 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 выражаться прямой 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 $pf^- = -\lg \frac{K_2}{H} = pK_2 - pH$ и график имеет наклон -1, а в области pH 7 pf^- не зависит от pH, как это видно на фиг. 43. Легко показать,



Фиг. 43. График зависимости $pf^- = -\lg f^- = \lg 1/f^-$ от pH для системы, изображенной на фиг. 42, *А*.

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 приложимы, конечно, и к графикам, изображающим зависимость pf и pf^{2-} от pH; в этих двух случаях последние члены функций будут обусловливать на графиках наклоны прямой, равные двум единицам, так как эти члены содержат H во второй степени. Диксон [618, 621] 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.

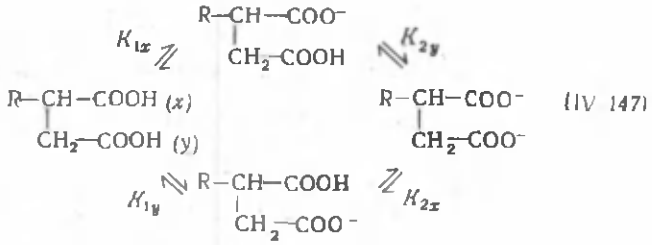
Возвращаясь к pH-функциям Михаэлиса для двуосновных кислот, отметим попутно недостаточную уясненность того обстоятельства (отмеченного Адамсом [15] еще в 1916 г.), что K_1 и K_2 относятся к первой и второй *стадиям* ионизации молекулы и не являются константами ионизации отдельных групп. Важность этого разграничения недостаточно очевидна для симметричных двуосновных кислот, рассмотренных Михаэлисом, так как в этих случаях образуется один и тот же анион, какая бы карбоксильная группа ни подверглась ионизации. В этих условиях могут существовать только три формы вещества. Однако у асимметричной молекулы, такой, как

$$\begin{array}{l} R-CH-COOH\ (x) \\ \quad\quad | \\ \quad CH_2-COOH\ (y) \end{array}$$

в которой можно различить две карбоксильные группы, обозначенные буквами x и y, могут существовать две различные промежуточные формы, а именно однозарядные анионы, образованные в результате ионизации x-

и y-групп соответственно. Такое вещество имеет не три, а четыре возможные формы существования. При титровании совершенно 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 или второй стадии ионизации; поэтому для характеристики полной ионизации асимметричной двуосновной кислоты необходимо знать четыре константы ионизации, а именно



(IV.147)

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 уравнения, определяющие четыре константы ионизации групп:

$$K_{1x} = \frac{[AH_x^-]\,H}{[AH_2]}, \quad K_{1y} = \frac{[AH_y^-]\,H}{[AH_2]}, \quad K_{2x} = \frac{[A^{2-}]\,H}{[AH_y^-]}, \quad K_{2y} = \frac{[A^{2-}]\,H}{[AH_x^-]}. \quad \text{(IV.148)}$$

Из этих уравнений следует, что

$$K_{1x}K_{2y} = K_{1y} = K_{2x}. \quad \text{(IV.149)}$$

Отношения 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 $[AH_x^-] + [AH_y^-]$ вместо $[AH^-]$ в определения K_1 и K_2 (уравнения IV.137), получаем (см. Адамс [15])

$$K_1 = \frac{([AH_x^-] + [AH_y^-])\,H}{[AH_2]} = K_{1x} + K_{1y}, \quad \text{(IV.150)}$$

$$K_2 = \frac{[A^{2-}]\,H}{[AH_x^-] + [AH_y^-]} = \frac{1}{\frac{1}{K_{2x}} + \frac{1}{K_{2y}}}. \quad \text{(IV.151)}$$

В свете этих результатов интересно вновь рассмотреть случай диссоциации симметричной двуосновной 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 (IV.150) и (IV.151) следует, что $K_1 = 4K_2$. Больше того, для симметричных кислот, рассмотренных Михаэлисом, из уравнения (IV.150) следует, что первая константа ионизации молекулы K_1 равна

удвоенной истинной константе ионизации карбоксильной группы (основанием для этого служит то, что 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 данными наблюдений; приведенные выше данные достаточны для того, чтобы показать важность разграничения между константами двух типов.

При рассмотрении асимметричной молекулы двуосновной кислоты теперь потребуется четыре pH-функции, чтобы определить количество каждой из четырех форм существования молекулы. Подставляя определения четырех констант ионизации групп (уравнения IV.148) в суммирующее уравнение

$$A_t = [AH_2] + [AH_x^-] + [AH_y^-] + [A^{2-}] \qquad \text{(IV.152)}$$

и используя уравнение (IV.149), получаем новые pH-функции:

$$f = 1 + \frac{K_{1x}}{H} + \frac{K_{1y}}{H} + \frac{K_{1x}K_{2y}}{H^2}, \qquad \text{(IV.153)}$$

$$f_x^- = 1 + \frac{K_{1y}}{K_{1x}} + \frac{H}{K_{1x}} + \frac{K_{2y}}{H}, \qquad \text{(IV.154)}$$

$$f_y^- = 1 + \frac{K_{1x}}{K_{1y}} + \frac{H}{K_{1y}} + \frac{K_{1x}K_{2y}}{K_{1y}H}, \qquad \text{(IV.155)}$$

$$f^{2-} = 1 + \frac{H}{K_{2y}} + \frac{K_{1y}H}{K_{1x}K_{2y}} + \frac{H^2}{K_{1x}K_{2y}}. \qquad \text{(IV.156)}$$

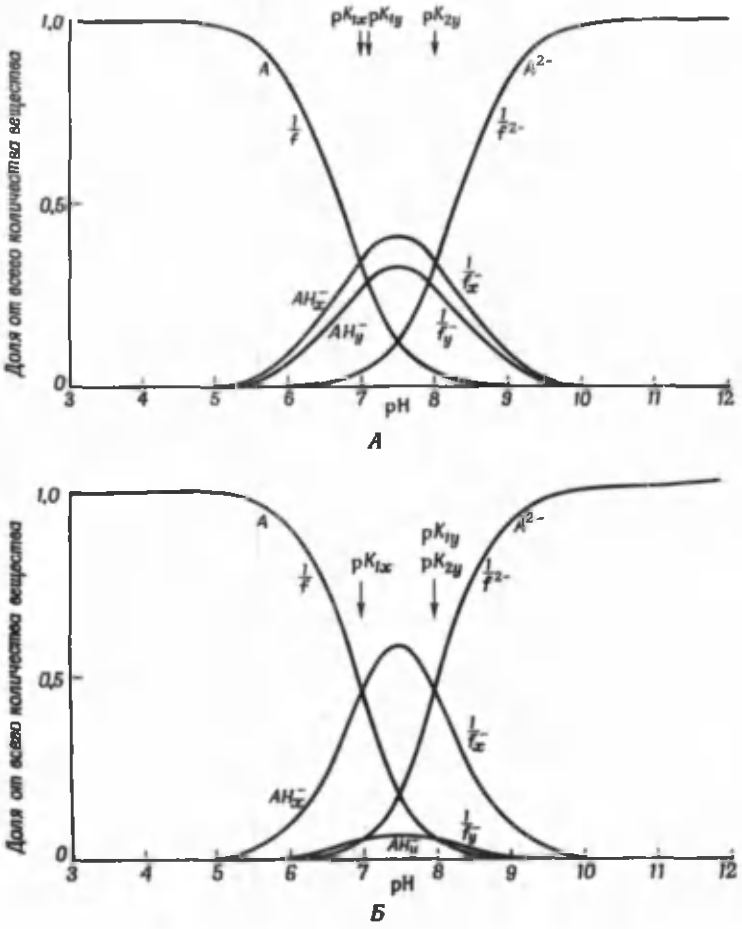
Как и прежде, величины, обратные этим функциям, будут характеризовать доли всего количества вещества, находящиеся в соответствующих состояниях ионизации.

Эти функции важны только в том случае, когда две ионизирующиеся группы не слишком отличаются друг от друга по степени своей ионизации, как это, вероятно, и бывает в активных центрах ферментов. Если же величины pK заметно различаются (см., например, фиг. 42, *А*), то необходимости в использовании новых pH-функций не возникает. В этом можно убедиться, если принять в приведенных выше уравнениях K_{1x} значительно большим, чем K_{1y}. Тогда найдем, что выражения для f, f_x^- и f^{2-} упрощаются до выражений, идентичных по форме трем функциям Михаэлиса (IV.132 — IV.134), 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 (в округленных величинах) можно принять pK_{1x} (карбоксильной группы) равным 3 и pK_{1y} (аминогруппы) равным 10. Единственной промежуточной формой оказывается здесь диполярный ион; количество же незаряженной формы ничтожно мало, и, следовательно, к этому случаю приложимы выражения для pH-функций Михаэлиса.

Следует еще раз отметить, что приложимость pH-функций, учитывающих константы ионизации групп, не зависит от химической природы ионизирующихся групп; их приложимость 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 $1/f_{\bar{x}}$ может, например, очень хорошо отражать влияние pH на количество активной формы фермента и таким образом соответствовать графику зависимости активности от pH.

Величины, обратные величинам четырех pH-функций (которые определяют доли всего количества вещества, присутствующие в соответствующих четырех формах), отложены по оси ординат на графике фиг. 44; K_{1x} и K_{2y} приняты равными соответственно 10^{-7} и 10^{-8}. Относительные количества



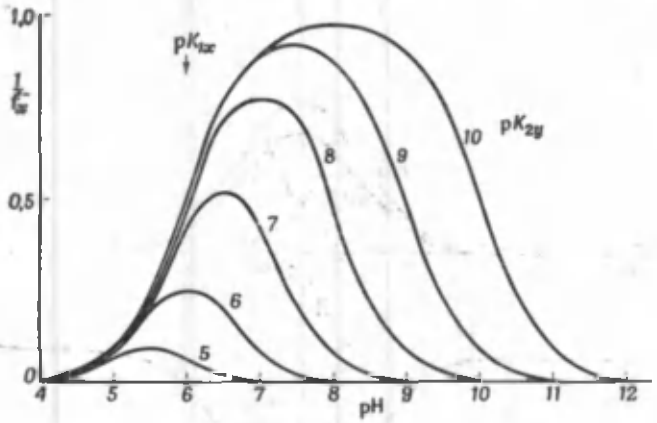
Фиг. 44. Изменение величин, обратных pH-функциям, в зависимости от pH для несимметричной системы с указанными значениями pK.

двух промежуточных форм зависят от отношения величин K_{1x} и K_{1y}; на фиг. 44, *А* $K_{1x} \approx K_{1y}$, а на фиг. 44, *Б* $K_{1y} = K_{2y}$. В случае, изображенном на фиг. 44, *А*, речь может идти о молекуле с двумя сходными группами, между которыми существует некоторое взаимодействие; в случае, изображенном на фиг. 44, *Б*,— о молекуле с двумя различными группами, между которыми не существует взаимодействия. Кривые для обеих промежуточных форм расположены в одной и той же области pH, имеют, как и прежде, максимумы при pH_0 и характеризуются той же общей 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 pH-функций становится равным 1 и каждая ионная форма будет составлять $^1/_4$ общего количества вещества. В этом случае

общее количество промежуточной формы будет составлять $^1/_2$ общего количества вещества, а не $^1/_3$, как прежде (когда K_1 принималось равным K_2).

Если использовать символ x для более сильно ионизирующейся группы, то тогда величина K_{1y} будет лежать между величинами 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.

Семейство кривых для функции $1/f_x^-$, приведенное на фиг. 45, показывает влияние изменения pK_{2y} при постоянном pK_{1x} на количество промежуточной формы (например, на количество активной формы фермента; в этом случае ординаты могут представлять скорость ферментативной реакции). Эта картина очень сходна с изменением кривых, характеризующих зависимость активности ферментов от pH, под влиянием определенных групп



Фиг. 45. Зависимость количества одной из промежуточных форм от pH при изменении pK одной из ионизирующихся групп и постоянном значении pK другой ионизирующейся группы [38].

pK_{1x} постоянно и равно 6; значения pK_{2y} приведены на кривых. Кривые построены по уравнению (IV.154).

ингибиторов (ср., например, [1911, фиг. 1]). Если обе константы K_{1x} и K_{2y} равны, то максимальная высота кривой будет соответствовать $^1/_4$ всего количества вещества. Рассматриваемые кривые напоминают семейство кривых, приведенных Олберти и Массеем [38, фиг. 1], однако эти авторы пользовались константами K_1 и K_2 и потому у них максимальная высота кривой (при равенстве констант) соответствовала $^1/_3$ всего количества вещества. Так как мы рассматриваем изменение активности ферментов под влиянием факторов, оказывающих влияние на определенные группы ферментов, а не результаты титрования, то мы полагаем, что в этом случае предпочтительно пользоваться константами ионизации групп. Графики pH-функций, показывающие влияние одновременного изменения обеих констант ионизации амфолита, были рассмотрены значительно раньше Михаэлисом [1812].

В последующих разделах в тех случаях, когда функции обозначены просто через f и т. д., подразумевается, что используются соответствующие выражения для этих функций.

Влияние pH на V

Как уже упоминалось выше, влияние pH только на V можно определить путем проведения серии измерений скорости ферментативной реакции при различных значениях pH в условиях, когда концентрация субстрата достаточно высока для постоянного насыщения фермента. Таким образом исключается какое-либо влияние pH на сродство фермента к субстрату. В этих

условиях весь фермент находится в форме комплекса ES, и так как скорость ферментативной реакции является в конечном счете скоростью распада комплекса на свободный фермент и продукт, то влияние pH 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 влияние на K_m элиминируется благодаря использованию высоких концентраций субстрата. Эти предпосылки значительно облегчают обсуждение вопроса.

Напомним уравнение $v = k_{+2}p$ (IV.84), где p — концентрация комплекса ES; в присутствии избытка субстрата p становится равным концентрации всего фермента, т. е. $V = k_{+2}e$ (уравнение IV.85). Величина p равна сумме концентраций всех ионных форм комплекса, поэтому ее можно обозначить также через p_t (=*общая концентрация комплекса*). Но так как мы уже часто использовали p 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 pH. Это изменение вызвано тем обстоятельством (на мысль о нем наводит уже рассмотрение кривых, характеризующих зависимость активности от pH), что распадается только одна ионная форма комплекса (или по крайней мере только одна форма распадается более быстро, чем какая-либо другая) и что доля всего комплекса, находящаяся в этой форме, изменяется с изменением pH. Таким образом, k_{+2} определяется двумя величинами: константой скорости распада определенной ионной формы комплекса (которая не зависит от pH и которую мы обозначим через $\bar{k}_{+2}$) и соответствующей pH-функцией, которая определяет концентрацию этой ионной формы при данном значении pH. Тот факт, что скорость реакции падает по обе стороны от оптимума pH, указывает, что активное состояние является промежуточной ионной формой, так что участвующая в выражении для k_{+2} pH-функция представляет собой по форме выражение для f^- (уравнение IV.133). Таким образом, имеем

$$k_{+2} = \frac{\bar{k}_{+2}}{f_{es}^-}, \qquad \text{(IV.157)}$$

где индекс es относится к комплексу ES. Так как нам не известна природа ионизирующихся групп фермента, которые влияют на его активность или определяют активную ионную форму комплекса, то будет удобно обозначить последнюю через ES^n (ср. [38]), где n — суммарный отрицательный заряд, который несет активная форма. Тогда

$$v = \bar{k}_{+2}\frac{p}{f_{es}^-}, \qquad \text{(IV.158)}$$

где $\bar{k}_{+2}$ — константа скорости распада ES^n, p/f_{es}^- — концентрация ES^n. Выражение для V получаем при подстановке $p = e$, и оно может быть представлено как

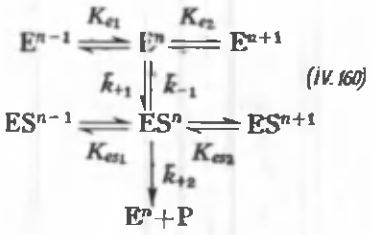
$$V = \frac{\bar{k}_{+2}e}{1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}}, \qquad \text{(IV.159)}$$

где K_{es1} — константа ионизации комплекса, которая определяет «кислую» ветвь кривой pH—активность, и K_{es2} — константа ионизации, определяющая «щелочную» ветвь этой кривой. Аналогичное уравнение было введено Валеем [2760].

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 равно-

весии между собой. Принимая во внимание природу процессов, это допущение, по-видимому, можно считать справедливым. Лайдлер [1504] вывел полные уравнения, не делая этого упрощения, но полученные им уравнения слишком сложны и приобретают практическую ценность опять-таки лишь при указанном допущении.

Рассматриваемая система может быть представлена в следующем виде (ср. [38]):



Каждая из трех констант скорости относится к определенной ионной форме, участвующей в реакции.

При выведении уравнения (IV.159) мы допускали, что распадается только одна из форм комплекса ES, но можно предположить, что будут распадаться с одинаковыми или различными 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 pH — 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 pH — активность будет иметь сложную форму с двумя ступенями (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 зоне pH, в которой ES^n и ES^{n+1} существуют вместе (т. е. в зоне, где H — величина того же порядка, что и K_{es2}), f_{es}^- приближается к значению $1 + \frac{K_{es2}}{H}$, а f_{es}^{2-} — к значению $1 + \frac{H}{K_{es2}}$; поэтому можно написать

$$v = \bar{k}_{+2}\frac{p}{f_{es}^-} + \bar{\bar{k}}_{+2}\frac{p}{f_{es}^{2-}} = \bar{k}_{+2}\,p\left(\frac{1}{1+\frac{K_{es2}}{H}} + \frac{1}{1+\frac{H}{K_{es2}}}\right) = \bar{k}_{+2}\,p. \qquad \text{(IV.161)}$$

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 pH — 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 $\bar{k}_{+2}$ и $\bar{\bar{k}}_{+2}$, 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

$$ES^n \rightarrow E^n + P$$

и

$$ES^{n+1} + H^+ \longrightarrow E^n + P.$$

Тогда скорость реакции будет выражаться уравнением

$$v = \tilde{k}_{+2} \frac{p}{f_{es}^{-}} + \tilde{k}_{+2}^{-} \frac{p}{f_{es}^{2-}} H. \qquad (IV.162)$$

Однако из уравнений (IV.141) имеем, что $H/f^{2-} = K_2/f^-$, так что

$$v = (\tilde{k}_{+2} + \tilde{k}_{+2}^{-} K_{es2}) \frac{p}{f_{es}^{-}}. \qquad (IV.163)$$

Это уравнение скорости имеет тот же вид, что и (IV.158), за исключением того, что одна константа заменена другой. Таким образом, и в данном случае влияние pH 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 различными скоростями вследствие влияния дополнительного заряда.* Это приводит к уравнению

$$v = \tilde{k}_{+2} \frac{p}{f_{es}^{-}} + \tilde{k}_{+2}^{-} \frac{p}{f_{es}^{2-}}, \qquad (IV.164)$$

которое не сокращается до более простой формы таким же образом, как уравнение (IV.161), если $\tilde{k}_{+2}$ и $\tilde{k}_{+2}^{-}$ заметно различны.

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 выражалась бы уравнением

$$v = \tilde{k}_{+2} H \frac{p}{f_{es}^{-}}. \qquad (IV.165)$$

Обращаясь теперь еще раз к уравнениям (IV.141), находим, что $H/f^- = K_1/f$, так что

$$v = \tilde{k}_{+2} K_{es1} \frac{p}{f_{es}}. \qquad (IV.166)$$

Таким образом, в предполагаемом варианте получаем такое выражение для скорости, как если бы распадался комплекс ES^{n-1}, а комплекс E^n не распадался.

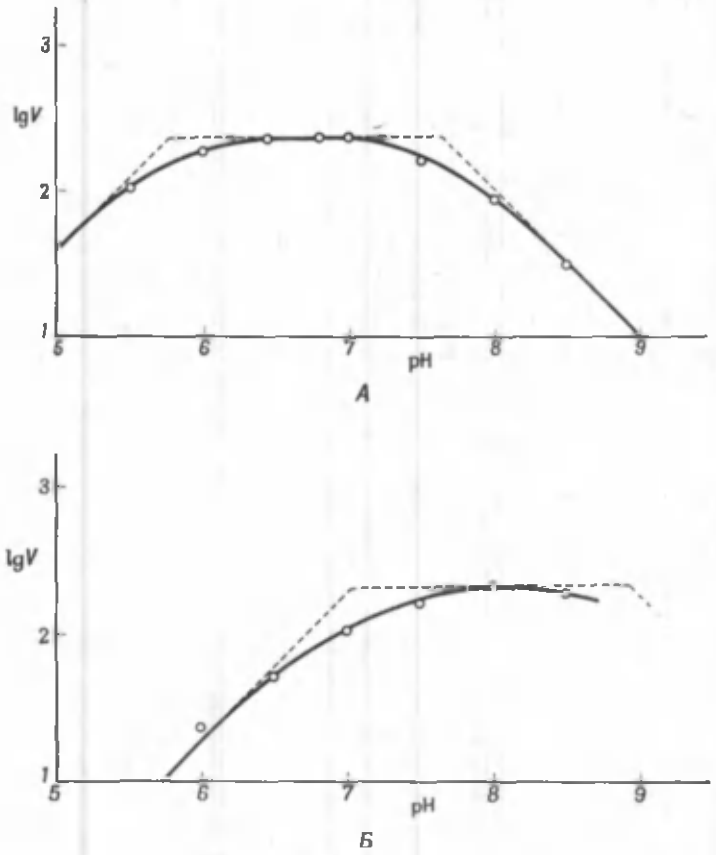
Возвращаясь теперь к уравнению (IV.159), отметим, что если построить график зависимости $\lg V$ от pH, то этот график по своему типу будет аналогичен тому, который изображен на фиг. 43, так как

$$\lg V = \lg \tilde{k}_{+2} e + p f_{es}^{-}. \qquad (IV.167)$$

В рассматриваемом выражении первый член справа не зависит от pH. Это уравнение позволяет по положению перегибов на кривой определить *величины 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 от $1/H$, в зависимости от обстоятельств). Этот метод применим только в том случае, если



Фиг. 46. Зависимость $\lg V$ от pH для фумаратгидратазы (4.2.1.2) [2990].
А. Субстратом служит фумарат. Б. Субстратом служит малат.

ионизация других групп не изменяется в пределах рассматриваемой зоны pH. Если это условие выполняется, то одним из двух членов (H/K_{es1} или K_{es2}/H) в уравнении (IV.159) 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 $K_{es2}/\tilde{k}_{+2}e$, отсекающую на оси ординат отрезок, равный $1/\tilde{k}_{+2}e$. Таким образом, по наклону прямой и величине отрезка, отсекаемого на оси ординат, могут быть определены K_{es1} или K_{es2}. Этот метод определения величин pK использовался Лайдлером [1505] и другими исследователями.

К сожалению, как мы уже упоминали, получено очень мало данных о влиянии pH на V. Хотя в литературе и имеются 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 (4.2.1.2) [2990]. По этим данным построены кривые pH — lg V, приведенные на фиг. 46, для двух субстратов — фумарата и малата. Из этих кривых видно, что фермент-фумаратный комплекс характеризуется величинами 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 величины pK, но следует иметь в виду, что фумараза представляет собой фермент, который обладает особым свойством: она чувствительна к анионам, и потому на характер кривых pH — lg V значительное влияние оказывает присутствие солей.

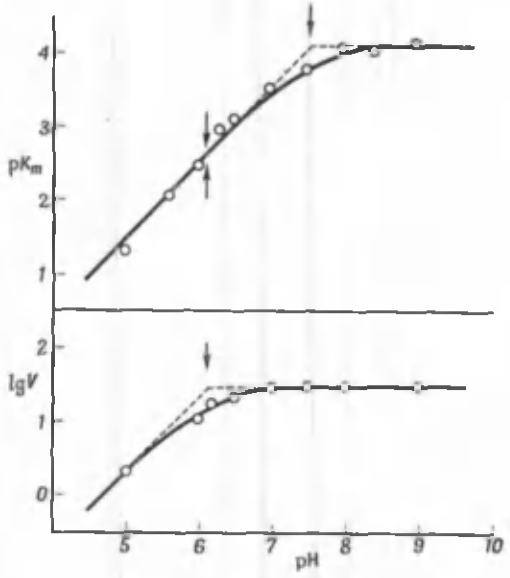
Лайдлер [1505] построил по литературным данным кривые pH — lg V для холинэстеразы (3.1.1.8) [1019] и для ксантиноксидазы (1.2.3.2), действующей на 2-амино-4-окситеридин [1622]; эти кривые приведены на фиг. 47 и 48. В обоих случаях в изучавшейся области pH наблюдается только одно pK для комплекса ES и отсутствует оптимальный pH для V, которое просто увеличивается до некоего постоянного максимального значения.

Весьма необходимы дальнейшие работы по определению величины pK фермент-субстратных комплексов. В результате сравнения величин pK комплексов с величинами pK свободных ферментов и субстратов могут быть получены интересные данные о том влиянии, которое оказывает на молекулу субстрата соединение с активным центром фермента.

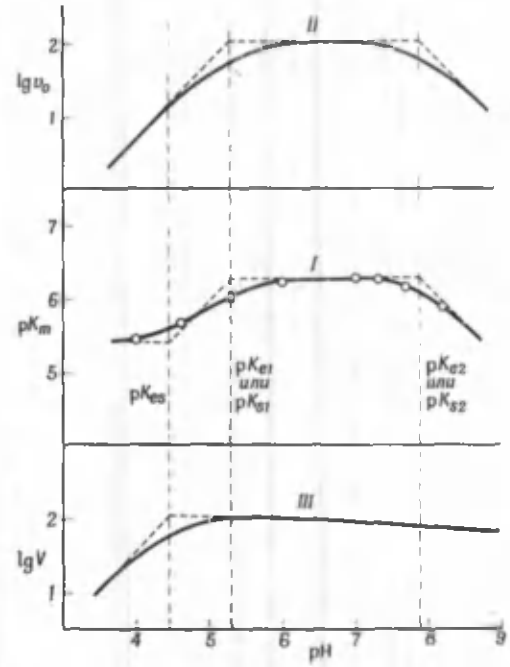
В то время как измерения скорости реакции при высокой концентрации субстрата позволяют определить величины pK фермент-субстратного комплекса, *измерения при очень низкой концентрации субстрата* могут дать величины pK для свободного фермента и субстрата. Как уже отмечалось выше, при низких концентрациях субстрата $v = (V/K_m)\,s$. По величине V/K_m можно определить величины pK свободного фермента (ср. [38]) 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 свободного фермента и субстрата. Однако наблюдения только за изменением величины K_m позволяют определить величины pK всех компонентов, как это будет показано в следующем разделе. Измерения скорости при низкой и высокой концентрациях субстрата полезны для проверки результатов. На фиг. 48 представлено изменение всех трех величин; логарифмический метод построения [621] позволяет сравнительно легко интерпретировать наблюдения.

Влияние pH на K_m

Уокер и Шмидт [2762] при рассмотрении действия гистидин — аммиак-лиазы (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 Диксон [621] 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 приложим и к величине K_i



Фиг. 47. Зависимость K_m и V от pH при действии холинэстеразы (3.1.1.8) на ацетилхолин [1019].
Верхний график — [621]; *нижний график* — [1505].



Фиг. 48. Зависимость K_m, V и v_0 от pH при действии ксантиноксидазы (1.2.3.2) на 2-амино-4-оксиптеридин [1622].
I — [621]; *II* и *III* — [1505]

для ингибиторов; он представляет собой, таким образом, теорию влияния pH на величины сродства ферментов к субстратам и ингибиторам. При выводе 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 приложим к величинам K_s и K_i; вопрос о приложимости его к величине K_m и к кинетике стационарного состояния обсуждается ниже.

Рассматривая систему, представленную в реакциях (IV.160), допустим, что, как и прежде, форма E^n фермента соединяется с неионизированной формой субстрата (который может быть, например, двуосновной кислотой), в результате чего образуется комплекс формы ES^n

$$E^n + S \rightleftarrows ES^n, \tag{IV.168}$$

и что при этом устанавливается равновесие. Константу равновесия $\tilde{K}_s$ определим отношением

$$\tilde{K}_s = \frac{[E^n]\,[S]}{[ES^n]}\,. \tag{IV.169}$$

Эта константа отличается от обычной субстратной константы K_s; последняя представляет собой константу равновесия, определяемую в отношении общих количеств E, S и ES, и зависит от pH, тогда как $\tilde{K}_s$ определяется в отношении особых ионных форм компонентов, участвующих в выражении (IV.169), и не зависит от pH. В данном случае [S] — концентрация неионизированной формы субстрата.

Из уравнений (IV.138) — (IV.140) и определения K_s получаем

$$K_s = \frac{E_t S_t}{ES_t} = \frac{[E^n]\,\bar{f_e}\cdot[S]\,f_s}{[ES^n]\,\bar{f_{es}}} = \tilde{K}_s\,\frac{\bar{f_e}\cdot f_s}{\bar{f_{es}}}\,. \tag{IV.170}$$

Это важное уравнение, показывающее, как K_s изменяется в зависимости от pH, удобно также в логарифмической форме

$$pK_s = p\tilde{K}_s + \lg \bar{f_{es}} - \lg \bar{f_e} - \lg f_s = p\tilde{K}_s - p\bar{f_{es}} + p\bar{f_e} + pf_s. \tag{IV.171}$$

Точно такие же уравнения выражают влияние pH на сродство ферментов к ингибиторам

$$K_i = \tilde{K}_i\,\frac{\bar{f_e}\cdot f_i}{\bar{f_{ei}}}\,, \tag{IV.172}$$

$$pK_i = p\tilde{K}_i - p\bar{f_{ei}} + p\bar{f_e} + pf_i. \tag{IV.173}$$

Так как различные ионные формы каждого компонента находятся в равновесии между собой, уравнения типа (IV.168) и (IV.169) можно написать для любых других ионных форм. Не имеет значения, какие ионные *формы, согласно нашему допущению, соединяются* с образованием комплекса ES, и указанный выше вариант соединения выбран как простейший относительно системы, представленной реакциями (IV.160). Легко показать, *что тот же самый результат получается при любом* допущении относительно механизма соединения. Если, например, допустить, что с ферментом соединяется вместо незаряженной формы субстрата анион, несущий два заряда, *и что комплекс* ES *остается таким же*, как прежде, то вместо уравнений (IV.168) и (IV.169) мы должны будем написать

$$E^n + S^{2-} + 2H^+ = ES^n, \tag{IV.174}$$

$$\tilde{K}_{s^{2-}} = \frac{[E^n]\,[S^{2-}]\,H^2}{[ES^n]} \tag{IV.175}$$

и из уравнений (IV.137)—(IV.141) и (IV.169) получим

$$K_s = \frac{E_t S_t}{ES_t} = \frac{[E^n]\,\bar{f_e}\,[S^{2-}]\,\bar{f_s^{2-}}}{[ES^n]\,\bar{f_{es}}} = \frac{\widetilde{K}_{s2-}}{H^2}\cdot\frac{\bar{f_e}\,\bar{f}_{s2-}}{\bar{f_{es}}} = \frac{\bar{K}_{s2-}}{K_{s1}K_{s2}}\cdot\frac{\bar{f_e}\cdot\bar{f}_s}{\bar{f_{es}}} = \widetilde{K}_s\frac{\bar{f_e}\bar{f}_s}{\bar{f_{es}}}, \quad \text{(IV.176)}$$

т. е. тот же самый результат, что и прежде (ср. уравнение IV.170).

Выбор правильной функции для использования в уравнении (IV.171) не определяется какими-либо допущениями относительно механизма образования комплекса ES, а зависит от того, как мы определим константу равновесия, участвующую в уравнении. Таким образом, написанное выше уравнение содержит $\bar{f}$-функции для E и ES и f-функцию для S просто потому, что при определении $\widetilde{K}_s$ учитывались промежуточные формы E и ES и незаряженная форма S.

Диксон [621] отметил, что если построить график зависимости $-\lg K_s$ или pK_s от pH, то результаты легко могут быть интерпретированы на основе нескольких простых правил, теоретическую базу для которых составляет уравнение (IV.171). Если пренебречь первым постоянным членом, который влияет только на смещение графика вдоль оси ординат, то pK_s будет равно алгебраической сумме трех членов типа pf, каждый из которых изменяется по тому же закону, что и функции, изображенные на фиг. 43. Следует, однако, отметить, что, в то время как члены типа pf для свободного фермента и субстрата имеют те же знаки, что и упомянутые функции на фиг. 43, члены типа pf 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 величины pK достаточно удалены друг от друга), соединенных короткими криволинейными участками.

2. Наклоны прямолинейных отрезков равны 0, ± 1 или ± 2.

3. Каждый перегиб на кривой дает значение pK ионизирующейся 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.

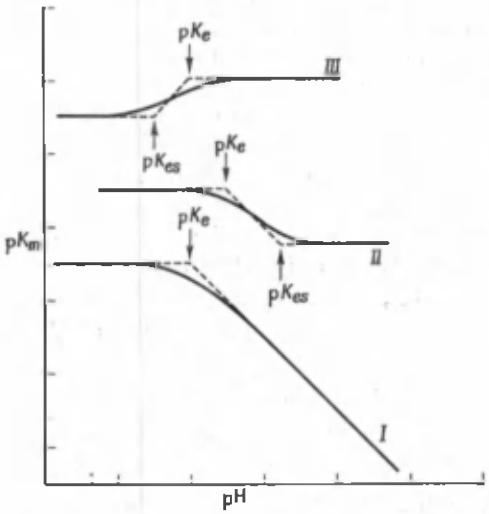
5. Каждое pK группы, относящейся к комплексу ES, вызывает увеличение (положительного) наклона с увеличением pH; каждое pK группы, относящейся к свободному ферменту или к свободному субстрату, вызывает уменьшение наклона кривой.

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 по уравнению $ES^n \rightarrow E^n + S$; при этом не будет происходить изменения заряда и наклон отрезка будет равен нулю. Если комплекс имеет $(n+1)$ отрицательных зарядов, а субстрат имеет 1 отрицательный заряд, то процесс диссоциации выразится уравнением $ES^{n+1} \rightarrow E^n + S^-$ и наклон отрезка по-прежнему будет равен нулю. Если процесс диссоциации пойдет по пути $ES^{n-1} \rightarrow E^n + S$, 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 pH.

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 практически не возникает значительных трудностей.

Следует отметить, что приложимость этих правил не зависит от принятых допущений, определяющих, какие именно ионные формы компонентов соединяются при образовании комплекса ES или какие pH-функции фигурируют в уравнениях. Для того чтобы интерпретировать кривые зависимости pK_s — pH с помощью этих правил, вообще не требуется составлять уравнение образования комплекса для данной системы. Эти правила в равной мере применимы и при изучении влияния pH на pK_i; они значительно упрощают интерпретацию действия ингибиторов.



Фиг. 49. Схема, иллюстрирующая возможные влияния pH на K_m.
Объяснения см. в тексте.

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 pK, что сопровождается появлением на графике волнообразного сдвига, как показано на кривых *II* и *III* фиг. 49. 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 pK при образовании комплекса. Если же ионизирующаяся группа непосредственно вовлекается в образование связи, то ионизация ее обычно полностью подавляется; на графике это выражается появлением перегиба (фиг. 49, *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 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 pH — pK_m. Многие ионизирующиеся группы в ферментном белке, более удаленные от активного центра, не обнаруживают себя на этих графиках. Необходимо, однако, отдавать себе отчет и в том, что некоторые группы, не ионизирующиеся вообще, могут быть

ответственны за соединение с субстратом или вовлекаться в это соединение, хотя график не даст нам никаких указаний на существование этих групп.

Изложенная выше теория применима при рассмотрении влияния pH на K_s. Естественно возникает вопрос: приложима ли эта теория в равной мере и при рассмотрении 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 IV.158), что влияние pH на k_{+2} учитывается при подстановке $\bar{k}_{+2}/f_{\bar{es}}$ 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 (IV.160), можно вместо k_{-1} подставить $\bar{k}_{-1}/f_{\bar{es}}$. Для k_{+1}-реакции, в которой участвуют как свободный фермент, так и субстрат, вместо k_{+1} можно написать $\bar{k}_{+1}/(f_{\bar{e}} \cdot f_s)$. Если произвести эти подстановки, то получим

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = \frac{\bar{k}_{-1} + \bar{k}_{+2}}{\bar{k}_{+1}} \cdot \frac{f_{\bar{e}} \cdot f_s}{f_{\bar{es}}} . \qquad \text{(IV.177)}$$

Таким образом, влияние pH на K_m оказывается точно таким же, как и влияние pH на K_s (см. уравнение IV.170), так как $\bar{k}_{+1}$, $\bar{k}_{-1}$ и $\bar{k}_{+2}$ не зависят от pH, ибо они относятся к определенным ионным формам компонентов. Поэтому теория о влиянии pH на K_s приложима и к данному случаю.

Выражение такого вида было впервые выведено для кинетики стационарного состояния по Бриггсу — Холдейну Валеем [2760]. Полное выражение для скорости реакции в системе (IV.160) может быть представлено следующим образом (включая выражение Валея для V):

$$v = \frac{\dfrac{\bar{k}_{+2}e}{1 + \dfrac{H}{K_{es1}} + \dfrac{K_{es2}}{H}}}{1 + \dfrac{1}{s} \cdot \dfrac{\bar{k}_{-1} + \bar{k}_{+2}}{\bar{k}_{+1}} \cdot \dfrac{\left(1 + \dfrac{H}{K_{e1}} + \dfrac{K_{e2}}{H}\right)\left(1 + \dfrac{K_{s1}}{H} + \dfrac{K_{s1}K_{s2}}{H^2}\right)}{1 + \dfrac{H}{K_{es1}} + \dfrac{K_{es2}}{H}}} . \qquad \text{(IV.178)}$$

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 двуосновная кислота.

При анализе зависимости K_s от pH 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 (IV.160) 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 $\bar{k}_{+1}$, что отразится на результате. Лайдлер [1504], развивая анализ Ботса и Моралеса [298], 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 pH. Поскольку, однако, такие ошибки лежат, по-видимому, в пределах ошибок опыта для работ подобного рода, это ограничение не является существенным.

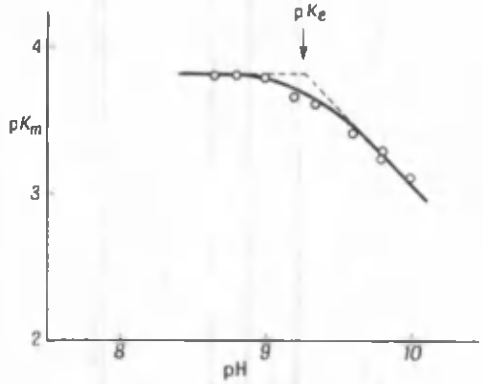
В анализе Лайдлера и других подразумевается, что влияние pH на k_{-1}- и k_{+2}-реакции сходно, так как обе эти реакции зависят от состояния ES. Можно, однако, допустить, что не во всех случаях это так, хотя нелегко сформулировать условия, при которых влияние pH на k_{-1}- и k_{+2}-реакции было бы различным. Если существует еще некое дополнительное влияние pH только на k_{+2}, то эту константу следует умножить на некоторую pH-функцию, например на f_{+2}. При этом все остальные константы останутся неизменными и уравнение (IV.177) надо будет заменить уравнением

$$K_m = \frac{\bar{k}_{-1} + f_{+2}\bar{k}_{+2}}{\bar{k}_{+1}} \cdot \frac{f_e \cdot f_s}{f_{es}} .$$

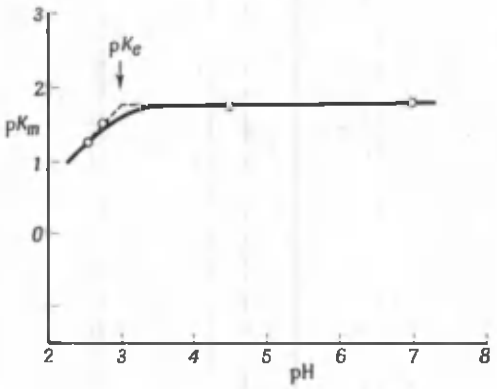
Насколько сильно данное обстоятельство будет влиять на результаты анализа, зависит от относительных величин $\bar{k}_{-1}$ и $\bar{k}_{+2}$, а также от природы f_{+2}. Мы не располагаем данными, которые указывали бы, что рассмотренное осложнение имеет место, но такая возможность не может быть полностью исключена. По мнению Лайдлера, если пренебречь возможностью небольших ошибок в величинах констант ионизации, о которых упоминалось выше, то теорию влияния pH на образование комплекса ES можно считать приложимой не только к случаям равновесия, но также к случаям стационарного состояния, предусматриваемого теорией Бриггса — Холдейна.

Литературные данные о влиянии pH на K_m, а также на V очень скудны. Диксон рассмотрел шесть случаев, из которых четыре представлены на фиг. 47, 48, 50 и 51. Применение изложенных выше правил для интерпретации кривых иллюстрирует фиг. 48; pK_m-кривая дает для pK комплекса ES (выпуклая кривая) значение 4,5, а для pK свободного фермента (или субстрата) два значения: 5,3 и 7,9. pK комплекса ES можно определить также по кривой pH — lg V, но не по кривой pH — lg v_0; в то же время pK фермента обнаруживается на кривой pH — lg v_0, но не на кривой pH — lg V в полном соответствии с приведенной выше теорией. Фиг. 47 иллюстрирует уже упоминавшийся выше факт, а именно что pK, характеризующее такую группу фермента, которая может влиять на скорость реакции, и появляющееся на кривой pH — lg V, не обнаруживается при построении кривой для pK_m, если константа ионизации данной группы не изменяется в результате присоединения субстрата.

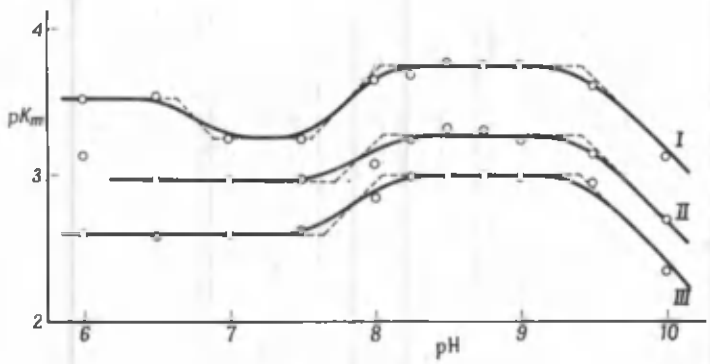
Ряд интересных результатов, полученных Додгсоном и др. [2979] в опытах с арилсульфатазой (3.1.6.1) и тремя различными субстратами, показан на фиг. 52. Можно отметить, что данный фермент характеризуется двумя pK, имеющими значение около 8,1 и 9,4, а комплекс ES — одним pK, слегка изменяющимся при использовании различных субстратов (в пределах 7,5 и 7,8). Один из субстратов содержит дополнительную фенольную группу, которая характеризуется (по кривой титрования свободного субстрата) величиной pK около 6,5. 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 при 6,9, принадлежащее ES-комплексу. pK при 6,5 соответствует pK свободного субстрата; оно не может принадлежать ферменту, так как не обнаруживается на других кривых; pK при 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,



Фиг. 50. Зависимость K_m от pH при действии щелочной фосфатазы (3.1.3.1). По Мортону [1878], проанализировано Диксоном [621].



Фиг. 51. Зависимость K_m от pH при действии β-фруктофуранозидазы (3.2.1.26). По Иозефсону [1268], проанализировано Диксоном [621].



Фиг. 52. Зависимость K_m от pH при действии арилсульфатазы (3.1.6.1) [2979].

I — субстратом служит нитрокатехолсульфат; *II* — субстратом служит нитрофенилсульфат; *III* — субстратом служит ацетилфенилсульфат.

хотя соединение субстрата с активным центром фермента делает ее менее кислой. Возможно, что 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.

Определения величин pK ионизирующихся групп, расположенных в активных центрах ферментов, могут способствовать выяснению химической природы этих групп. Хотя это вполне вероятно, однако рекомендуется быть весьма осторожным при проведении анализа такого рода. Во-первых, тот факт, что изучаемая группа в ферменте характеризуется той же самой величиной pK, что и какая-либо известная химическая группа, еще не гарантирует идентичности этих групп, ибо одной и той же величиной pK могут характеризоваться разные группы. Во-вторых, данная группа, характеризующаяся определенной величиной pK, когда она присутствует в аминокислоте или другой небольшой молекуле, может иметь другое значение pK, если она находится в белковой молекуле, где на нее будут оказывать влияние другие заряженные группы, расположенные по соседству.

Таблица 2

ВЕЛИЧИНЫ pK И ТЕПЛОТЫ ИОНИЗАЦИИ НЕКОТОРЫХ ГРУПП, ПРИСУТСТВУЮЩИХ В БЕЛКАХ

Группа	pK (25°)	ΔH_i, *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 [205]	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

В табл. 2, заимствованной у Эдсалла [469, стр. 445], приводятся величины pK для ряда групп, присутствующих в белках, а также теплоты ионизации этих групп.

Обсуждая вопрос об идентификации ионизирующихся групп в белках, Эдсалл пишет: «Эти величины (pK) могут смещаться благодаря взаимодействию кислых групп с другими соседними группами в молекуле; однако в общем случае подобный сдвиг относительно невелик и даже в наиболее крайних известных случаях вряд ли превышает 2 единицы pH... Характеристические теплоты ионизации различных групп... представляют очень важный признак для их идентификации... Если известны и величина pK определенной группы в белке и ее теплота ионизации, то в общем случае остается мало сомнений в отношении природы этой группы».

Было, однако, отмечено, что эти критерии, возможно, неприменимы к группам, расположенным в активных центрах ферментов, где можно ожидать наличия локальных электростатических полей. Так как пока еще не имеется сведений, как именно обстоит дело, то лучше воздержаться от даль-

нейшего обсуждения вопроса до накопления новых данных. Теплоты ионизации групп могут быть определены путем определения влияния изменений температуры на величины pK.

Следует отметить, что перегибы 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 (IV. 154) $f_{\bar{x}}$ является pH-функцией активной формы фермента и может быть представлено кривой, сходной с той, которая изображена на фиг. 43, то уравнение для средней (независимой от pH) части графика будет иметь вид $pf_{\bar{x}} = -\lg(1 + K_{1y}/K_{1x})$, уравнение для левой части $pf_{\bar{x}} = -\lg(H/K_{1x})$ и уравнение для правой части $pf_{\bar{x}} = -\lg(K_{2y}/H)$. При пересечении в левой части графика первые два выражения должны быть равны и поэтому $H = K_{1x} + K_{1y} = K_1$ (см. уравнение IV. 150). 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 (IV. 149) и (IV. 156).

Если величины констант значительно отличаются друг от друга, то определенные по графику молекулярные константы будут равны константам ионизации групп. Только в том случае, когда величины констант мало отличаются друг от друга, необходимо проводить различие между молекулярными константами и константами ионизации групп, но при этом трудно произвести точные вычисления величин pK_1 и pK_2. Если такие вычисления проведены, нужно проявлять осторожность при интерпретации этих констант как констант ионизации групп в тех случаях, когда найденные величины используются для идентификации определенных групп.

Г. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

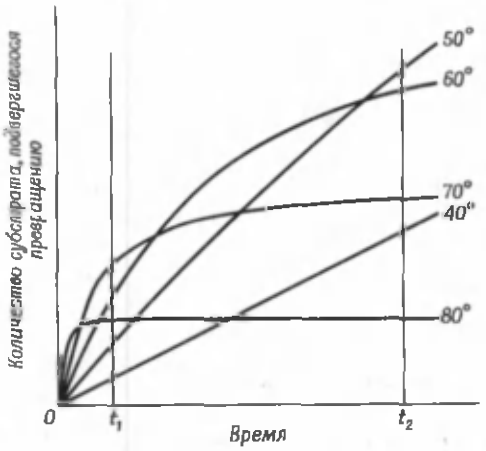
Влияние температуры на скорость ферментативных реакций может быть обусловлено действием ряда различных факторов. Температура влияет на стабильность фермента; на скорость распада фермент-субстратного комплекса (т.е. на $\tilde{k}_{+2}$), определяемую по величине теплоты активации реакции; на сродство фермента к субстрату (т.е. на $\tilde{k}_{+1}$ и $\tilde{k}_{-1}$); на величину pH-функций одного или всех компонентов (в результате изменения величин 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 величина 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 величины pK каждого из компонентов реакции определяется

с помощью методов, описанных в последнем разделе этой главы. В полиферментных системах каждый фермент можно обычно 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 фиг. 53. 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



Фиг. 53. Типичные кривые хода ферментативной реакции при различных значениях температуры, показывающие зависимость кажущегося температурного оптимума от времени наблюдения.

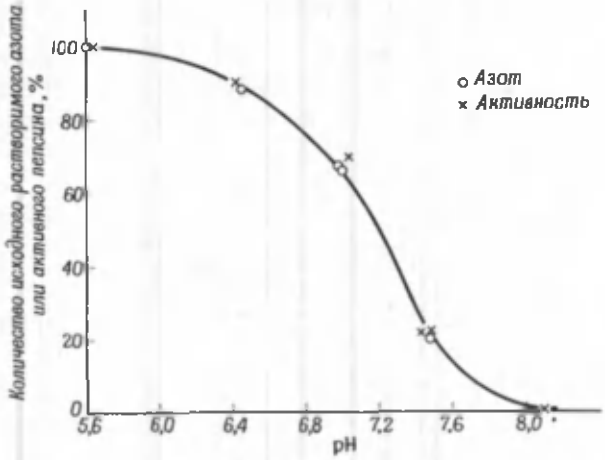
чего наблюдается кажущийся температурный оптимум. Эта наблюдаемая оптимальная температура не остается постоянной; она падает по мере увеличения промежутка времени, в течение которого рассматривается процесс, что видно, например, из сравнения t_1 и t_2 на фиг. 53.

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, обусловливающая непрерывное уменьшение концентрации активного фермента. 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 становится практически мгновенной при значениях температуры, близких к 100°; в большинстве же случаев она наступает уже при температуре около 70°. Число ферментов, которые устойчивы при температуре 100°, исключительно мало; классическим примером может служить аденилаткиназа (2.7.4.3), выдер-

живающая в течение продолжительного времени температуру 100° при pH 1. Интересно, однако, что некоторые бактерии, обычно живущие в условиях высоких температур (так называемые *термофильные* бактерии), содержат ферменты, отличающиеся необычайно высокой термостабильностью. Показано, например, что кристаллическая α-амилаза (3.2.1.1), выделенная из *Bacillus stearothermophilus*, сохраняет 90% своей активности после инкубации при 90° в течение 1 *час* [1708].

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,



Фиг. 54. Эквивалентность процессов инактивации фермента и денатурации белка [1993].
Фермент — пепсин (3.4.4.1) при 20°.

сильно варьировать — от 10 до нескольких сотен. Строгая пропорциональная зависимость между инактивацией фермента и денатурацией белка была продемонстрирована для пепсина (3.4.4.1) и трипсина (3.4.4.4) Нортропом [1993, 1995]; результаты одного из опытов такого рода представлены на фиг. 54. В тех случаях, когда при определенных условиях денатурация белка могла быть обращена, параллельно с ренатурацией белка наблюдалось и восстановление активности фермента.

Изучение тепловой денатурации ферментов относится к области химии белков, и мы не будем здесь подробно ее рассматривать. Измерение ферментативной активности вооружает специалиста в области химии белка быстрым методом, с помощью которого он может вести точное наблюдение за ходом денатурации.

Высокий температурный коэффициент тепловой денатурации означает, что процесс денатурации характеризуется большой величиной теплоты активации. Применив теорию абсолютных скоростей реакций (см. [2508]), можно рассчитать свободную энергию и энтропию активации этого процесса; было найдено, что величины свободной энергии лежат в обычных пределах [1] и высокие значения теплоты активации данного процесса опре-

[1] Из приведенной в статье Стирна [2508] 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.

деляются исключительно высокими положительными значениями энтропии активации. Это обстоятельство было инртерпретировано 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 развертывания пептидных цепей или отделения соседних участков цепей. Более подробно этот вопрос обсуждается в гл. X.

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 неодинаковым. Обычно имеется зона максимальной стабильности фермента, причем она не обязательно располагается поблизости от его изоэлектрической точки; инактивация увеличивается при сдвиге в кислую и щелочную сторону от этой зоны. 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 при охлаждении. Ярким примером может служить нуклеотид-пирофосфатаза (3.6.1.9) *Proteus vulgaris*, которая полностью инактивируется за 10 *мин* при 70° и полностью реактивируется при охлаждении до 37°. Непрогретые препараты фермента содержат термолабильный ингибитор, и фермент остается неактивным до тех пор, пока ингибитор не будет удален в результате нагревания до 100° в присутствии субстрата фермента (пирофосфата), который предохраняет фермент от инактивации [2580].

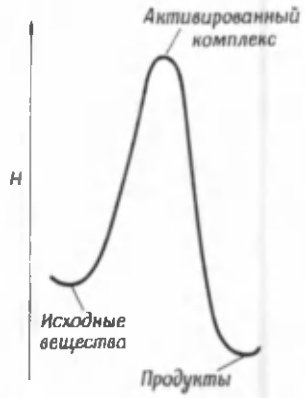
В некоторых случаях обратимой тепловой денатурации оказывается возможным определить равновесие между активной и неактивной формами фермента. Правда, проделать это без нарушения равновесия обычно весьма трудно. Практически единственные ферменты, с которыми были проведены такого рода исследования,— это трипсин (3.4.4.4) [79] и оксидаза L-аминокислот из змеиного яда (1.4.3.2) [1329]. 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°, 50 при 44° и 80 при 50°. 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. Фиг. 55 изображает это соотношение в схематическом виде. Для сравнения на фиг. 56 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° оказывается ниже, чем при комнатной температуре. Бактериальная глутаматдекарбоксилаза (4.1.1.15) стабильна при 25°, однако при 0° ее активность в течение примерно 1 *час* снижается приблизительно вдвое [2395]. Падения активности не наблюдается при предварительном добавлении пири-

доксальфосфата (фермент представляет собой пиридоксальфосфатпротеид), в присутствии сывороточного альбумина или в условиях высоких концентраций глицина. После инактивации при 0° частичное восстановление активности наблюдается при добавлении пиридоксальфосфата; однако при добавлении альбумина или глицина или же после повторной инкубации при 25° активность не восстанавливается. Наблюдаемое поведение объясняют тем,



Фиг. 55. Схематическое изображение изменения H для процесса денатурации трипсина (3.4.4.4).



Фиг. 56. Схематическое изображение изменения H для типичной химической реакции.

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 [2124]. Этот фермент довольно быстро инактивируется при 0°, но при комнатной температуре он стабилен и даже обнаруживает медленное увеличение активности. Субстрат (АТФ), который предохраняет фермент от инактивации при повышении температуры или при диализе, не предохраняет его от инактивации при низкой температуре. При повышении температуры от 0° 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. Кинетика эффекта снижения активности сложна [2371], и объяснение его пока еще весьма неубедительно.

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 температуры 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. 3). Во всех изученных до сих пор случаях определялась, однако, лишь небольшая часть этих величин. Необходимо признать, что нам известно об этих 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 разделе В, 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

$$\Delta F_1^0 = -RT \ln \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = -2{,}303\, RT \lg \frac{k_{+1}}{k_{-1}}, \qquad \text{(IV.179)}$$

где ΔF_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 выражается положительной величиной, если образование ES представляет собой эндотермический[1] процесс; R равно 1,986 *кал/град·моль*.

По влиянию температуры на k_{+1}/k_{-1} можно определить тепловой эффект первой стадии процесса с помощью уравнения

$$\Delta H_1^0 = 2{,}303RT^2 \frac{d \lg \frac{k_{+1}}{k_{-1}}}{dt}, \qquad \text{(IV.180)}$$

а энтропию процесса ΔS_1^0 можно определить из величин ΔF_1^0 и ΔH_1^0 по уравнению

$$\Delta S_1^0 = \frac{\Delta H_1^0 - \Delta F_1^0}{T}. \qquad \text{(IV.181)}$$

Наиболее удобный путь использования уравнения (IV.180) состоит в построении графика зависимости $\lg (k_{+1}/k_{-1})$ от $1/T$; величина наклона полученной кривой будет при этом равна $-\Delta H_1^0/2{,}303R$. Если же построить график зависимости $\lg K_s$ от $1/T$, то величина наклона будет равна $+\Delta H_1^0/2{,}303R$.

Соответствующие величины для второй и третьей стадий можно определить аналогичным путем по величинам 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 ΔF^0 и ΔS^0.

В последующем обсуждении ради удобства мы будем опускать индекс «нуль», который показывает, что соответствующие рассматриваемые величины являются стандартными.

Для того чтобы определить величины энергий и энтропий активации, необходимо использовать теорию абсолютных скоростей реакции, разработанную Эйрингом [711]. 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 скоростью[2], определяемой отношением $k_B T/h$, в котором k_B — постоянная Больцмана (газовая постоянная в расчете на молекулу) и h — постоянная Планка. Другими словами, скорость распада не зависит от природы комплекса.

[1] Точнее — эндергонический.— *Прим. перев.*

[2] *Мы опускаем переводный множитель* κ, *который обычно принимается равным 1.*

Таким образом, константа скорости реакции k определяется выражением

$$k = \frac{k_B T}{h} K^*, \qquad \text{(IV.182)}$$

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

$$\Delta F^* = \Delta H^* - T\Delta S^* = -RT \ln K^*. \qquad \text{(IV.183)}$$

Подставляя в уравнение (IV.182) значение K^*, получаем

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta F^*}{RT}} = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta H^*}{RT}} e^{+\frac{\Delta S^*}{R}}. \qquad \text{(IV.184)}$$

Допуская, что ΔS^* не зависит от температуры, после логарифмирования и дифференцирования получаем

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta H^*}{RT^2} = \frac{\Delta H^* + RT}{RT^2}. \qquad \text{(IV.185)}$$

Это выражение можно сравнить с эмпирическим уравнением Аррениуса

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E}{RT^2}, \qquad \text{(IV.186)}$$

где E — энергия активации. Следует отметить, что

$$E = \Delta H^* + RT. \qquad \text{(IV.187)}$$

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 (IV.185) состоит (как и для уравнения IV.180) в построении графика зависимости $\lg k$ от $1/T$; это уравнение может быть представлено в следующем виде:

$$d \lg k = \frac{\Delta H^* + RT}{2{,}303R} \cdot \frac{dT}{T^2} = \frac{\Delta H^* + RT}{2{,}303R} d\left(\frac{1}{T}\right), \qquad \text{(IV.188)}$$

так что построенный график представляет собой прямую с наклоном $-(\Delta H^* + RT)/2{,}303R$. Важно отметить, что при этом определяют величину E, а не ΔH^*. Этот метод позволяет непосредственно определять скорости, выраженные в произвольных единицах, так как любая постоянная величина будет влиять на положение кривой, а не на ее наклон.

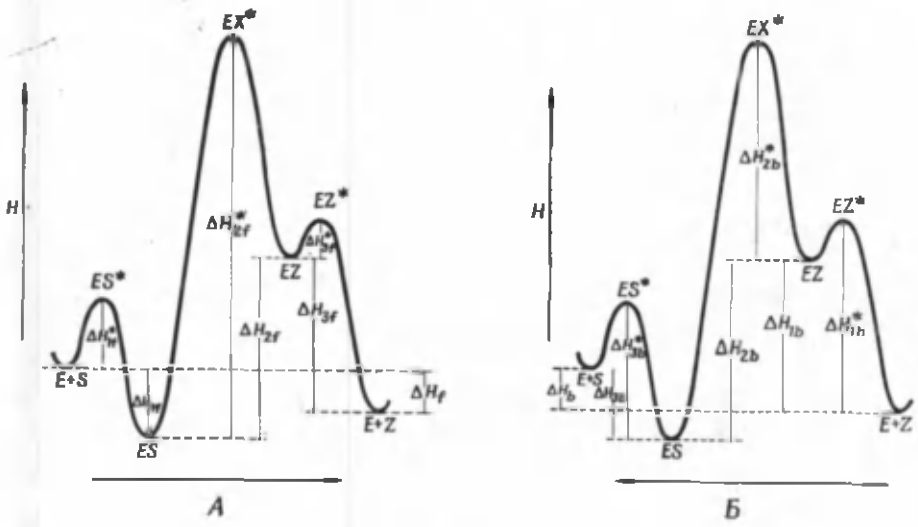
ΔF^*, т. е. свободную энергию активации, можно определить по величине k с помощью уравнения (IV. 184); для этой цели k должно быть выражено в абсолютных единицах. Например, из уравнения (IV.85) следует, что $k_{+2} = V/e$; таким образом, в этом случае необходимо знать молярную концентрацию активных центров. При этом обычно предполагается использование чистых ферментов с известным молекулярным весом. ΔS^* (энтропию активации) можно затем определить по уравнению (IV.183).

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 различных 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 образовываться *переходный активированный комплекс, и именно эта стадия определяет* величину k_{+1}. Аналогично этому комплекс EZ, для того чтобы диссоциировать, также требует тепловой активации. В рассматриваемой простой системе участвуют, таким образом, три активированных и два неактивированных комплекса:

$$E + S \rightleftharpoons ES^* \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EX^* \rightleftharpoons EZ \rightleftharpoons EZ^* \rightleftharpoons E + Z.$$

Энергетические взаимоотношения различных комплексов в этой системе может пояснить схема, приведенная на фиг. 57. На этой схеме представлены величины ΔH; однако подобные же схемы могут быть составлены и для величин ΔF и ΔS. Соединение фермента с субстратом или продуктом может



Фиг. 57. Схематическое изображение изменения H для типичной обратимой ферментативной реакции.
А. Прямая реакция. Б. Обратная реакция.

быть либо экзотермическим, либо эндотермическим процессом; на приведенных схемах образование ES показано как экзотермический, а соединение E и Z — как эндотермический процесс. Фиг. 57, *А* относится к прямой реакции, а фиг. 57, *Б* — 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 соседней «яме» 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 величин 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 реакции равна ΔH суммарной реакции.

Пути расчета всех рассматриваемых термодинамических величин по данным измерений отдельных констант скорости суммированы в табл. 3.

Мы полагаем, что нет такого фермента, для которого был бы определен столь полный набор термодинамических характеристик, так как даже в тех немногих случаях, когда отдельные константы скорости были определены, измерения проводились только при одной температуре. Имеется настоятельная потребность в получении такого рода данных, и нет причин, которые препятствовали бы их получению путем использования описанных выше методов при различных значениях температуры.

Таблица 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ВЕЛИЧИН ПО ЗНАЧЕНИЯМ КОНСТАНТ СКОРОСТИ[1])

Величина	Источник определения	Использованное уравнение	Величина	Источник определения	Использованное уравнение
$\Delta H_f = -\Delta H_b$	По влиянию T на равновесие суммарной реакции	(IV.180)	$\Delta F_f = -\Delta F_b$	По равновесию суммарной реакции	(IV.179)
ΔH_{1f}	По влиянию T на $k_{+1}/k_{-1} = 1/K_{sf}$	(IV.180)	ΔH_{1b}	По влиянию T на $k_{-3}/k_{+3} = 1/K_{sb}$	(IV.180)
ΔH^*_{1f}	По влиянию T на k_{+1}	(IV.185)	ΔH^*_{1b}	По влиянию T на k_{-3}	(IV.185)
ΔF_{1f}	По величине $k_{+1}/k_{-1} = 1/K_{sf}$	(IV.179)	ΔF_{1b}	По величине $k_{-3}/k_{+3} = 1/K_{sb}$	(IV.179)
ΔF^*_{1f}	По величине k_{+1}	(IV.184)	ΔF^*_{1b}	По величине k_{-3}	(IV.184)
ΔH_{2f}	По влиянию T на k_{+2}/k_{-2}	(IV.180)	ΔH_{2b}	По влиянию T на k_{-2}/k_{+2}	(IV.180)
ΔH^*_{2f}	По влиянию T на k_{+2}	(IV.185)	ΔH^*_{2b}	По влиянию T на k_{-2}	(IV.185)
ΔF_{2f}	По величине k_{+2}/k_{-2}	(IV.179)	ΔF_{2b}	По величине k_{-2}/k_{+2}	(IV.179)
ΔF^*_{2f}	По величине k_{+2}	(IV.184)	ΔF^*_{2b}	По величине k_{-2}	(IV.184)
ΔH_{3f}	По влиянию T на $k_{+3}/k_{-3} = K_{sb}$	(IV.180)	ΔH_{3b}	По влиянию T на $k_{-1}/k_{+1} = K_{sb}$	(IV.180)
ΔH^*_{3f}	По влиянию T на k_{+3}	(IV.185)	ΔH^*_{3b}	По влиянию T на k_{-1}	(IV.185)
ΔF_{3f}	По величине $k_{+3}/k_{-3} = K_{sb}$	(IV.179)	ΔF_{3b}	По величине $k_{-1}/k_{+1} = K_{sf}$	(IV.179)
ΔF^*_{3f}	По величине k_{+3}	(IV.184)	ΔF^*_{3b}	По величине k_{-1}	(IV.184)

[1]) Величины, относящиеся к прямой и обратной реакциям, отмечены индексами f и b соответственно. Константы скорости пронумерованы согласно следующей схеме:

$$E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} EZ \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftharpoons}} E+Z.$$

Для каждой соответствующей пары величин ΔH и ΔF изменение ΔS можно определить из уравнений (IV.181) и (IV. 183). Следует отметить, что $\Delta H_{1f} = -\Delta H_{3b}$, $\Delta H_{2f} = -\Delta H_{2b}$, $\Delta H_{3f} = -\Delta H_{1b}$. Аналогичные соотношения связывают и величины ΔF и ΔS. Ниже приводятся дополнительные данные о соотношениях между величинами ΔH.

$$\Delta H_{1f} + \Delta H_{2f} + \Delta H_{3f} = \Delta H_f, \quad \Delta H_{1b} + \Delta H_{2b} + \Delta H_{3b} = \Delta H_b$$

$$\Delta H^*_{1f} - \Delta H_{1f} = \Delta H^*_{3b}, \quad \Delta H^*_{1b} - \Delta H_{1b} = \Delta H^*_{3f}$$

$$\Delta H^*_{2f} - \Delta H_{2f} = \Delta H^*_{2b}, \quad \Delta H^*_{2b} - \Delta H_{2b} = \Delta H^*_{2f}$$

$$\Delta H^*_{3f} - \Delta H_{3f} = \Delta H^*_{1b}, \quad \Delta H^*_{3b} - \Delta H_{3b} = \Delta H^*_{1f}$$

$$\Delta H^*_{1f} + \Delta H^*_{2f} + \Delta H^*_{3f} - \Delta H^*_{1b} - \Delta H^*_{2b} - \Delta H^*_{3b} = \Delta H_f$$

$$(\Delta H_{1f} + \Delta H^*_{2f}) - (\Delta H_{1b} + \Delta H^*_{2b}) = \Delta H_f$$

Аналогичные соотношения связывают также величины ΔF и ΔS.

Для ряда ферментативных реакций (см., например, [2422, 2508]) были опубликованы относительно полные данные о влиянии температуры на K_m и V; в большинстве случаев, однако, эти данные получили несколько сомнительную трактовку, 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 крайних случаях положение достаточно просто. Если $K_m = K_s = k_{-1}/k_{+1}$, то измерения позволяют определить истинную константу равновесия и следует пользоваться уравнениями (IV.179) и (IV.180), дающими свободную энергию, теплоту и (из уравнения IV.181) энтропию реакции соединения фермента с субстратом (т. е. ΔF_{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 pK_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 ΔF^*_{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 $k_{+2}e/K_m$ (см. стр. 105), которая в рассматриваемом случае равна $k_{+1}e$. Следует отметить, что в случае приложимости теории Михаэлиса определяют величины, относящиеся к процессу соединения фермента с субстратом в целом, тогда как в случае приложимости 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 pK_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 пропорционально k_{+2} только в том случае, если в реакции участвует один промежуточный комплекс; фактически же во многих случаях имеется 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 IV.185). В таком случае, если только известна концентрация фермента, что дает абсолютную величину k_{+2}, то ΔF^*_{2f} можно определить по уравнению (IV.184), а ΔS^*_{2f} — по уравнению (IV.183). Если же V — сложная функция, то «кажущиеся» величины ΔH^* и ΔF^* 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 различными 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 данном значении температуры была определена истинная вели-

чина 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 экстраполирования графика, описываемого 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 [831]. Он отмечает, что если скорости измеряют, как обычно, при одной и той же концентрации субстрата, но при различных значениях температуры, то

$$\Delta H^{*\prime}_{2f} - \Delta H^{*}_{2f} = \frac{K_m}{s+K_m}\Delta H'_{1f} = \frac{1}{1+\sigma}\Delta H'_{1f}. \qquad \text{(IV.189)}$$

В этом уравнении $\Delta H^{*\prime}_{2f}$ — «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 соединения 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 разделе 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 pH — активность может изменяться при изменении температуры, в результате чего может сдвинуться значение оптимума pH; иногда изменяется и влияние pH на сродство фермента к субстрату, так что при изменении температуры и прежнем значении pH концентрация субстрата может оказаться уже недостаточной для насыщения фермента. Если не учитывать такого рода изменений, то это приведет к дальнейшим ошибкам при вычислении величин, указанных в табл. 3.

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 фиг. 57, за исключением тех, которые зависят от уровней энергии ES* и EZ* (ср. с данными для фумаратгидратазы на фиг. 62).

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 (IV.186) легко показать, что

$$E = \frac{RT^2 \ln Q_{10}}{10}. \qquad \text{(IV.190)}$$

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 определенная 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 в табл. 4 [2422].

Таблица 4

ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ НЕКОТОРЫХ РЕАКЦИЙ ГИДРОЛИЗА

Реакция	Катализатор	E, *кал/моль*
Гидролиз сахарозы	H^+	26 000
Гидролиз сахарозы	«Сахараза» солода	13 000
Гидролиз сахарозы	Дрожжевая «сахараза»	11 000
Гидролиз раффирозы	То же	11 000

Если построить график зависимости скорости реакции от $1/T$, то этот *график не всегда будет представлять собой прямую. В ряде случаев наклон* графика меняется и график принимает вид ломаной линии. Это указывает, что при определенной критической температуре меняется величина энергии активации. Для объяснения этого явления был выдвинут ряд гипотез.

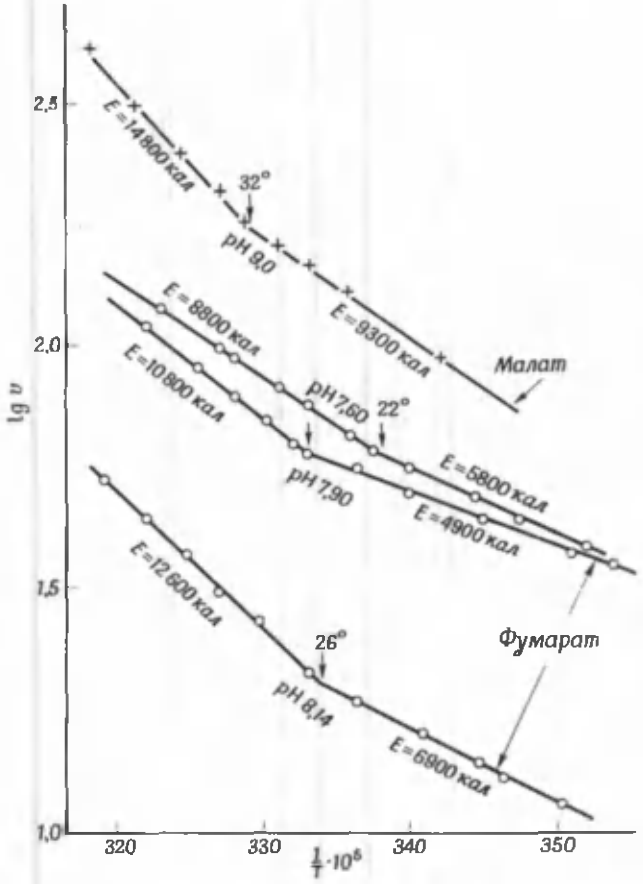
1. *Изменение фазового состояния растворителя.* Липазу (3.1.1.3), трипсин (3.4.4.4) и пепсин (3.4.4.1) изучали при очень низких температурах и в каждом случае наблюдали значительное изменение энергии активации при температурах, близких к 0°. Для липазы соответствующая величина равна при отрицательных температурах 37 000 *кал*, а при положительных 7600 *кал. При этом, однако, оказалось, что переход воды из жидкой фазы* в твердую не является причиной изменения величины энергии активации; те же результаты получались и в том случае, когда замерзание предотвращали проведением опыта в условиях высоких концентраций глицерина [2422].

2. *Существование двух параллельных реакций с различными температурными коэффициентами* (например, двух реакций, катализируемых различными 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 выпуклой. 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 общий процесс будет лимитироваться второй реакцией, энергию активации которой мы будем наблюдать 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 вогнутой. Теоретическое рассмотрение такой системы приведено у Стирна [2508].

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 перелом (изменение наклона графика). Согласно Сайзер [2422],



Фиг. 58. Графическое определение величин энергии активации по уравнению Аррениуса для прямой и обратной реакций в системе фумаратгидратазы (4.2.1.2) в щелочном растворе [1745].

уреаза (3.5.1.5) в восстановленной форме характеризуется энергией активации 8700 *кал*, а в окисленной — 11 700 *кал*. В опытах с ферментом, находящимся в одной из этих форм, не наблюдалось изменения наклона графика. В слабовосстановительной среде перелом отмечался при 22°; выше этой температуры наблюдали энергию активации, характерную для восстановленной формы, а ниже этой температуры — 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 [1391] не наблюдали на графиках такого изменения наклона и выдвинули другое объяснение, которое мы обсудим ниже, в пункте 5. Массей [1745], изучавший действие фумаратгидратазы в щелочных

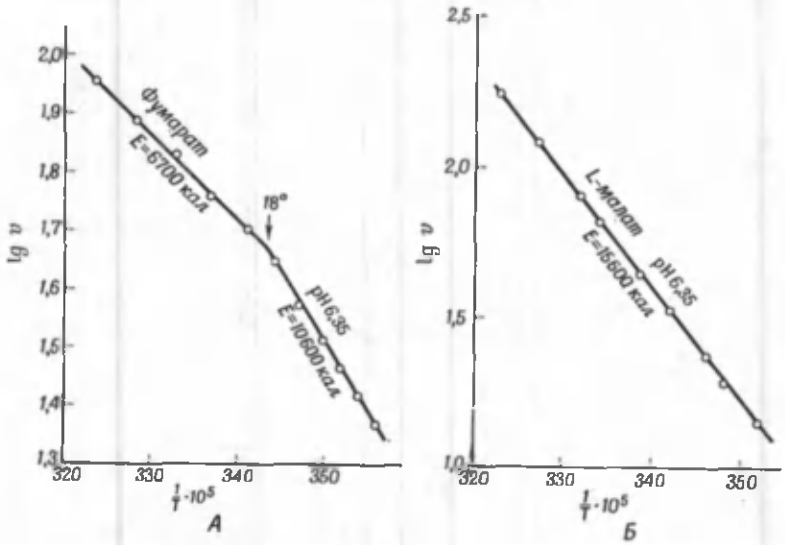
растворах, наблюдал изменение наклона графиков: более высоким значениям температуры соответствовали более высокие значения энергии активации. Насколько нам известно, это единственный случай, когда график, описываемый уравнением Аррениуса, оказывается выпуклым. Этот график (фиг. 58) отличается от графика, 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 перелому в этом случае не соответствует перегиб на кривой K_m, и тем, что с изменением pH критическая температура изменяется от 22 до 32°. Массей считает, что мы имеем здесь дело с диссоциацией фермента (при повышении температуры) на фрагменты меньшего молекулярного веса и что реакция, катализируемая субъединицами, характеризуется более высокой энергией активации. Диссоциация на субъединицы, подобно денатурации, может характеризоваться высоким температурным коэффициентом.

С АТФ-азой миозина (3.6.1.3) в определенных условиях, например в присутствии динитрофенола или актина, график, описываемый уравнением Аррениуса, в области 16° оказывается вогнутым. Если субстратом является не АТФ, а ИТФ, то и в отсутствие динитрофенола и актина на графике наблюдается перегиб [1568, 1569]. Это объясняют изменением конфигурации фермента, которое предотвращается при соединении его с субстратами, содержащими 6-аминогруппу.

5. *Обратимая инактивация фермента.* Кистяковский и Ламри [1391] 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 $E - \Delta H_c$, поэтому независимо от знака ΔH_c ломаная будет обращена «вогнутостью» вниз. 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 прямой реакции.* Массей [1745] в опытах с фумаратгидратазой, действующей в кислой среде, наблюдал изменение наклона графика при температуре около 18°. Эта критическая температура практически не зависит от pH (фиг. 59, *А*). Для реакции, протекающей в обратном направлении (с малатом в качестве субстрата), подобного изменения наклона графика *не наблюдалось* (*фиг.* 59, *Б*). Изменение энергии активации при критической температуре сопровождается в этом случае равным и противоположным по знаку изменением величины «кажущейся» теплоты соединения фермента с фумаратом, определяемой по влиянию температуры на K_m (исходя из допущения, что K_m представляет собой константу равновесия) (фиг. 60). Величины ΔH в двух температурных областях (выше и ниже 18°) при pH 6,35 приведены на фиг. 62. Так как изменение наклона графика наблюдается только в 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 [1746] изменение его сродства к ингибитору (фиг. 61). По-видимому, в кислой среде при температурах выше и ниже критической существует два различных фермент-фумаратных комплекса, каждый из которых является реакционноспособным. В нейтральной же среде изменения наклона графика вообще не наблюдается.

В случае обратимых реакций можно по данным измерений K_s и V для прямой и обратной реакций определить величины теплоты образования ES и EP и величины энергии 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. 3, можно вычислить теплоту общей 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 в обратном направлениях, а разность между ними должна равняться общему тепловому эффекту. Аналогичные расчеты могут быть проведены для величин свободной энергии и энтропии.



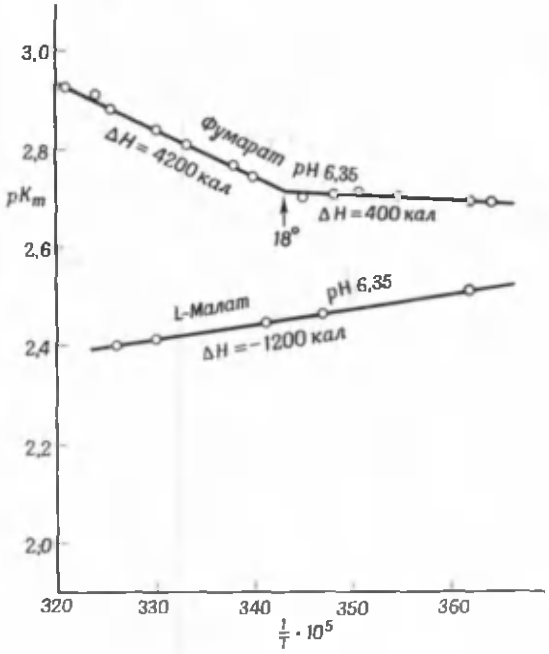
Фиг. 59. Графическое определение величины энергии активации по уравнению Аррениуса для прямой и обратной реакций в системе фумаратгидратазы в кислом растворе [1745].

А. Прямая реакция. *Б*. Обратная реакция.

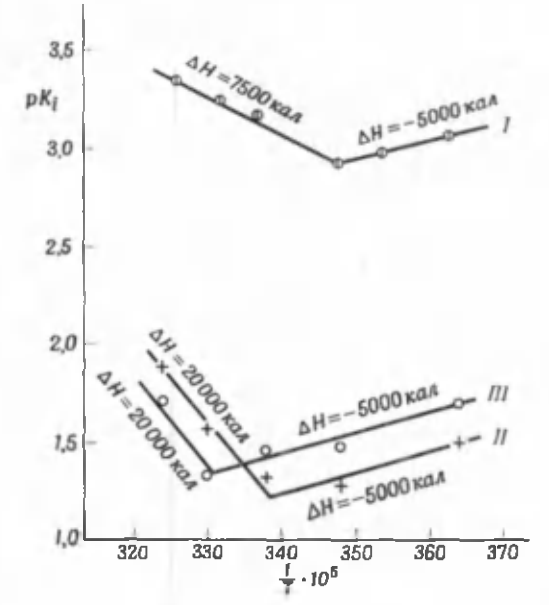
Фумаратгидратаза — единственный фермент, для которого имеются в этом отношении достаточно полные данные [1745]. На фиг. 62 графически представлены полученные экспериментальным путем значения ΔH для фумаразной реакции в кислой среде, причем можно убедиться, что эти величины хорошо согласуются между собой 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 с величинами ΔF и ΔS) в табл. 5. Следует помнить, что, в то время как величины ΔH рассчитаны по наклонам графиков для V и K_m, которые постоянны в определенном интервале температуры, но резко изменяются при критической температуре, величины ΔF определены по действительным значениям V и K_m, которые непрерывно изменяются с температурой без какого-либо резкого изменения в указанной точке. Поэтому величины ΔF следует вычислять для какой-либо определенной температуры; в табл. 5 приведены значения ΔF для 18°.

Было высказано предположение, что удовлетворительные результаты проверки путем суммирования соответствующих величин, иллюстрируемые фиг. 62, доказывают, что для фумаратгидратазы $K_m = K_s$, а V является

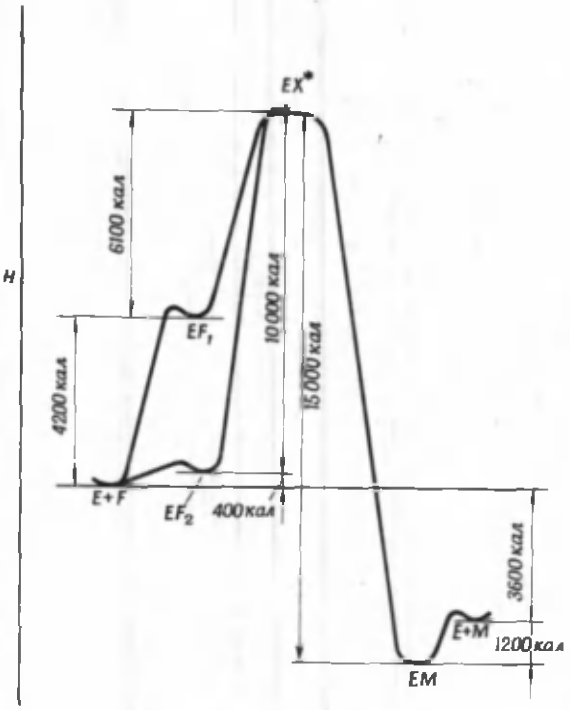


Фиг. 60. Влияние температуры на величину K_m для прямой и обратной реакций в системе фумаратгидратазы в кислом растворе [1745].



Фиг. 61. Влияние температуры на величину K_I для ингибиторов фумаратгидратазы в кислом растворе [1746]. Для прямой и обратной реакций были получены одинаковые величины K_I.

I — *транс*-аконитат; *II* — сукцинат; *III* — малонат.



Фиг. 62. Схематическое изображение изменения H для фумаратгидратазной реакции в кислом растворе [1745].

функцией одной из констант скорости (такие именно допущения и были сделаны при расчете величин ΔH). Однако это не так. Подобных результатов суммирования следует ожидать в любом случае из выражения Холдейна (IV.126), а приложимость этого выражения не ограничивается системами, в которых K_m и V имеют такое простое значение. Из уравнения (IV.126)

Таблица 5

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФУМАРАТГИДРАТАЗЫ ПРИ pH 6,35[1])

Температура	ΔH_{1f}	ΔH^*_{2f}	ΔH_{1b}	ΔH^*_{2b}	$\Delta H_f^{2)}$	ΔH_f
Ниже 18°	400	10 000	−1200	15 000	−3400	−3600
Выше 18°	4200	6 100	−1200	15 000	−3500	−3600
	ΔF_{1f}	ΔF^*_{2f}	ΔF_{1b}	ΔF^*_{2b}	$\Delta F_f^{2)}$	ΔF_f
Незначительно ниже 18°	−3600	12 900	−2800	13 600	−1500	−865
Незначительно выше 18°	−3600	12 900	−2800	13 600	−1500	−865
	ΔS_{1f}	ΔS^*_{2f}	ΔS_{1b}	ΔS^*_{2b}	$\Delta S_f^{2)}$	ΔS_f
Незначительно ниже 18°	13,7	−10	7,1	4,8	−8,2	−9,4
Незначительно выше 18°	26,8	−23,4	7,1	4,8	−8,5	−9,4

[1]) При сопоставлении величин ΔH с данными, приведенными на графиках фиг. 59 и 60, по которым они были найдены, следует помнить, что $\Delta H^* = E - RT$ (уравнение IV.187). Индекс f относится к гидратации фумарата; индекс b — к дегидратации малата.

[2]) Рассчитано.

после логарифмирования и дифференцирования (по температуре) получаем

$$\frac{d\lg V_f}{dT}+\frac{d\lg\frac{1}{K_{mf}}}{dT}-\frac{d\lg V_b}{dT}-\frac{d\lg\frac{1}{K_{mb}}}{dT}=\frac{d\lg K}{dT} \qquad \text{(IV.191)}$$

или, после умножения на $2{,}303RT^2$,

$$(\text{«}\Delta H^*_{2f}\text{»}+RT+\text{«}\Delta H_{1f}\text{»})-(\text{«}\Delta H^*_{2b}\text{»}+RT+\text{«}\Delta H_{1b}\text{»})=\Delta H. \qquad \text{(IV.192)}$$

Так как величины RT сокращаются, то получаем уравнение, идентичное по форме последнему уравнению в примечании к табл. 3. Символами в кавычках обозначены в уравнении (IV.192) величины, полученные графически на основе экспериментальных данных обычным путем. Если бы первоначальные допущения были справедливы, то кавычки можно было бы опустить; однако уравнение остается справедливым также и в том случае, если эти величины являются сложными функциями.

Влияние температуры на состояние ионизации фермента

В разделе, посвященном pH, 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 pH-функций компонентов, в результате которого изменяется характер кривых pH — активность.

Если построить график зависимости pK_m от pH, подобный тем, какие изображены на фиг. 47—52, то положение перегибов на кривых позволит определить величины pK ионизирующихся групп, участвующих в соединении фермента с субстратом. Таким образом, строя кривые для ряда значений температуры, можно по смещению положения перегибов определить изменения pK с изменением температуры. Отсюда теплота ионизации соответствующей группы может быть рассчитана по уравнению

$$\Delta H_i=-2{,}303RT^2\frac{dpK}{dT}. \qquad \text{(IV.193)}$$

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 — для тиоцианата и фумаратгидратазы [2990].

Строя график зависимости $\lg V$ от pH, часто можно определить величины pK ионизирующихся групп, которые влияют на распад комплекса ES. Правда, вследствие наложения перегибов такая интерпретация кривых pH — активность при помощи величин pK не всегда оказывается легкой (см. раздел о влиянии pH). Однако в тех случаях, когда величины pK удается определить, теплоты ионизации соответствующих групп могут быть рассчитаны по величине pK при различных значениях температуры. Это было сделано для трипсина Гутфрейндом [958], который по величине pK и рассчитанной теплоте ионизации заключил, что ионизирующейся группой оказывается в этом случае остаток гистидина.

ГЛАВА V

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 мог бы быть точно идентифицирован. 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 [1118], другую — авторы настоящей книги (см. первое издание), но эти схемы не получили официального признания, и в 1961 г. Международный биохимический союз принял новую схему классификации и номенклатуры ферментов [2212], которой мы и пользуемся в этой книге. Эта классификация была разработана международной Комиссией по ферментам, созданной в 1956 г.

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 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 вызывали возражений, они были сохранены Комиссией как узаконенные тривиальные названия.

Этот метод классификации удобен еще и потому, что химические реакции, катализируемые ферментами, можно разбить на сравнительно небольшое число типов; существование большого числа ферментов объясняется их 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, стереоизомеразы 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 схеме, предложенной Комиссией, окислительные ферменты ввиду их особой важности объединены в отдельную группу. Все известные ферменты по предложению Комиссии разбиты на шесть главных классов:

1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы
3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы, или синтетазы

Система нумерации ферментов, предложенная Комиссией

Комиссия разработала также систему нумерации ферментов, тесно связанную с их классификацией. 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 оксидоредуктазам, трансферазам, гидролазам, лиазам, изомеразам или 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 назвали 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 *доноров*, которая подвергается окислению (1 обозначает CH — OH-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 (НАД или НАДФ), 2 — цитохром, 3 — молеку-

лярный кислород и т.д. Таким образом, первые три числа шифра точно определяют тип фермента; так, например, 1.2.3 обозначает оксидоредуктаау, 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 карбоксилом 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, чтобы оставить место 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 новых классов, подклассов или подподклассов их можно добавлять без нарушения порядка нумерации ранее установленных подразделений.

В табл. 6 дан ключ к системе нумерации и классификации ферментов, разработанной Комиссией по ферментам, а в конце книги приведен список всех известных авторам ферментов, составленный по литературным данным, которые были опубликованы к концу 1961 г. В этом Списке указаны шифры ферментов и их систематические и тривиальные названия. При составлении Списка за основу был взят Список, опубликованный в отчете Комиссии [2212]. В него были дополнительно включены ферменты, открытые уже после опубликования отчета; им мы присвоили временные шифры, например 1.1.1.a; кроме того, мы предложили для них и систематические названия (которые набраны курсивом). В одном или двух случаях более поздние исследования показали, что систематические названия, приведенные в Списке, представленном Комиссией, нуждаются в изменении; в этих случаях мы также выделили предлагаемые новые названия курсивом. Все шифры, состоящие из четырех чисел, и систематические названия, набранные прямым шрифтом, официально приняты Международным биохимическим союзом.

Таблица 6

КЛЮЧ К НУМЕРАЦИИ И КЛАССИФИКАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

1. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

1.1 Действуют на CH — OH-группу доноров

1.1.1 Акцептором служит НАД или НАДФ
1.1.2 Акцептором служит цитохром
1.1.3 Акцептором служит O_2
1.1.99 Используют другие акцепторы

1.2 Действуют на альдегидную или кетонную группу доноров

1.2.1 Акцептором служит НАД или НАДФ
1.2.2 Акцептором служит цитохром
1.2.3 Акцептором служит O_2
1.2.4 Акцептором служит липоат
1.2.99 Используют другие акцепторы

Продолжение табл. 6

1.3 Действуют на CH — CH-группу доноров

1.3.1 Акцептором служит НАД или НАДФ
1.3.2 Акцептором служит цитохром
1.3.3 Акцептором служит O_2
1.3.99 Используют другие акцепторы

1.4 Действуют на CH — NH_2-группу доноров

1.4.1 Акцептором служит НАД или НАДФ
1.4.3 Акцептором служит O_2

1.5 Действуют на C — NH-группу доноров

1.5.1 Акцептором служит НАД или НАДФ
1.5.3 Акцептором служит O_2

1.6 Используют в качестве донора НАД·H_2 или НАДФ·H_2

1.6.1 Акцептором служит НАД или НАДФ
1.6.2 Акцептором служит цитохром
1.6.4 Акцептором служит дисульфидное соединение
1.6.5 Акцептором служит хинон или родственное соединение
1.6.6 Акцептором служит азотистая группа
1.6.99 Используют другие акцепторы

1.7 Используют в качестве доноров другие азотистые соединения

1.7.3 Акцептором служит O_2
1.7.99 Используют другие акцепторы

1.8 Действуют на серусодержащие группы доноров

1.8.1 Акцептором служит НАД или НАДФ
1.8.3 Акцептором служит O_2
1.8.4 Акцептором служит дисульфидное соединение
1.8.5 Акцептором служит хинон или родственное соединение
1.8.6 Акцептором служит азотистая группа

1.9 Действуют на группы гема доноров

1.9.3 Акцептором служит O_2
1.9.6 Акцептором служит азотистая группа

1.10 Используют в качестве доноров дифенолы и родственные им соединения

1.10.3 Акцептором служит O_2

1.11 Используют в качестве акцептора H_2O_2

1.98 Ферменты, использующие в качестве восстановителя H_2

1.99 Прочие ферменты, использующие в качестве окислителя O_2

1.99.1 Гидроксилазы
1.99.2 Оксигеназы

2. ТРАНСФЕРАЗЫ

2.1 Переносят одноуглеродные группы

2.1.1 Метилтрансферазы
2.1.2 Трансферазы оксиметильных, формильных и родственных им групп
2.1.3 Карбоксил- и карбамоилтрансферазы

2.2 Переносят альдегидные или кетонные остатки

2.3 Ацилтрансферазы

2.3.1 Ацилтрансферазы
2.3.2 Аминоацилтрансферазы

Продолжение табл. 6

2.4 Гликозилтрансферазы
- 2.4.1 Гексозилтрансферазы
- 2.4.2 Пентозилтрансферазы

2.5 Переносят алкильные или родственные им группы

2.6 Переносят азотистые группы
- 2.6.1 Аминотрансферазы
- 2.6.2. Амидинотрансферазы
- 2.6.3 Оксиминотрансферазы

2.7 Переносят группы, содержащие фосфор
- 2.7.1 Фосфотрансферазы со спиртовой группой в роли акцептора
- 2.7.2 Фосфотрансферазы с карбоксильной группой в роли акцептора
- 2.7.3 Фосфотрасферазы с азотистой группой в роли акцептора
- 2.7.4 Фосфотрансферазы с фосфатной группой в роли акцептора
- 2.7.5 Фосфотрансферазы, катализирующие реакции кажущегося внутримолекулярного переноса
- 2.7.6 Пирофосфотрансферазы
- 2.7.7 Нуклеотидилтрансферазы
- 2.7.8 Переносят другие замещенные фосфатные группы

2.8 Переносят группы, содержащие серу
- 2.8.1 Сульфидтрансферазы
- 2.8.2 Сульфотрансферазы
- 2.8.3 КоА-трансферазы

3. ГИДРОЛАЗЫ

3.1 Действуют на сложноэфирные связи
- 3.1.1 Гидролазы эфиров карбоновых кислот
- 3.1.2 Гидролазы тиоловых эфиров
- 3.1.3 Гидролазы фосфомоноэфиров
- 3.1.4 Гидролазы фосфодиэфиров
- 3.1.5 Гидролазы трифосфомоноэфиров
- 3.1.6 Гидролазы сульфоэфиров

3.2 Действуют на гликозильные соединения
- 3.2.1 Гидролазы гликозидов
- 3.2.2 Гидролазы N-гликозильных соединений
- 3.2.3 Гидролазы S-гликозильных соединений

3.3 Действуют на эфирные связи
- 3.3.1 Гидролазы тиоэфиров

3.4 Действуют на пептидные связи (пептид-гидролазы)
- 3.4.1 α-Аминопептид-аминоацидогидролазы
- 3.4.2 α-Карбоксипептид-аминоацидогидролазы
- 3.4.3 Дипептид-гидролазы
- 3.4.4 Пептид-пептидогидролазы

3.5 Действуют на C — N-связи, отличные от пептидных связей
- 3.5.1 В линейных амидах
- 3.5.2 В циклических амидах
- 3.5.3 В линейных амидинах
- 3.5.4 В циклических амидинах
- 3.5.99 В других соединениях

3.6 Действуют на кислотноангидридные связи
- 3.6.1. В фосфорилсодержащих ангидридах

Продолжение табл. 6

3.7 Действуют на С — С-связи
3.7.1 В кетосоединениях

3.8 Действуют на галоидные связи
3.8.1 В С-галоидных соединениях
3.8.2 В Р-галоидных соединениях

3.9 Действуют на Р — N-связи

4. ЛИАЗЫ

4.1 Углерод — углерод-лиазы
4.1.1 Карбокси-лиазы
4.1.2 Альдегид-лиазы
4.1.3 Лиазы кетокислот

4.2 Углерод — кислород-лиазы
4.2.1 Гидро-лиазы
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

5. ИЗОМЕРАЗЫ

5.1 Рацемазы и эпимеразы
5.1.1 Действуют на аминокислоты и их производные
5.1.2 Действуют на оксикислоты и их производные
5.1.3 Действуют на углеводы и их производные
5.1.99 Действуют на другие соединения

5.2 *Цис-транс*-изомеразы

5.3 Внутримолекулярные оксидоредуктазы
5.3.1 Катализируют взаимопревращения альдоз и кетоз
5.3.2 Катализируют взаимопревращения кетонных и енольных групп
5.3.3 Перемещают С=С-связи

5.4 Внутримолекулярные трансферазы
5.4.1 Переносят ацильные группы
5.4.2 Переносят фосфорильные группы
5.4.99 Переносят другие группы

5.5 Внутримолекулярные лиазы

6. ЛИГАЗЫ

6.1 Образуют С — О-связи
6.1.1 Лигазы, образующие аминоацил-РНК

6.2 Образуют С — S-связи
6.2.1 Кислото-тиоловые лигазы

6.3 Образуют С — N-связи
6.3.1 Кислото-аммиачные лигазы (амид-синтетазы)
6.3.2 Кислото-аминокислотные лигазы (пептид-синтетазы)
6.3.3 Цикло-лигазы
6.3.4 Прочие С — N-лигазы
6.3.5 С — N-лигазы с глутамином в роли N-донора

6.4 Образуют С — С-связи

Правила систематической и тривиальной номенклатуры

Комиссия по ферментам включила в свой отчет свод правил для построения систематических и тривиальных названий ферментов. На основании этих правил были составлены названия, приведенные в Списке ферментов, и с их же помощью могут быть составлены названия для новых ферментов.

ОБЩИЕ ПРАВИЛА

	Систематическая номенклатура	*Тривиальная номенклатура*
Правило 1.	Входящие в названия ферментов названия субстратов должны быть сформулированы возможно точнее, в соответствии с официальными правилами Международного союза чистой и прикладной химии (см. Handbook for Chemical Society Authors, Chemical Society, London, 1960). Примеры: N-D-рибозилпурин, а не пуринрибозид; 2-амино-2-дезокси-D-глюкоза, а не глюкозамин. Для указания положения заместителей следует применять систему цифр (1, 2, 3), а не греческих букв (α, β, γ); буквы α и β используются для обозначения конфигураций, хотя допустимы такие обозначения группы, как β-аспартил, γ-глутамил, а также названия β-аланин, γ-лактон. Остатки нуклеотидов обозначаются наименованиями типа «аденилил-» (не «аденил-»). Для фосфорных соединений могут применяться формы «глюкозофосфат» или «фосфоглицерат» в зависимости от отсутствия или наличия в молекуле другой кислотной группы. Название «кетокислоты» можно применять как обозначение всего класса соединений, но для отдельных соединений следует употреблять префикс «оксо-».	Допустимо употребление общепринятых тривиальных названий субстратов. Приставки D- у обычных сахаров и L- у обычных аминокислот опускаются. При желании можно использовать буквы α, β, γ вместо порядковых цифр для обозначения положения замещающих групп там, где в настоящее время принят этот способ обозначения; как правило, в тривиальных названиях нет надобности указывать положение заместителей.
Правило 2.	В тех случаях, когда субстрат в нормальных условиях находится в форме аниона, в названии фермента указывается анион (его название с окончанием «-ат»), а не свободная кислота (или ее обозначение с суффиксом «-ико»); пример: «лактатдегидрогеназа», а не «лактикодегидрогеназа» или «дегидрогеназа молочной кислоты». Исключение: карбокси-лиаза 2-оксикислот (фермент 4.1.1.1).	
Правило 3.	Общепринятые сокращенные названия субстратов, привычные для химиков, например АТФ, могут применяться в систематических назва-	Сокращение названий ферментов (например, «ГДГ») крайне нежелательно.

ниях ферментов, однако следует воздерживаться от введения новых сокращений.

Правило 4. Названия субстратов, в обычном начертании состоящие из раздельных слов, например «glucose phosphate», могут в названиях ферментов соединяться дефисами, например «glucoso-6-phosphate dehydrogenase» (1.1.1.49) [1].

Правило 5. От использования в качестве названий ферментов описательных названий, таких, как «конденсирующий фермент», «промежуточный фермент», «ацетат-активирующий фермент», «pH-5-фермент», «яблочный фермент» (malic enzyme), *следует отказываться всякий раз*, как будет установлена природа катализируемой реакции. Слово «активирующий» не должно употребляться в смысле «превращающий субстрат в вещество, участвующее в дальнейшей реакции»; действие всех ферментов включает активирование соответствующих субстратов, и применение этого слова в указанном, относительно новом смысле дает повод к недоразумениям.

Правило 6. В тех случаях, когда систематическое название фермента достаточно кратко, нет надобности вводить отдельное тривиальное название.

Правило 7. Там, где этого *можно избежать* не следует строить тривиальное название фермента, исходя из названия вещества, не являющегося его истинным субстратом; например, фермент 4.2.1.17 нельзя называть «кротоназой», так как он не действует на кротонат.

Правило 8. Название фермента, как правило, составляется из двух частей. Первая *указывает название субстрата* или (при бимолекулярных реакциях) названия двух субстратов, разделенные знаком деления (двоеточие без интервала). Вторая часть названия с окончанием «-аза» указывает природу реакции. См. также правило 13[2]. То же относится к большинству тривиальных названий, которые *менее детализованы*. Большинство тривиальных названий идентично прежним общепринятым названиям ферментов. В отдельных случаях одно тривиальное название может употребляться для двух или нескольких ферментов.

Правило 9. Окончание «-еза» (как в слове «роданеза») впредь не должно употребляться.

---

[1] Акад. А. Е. Браунштейн, член Комиссии по ферментам, представляющий в ней Советский Союз, в первом переводе «Классификации и номенклатуры ферментов» (Москва, ИЛ, 1962) дал к этому пункту следующее примечание, которое мы считаем нужным привести здесь:

«Это правило относится к номенклатуре на английском и некоторых других языках. Для номенклатуры на русском языке Комиссия по номенклатуре Всесоюзного биохимического общества предлагает ввести следующее дополнительное правило:

Правило 4а. Часть систематического названия, которая включает названия субстратов и может содержать знаки препинания (дефисы, знак деления и т. п.), пишется в отличие от английской номенклатуры не раздельно от второй части названия, указывающей *тип действия фермента, а через длинную соединительную черточку (знак связи)*, например «глюкозо-6-фосфат:НАДФ — оксиредуктаза». В тривиальной номенклатуре название субстрата и слово, указывающее тип действия фермента, можно писать слитно, если ни в том, ни в другом нет разделительных знаков; в противном случае между ними ставится дефис или знак связи, например: «глюкозодегидрогеназа», но «глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа»; «гистидиндекарбоксилаза», но «аспартат-β-декарбоксилаза». Дефис допустимо применять и в других случаях расчленения громоздких и труднопроизносимых названий (см. также правило 24)».— *Прим. ред.*

[2] См. примечание к правилу 4.

Правило 10. В систематическое название включается одно из следующих специальных слов, указывающих особые типы реакций: «оксидоредуктаза», «рацемаза», «изомераза», «эпимераза», «лиаза», «лигаза», «гидролаза», «трансфераза», «мутаза».

Суффикс «-аза» не должен присоединяться непосредственно к названию субстрата.

При образовании тривиальных названий могут употребляться и другие слова, в том числе: «таутомераза», «киназа», «фосфорилаза», «редуктаза», «оксидаза», «дегидрогеназа», «пероксидаза» и т. п.

Прямое присоединение окончания «-аза» к названию субстрата обозначает гидролитический фермент. Исключения: тиаминаза I (2.5.1.2), рибонуклеаза (2.7.7.16).

Правило 11.

Название «дегидраза», которым в прошлом обозначали как дегидрогенизирующие, так и дегидратирующие ферменты, впредь не будет применяться. Для первого типа ферментов употребляется название «дегидрогеназа», для второго — «дегидратаза».

Правило 12. В случае обратимых реакций направление реакции, избранное для составления названия, должно быть одним и тем же для всех ферментов данного класса, даже если это направление не во всех случаях было показано в эксперименте. Таким образом, систематические названия могут быть основаны на написанном уравнении реакции даже тогда, когда фактически была установлена лишь обратная реакция.

Тривиальные названия, как правило, базируются на фактически установленном направлении реакции например «дегидрогеназа» или «редуктаза», «декарбоксилаза» или «карбоксилаза».

Правило 13. Если суммарная реакция включает два различных превращения, например представляет окислительное деметилирование, то вторую функцию следует указывать, добавляя в круглых скобках соответствующее причастие, например: «саркозин: O_2 — оксидоредуктаза (деметилирующая)» или «D-аспартат: O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)»; см. 1.5.3.1 и 1.4.3.1. Другие примеры таких определений в форме причастий: «(декарбоксилирующая)», «(циклизующая)», «(ацетилирующая акцептор)», «(изомеризующая)».

Правило 14. Когда фермент катализирует реакции нескольких типов или действует более чем на один субстрат (или одну пару субстратов), в названии обычно указывается только один субстрат (одна пара субстратов) и одна реакция. Для таких случаев еще не найдено общего правила. Каждый

случай требует особого рассмотрения, и выбор названия в известной мере произволен. В некоторых случаях возможно (и допустимо) использование собирательного названия, охватывающего целую группу субстратов.

ПРАВИЛА, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ОТДЕЛЬНЫМ КЛАССАМ ФЕРМЕНТОВ

Класс 1. Оксидоредуктазы

Правило 15. Все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, в систематической номенклатуре называются «оксидоредуктазами»; названия их составляются по форме: «донор : акцептор — оксидоредуктаза».

В основном, как и прежде, применяются названия «дегидрогеназа» и «редуктаза». В случаях, когда перенос водорода от вещества, указанного в систематическом названии в качестве донора, трудно доказуем, используется название «редуктаза». Для некоторых ферментов сохраняется прочно установившееся название «трансгидрогеназа». «Оксидаза» применяется только в тех случаях, когда акцептором служит O_2, а «оксигеназа»— в случаях, когда молекула O_2 прямо присоединяется к субстрату. «Пероксидаза» относится к ферментам, использующим в качестве акцептора H_2O_2. Название «каталаза» приходится рассматривать как исключение. Второй участник реакции в тривиальных названиях обычно не фигурирует (если не считать слов «оксидаза», «оксигеназа» и «пероксидаза»).

Правило 16. В названиях оксидоредуктаз, использующих НАД или НАДФ, кофермент всегда указывается как акцептор (кроме группы 1.6, представляющей особый случай). В случаях, когда фермент может реагировать с обоими коферментами, это можно обозначить сокращением «НАД(Ф)».

Правило 17. Когда истинный акцептор не установлен и известны только реакции дегидрогеназы с искусственными акцепторами, можно включать в название слово «акцептор» в круглых скобках, например: «сукцинат: (акцептор) — оксидоредуктаза» (см. 1.3.99.1). (Вещества, используемые в эксперименте в качестве акцепторов, приведены в Списке ферментов в столбце 6.)

Правило 18. Для ферментов, катализирующих реакции гидроксилирования субстратов в присутствии НАД(Ф)·H_2 и O_2, систематические названия не предлагаются. Природа этих реакций еще не выяснена; возможно, что в каждой из них участвует более одного фермента.

Эти ферменты можно обозначать как «субстрат-*n*-гидроксилаза», где *n*—цифра, указывающая положение, в которое вводится гидроксильная группа (см. класс 1.99.1).

Класс 2. Трансферазы

Правило 19. Ферменты, катализирующие реакции переноса групп, называются «трансферазами»; их названия составляются по форме: «донор : акцептор — транспортируемая группа-трансфераза», например: «АТФ : ацетат — фосфотрансфераза» (2.7.2.1). Можно пользоваться цифровыми приставками для обозначения положения, в котором присоединяется перенесенная группа, например: «АТФ : :D-фруктоза — 1-фосфотрансфераза» (2.7.1.3). Название «трансфораза» не применяется.

В тривиальной номенклатуре названия «аминотрансфераза» и т. п. могут по желанию заменяться соответствующими формами — «трансаминаза» и т. п.

Для обозначения отдельных типов реакций применяется ряд специальных названий; так, «киназа» (не «фосфокиназа») обозначает перенос фосфатного остатка от АТФ, «пирофосфокиназа»— аналогичную реакцию переноса пирофосфатного остатка, «фосфомутаза»— кажущийся внутримолекулярный перенос фосфатного остатка. Названия «фосфорилаза» и «пирофосфорилаза», как указано в разделе А этой главы, не находятся в строгом соответствии с рекомендуемым способом рассмотрения реакций переноса; но эти названия прочно вошли в обиход и приводятся в Списке как альтернативы наряду с предпочтительными тривиальными названиями для некоторых ферментов, относящихся к группам 2.4.1, 2 и 7.

Правило 20. В названиях киназ АТФ всегда указывается как донор. В названиях аминотрансфераз, одним из субстратов которых является 2-оксоглутарат, последнее соединение всегда указывается как акцептор.

Правило 21. Префикс, обозначающий транспортируемую группу, по возможности не должен подразумевать определенный механизм переноса, например «фосфо-» (а не «фосфат-» или «фосфорил-»).

Класс 3. Гидролазы

Правило 22. Названия гидролаз составляются по форме: «субстрат — гидролаза». У гидролаз, специфически отщепля-

Прямое присоединение окончания «-аза» к названию субстрата как общее правило обозначает гидро-

ющих определенную группу, эта группа может быть указана префиксом, например: «аденозин — аминогидролаза» (3.5.4.4). В ряде случаев фермент способен также переносить эту группу на другие молекулы, и сама реакция гидролиза может рассматриваться как перенос такой группы на воду.

Правило 23. Создать систематическую номенклатуру, охватывающую все пептидгидролазы, в настоящее время невозможно ввиду того, что специфичности этих ферментов перекрываются. Раздельное существование некоторых из них как индивидуальных ферментов не совсем достоверно.

лазу. Там, где это представляет затруднения, например в случае фермента 3.1.2.1, можно использовать слово «гидролаза». Для отдельных классов гидролаз применимы специальные названия, например «фосфатазы», «дезаминазы».

Не следует, как правило, давать ферментам отдельные названия на основании оптимальных условий действия. Названия этого рода для «кислых» и «щелочных» фосфатаз (3.1.3.1 и 2) и для АТФ-аз (3.6.1.3 и 4) следует рассматривать как исключительные случаи, а не как образцы для подражания.

В качестве тривиальных названий можно использовать принятые в настоящее время названия. Для новых ферментов тривиальные названия могут составляться по форме: «источник — пептидгидролаза», в случае надобности — с присоединением буквы для различения от других сходных ферментов. От употребления названий, основанных на названиях отдельных белков — субстратов (например, «коллагеназа», «эластаза»), и таких названий, как «коагулаза» или «паратрипсин» и «гомотрипсин», следует отказаться.

Класс 4. Лиазы

Правило 24. Ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путем определенные группы с образованием двойных связей (или присоединяющие группы по двойным связям), в систематической номенклатуре обозначаются названием «лиазы». Чтобы указать тип реакции, используют префиксы: «гидро-», «аммиак-» и др. Пример: «L-малат — гидро-лиаза» (4.2.1.2). Декарбоксилазы рассматриваются как карбоксилпиазы. Перед словом «лиаза» всегда ставится дефис во избежание смешения с названиями «гидролаза», «карбоксилаза» и т. п.

Сохраняются существующие названия «декарбоксилаза», «альдолаза» и т. д.; для гидро-лиаз используется название «дегидратаза» (не «дегидраза»).

Слово «синтетаза» для ферментов этого класса не должно употребляться; там, где оно было принято, оно заменяется словом «синтаза», чтобы подчеркнуть элемент синтеза в катализируемой реакции (в том числе во всех случаях, где реакция присоединения, осуществляемая лиазой, сопровождается расщеплением тиоэфирной связи).

Правило 25. В качестве субстрата указывается молекула целиком, а не одна из частей, на которые она разлагается.

В тех случаях, когда это подсказывается положением равновесия или когда традиционное название фермента базировалось на определенном субстрате, за основу тривиального

названия может быть принята обратная реакция с применением слов «гидратаза», «карбоксилаза» и т. п.; например, для фермента 4.2.1.2 используется название «фумаратгидратаза» (*не* «фумараза», что означает фермент, гидролизующий фумарат). Слово «ангидраза» (фермент 4.2.1.1) не следует рассматривать как эквивалент слова «дегидратаза»; оно допущено потому, что субстратом является угольный ангидрид, но этот случай надо рассматривать как исключение.

Класс 5. Изомеразы

Правило 26. Как общее название ферментов этого класса применяется термин «изомеразы».

Большинство тривиальных названий в этом классе будут подобны систематическим, с некоторыми упрощениями, где это возможно.

Правило 27. Типы реакций изомеризации указываются при помощи префиксов; примеры: «малеинат — *цис-транс*-изомераза» (5.2.1.1), «фенилпируват — кето-енол-изомераза» (5.3.2.1), «3-кетостероид — Δ^4-Δ^5-изомераза» (5.3.3.1).

Ферменты, катализирующие взаимные превращения альдоз и кетоз, известны под названием «кетол-изомераз», например «L-арабиноза — кетол-изомераза» (5.3.1.4). Когда изомеризация состоит во внутримолекулярном переносе группы, фермент называют «мутазой» (например, 5.4.1.1); когда она заключается во внутримолекулярной реакции лиазного типа, как, например, у фермента 5.5.1.1, применяется термин «— лиаза(дециклизующая)».

Правило 28. Изомеразы, катализирующие реакции инверсии асимметрических групп, называют «рацемазами» или «эпимеразами» в зависимости от наличия в молекуле субстрата одного или более одного центра асимметрии (ср., например, 5.1.1.5 и 6). Чтобы указать положение атома, при котором происходит инверсия, используют цифровую приставку перед словом «эпимераза».

Класс 6. Лигазы

Правило 29. Ферменты, катализирующие присоединение друг к другу двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи в молекуле АТФ (или аналогичного трифосфата), будут именоваться «лигазами». Такие ферменты до сих пор называли «синтетазами»; однако в последнее время это название стали применять и к синтезирующим ферментам, действующим без участия нуклеозидтрифосфатов. Кроме того, название «синтетазы» отличается от всех прочих систематических названий тем, что оно базируется на продукте реакции, а не на субстрате. По этим двум причинам возникла необходимость в новом систематическом названии для ферментов этого класса.

Ввиду того что ферменты этого класса широко известны как «синтетазы», это обозначение сохраняется в тривиальных названиях, с тем чтобы избежать чрезмерно больших изменений в существующей номенклатуре. Название «синтетазы» не должно применяться для ферментов, действующих без участия нуклеозидтрифосфатов (см. правило 24).

Правило 30. Систематические названия составляются по форме: «X : Y — лигаза (АДФ)», где X и Y обозначают соединяющиеся молекулы. В круглых скобках указано вещество, образующееся из трифосфата, обычно АДФ или АМФ. Таким образом, «(АДФ)» означает «(освобождающая АДФ)»; тем самым этот символ одновременно указывает и на то, что в роли трифосфата выступает АТФ, и на то, что расщеплению подвергается терминальная пирофосфатная связь. Следовательно, реакция протекает по уравнению: $X + Y + АТФ = X — Y + АТФ + Фосфат$.

Тривиальные названия составляются по форме: «X-Y-синтетаза», где через X-Y обозначено вещество, образующееся в результате соединения X и Y. В реакциях, в которых Y представляет CO_2, в порядке исключения можно использовать название «X-карбоксилаза». Не следует употреблять названия типа «X-активирующий фермент» (см. правило 5).

Правило 31. В специальном случае, когда глутамин выступает в роли донора аммиака, может быть использован термин «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

Оксидоредуктазы — это ферменты, катализирующие реакции биологического окисления и восстановления и, следовательно, связанные с процессами дыхания и брожения. Класс оксидоредуктаз объединяет не только

дегидрогеназы и оксидазы (1.1—1.10), но также и пероксидазы (1.11), использующие в качестве окислителя H_2O_2, гидроксилазы (1.99.1), катализирующие реакции введения гидроксильных групп с помощью механизма, пока еще не совсем расшифрованного, и оксигеназы (1.99.2), которые присоединяют к субстрату молекулярный кислород по месту двойной связи.

Дегидрогеназы и оксидазы

Следует отметить, что типы реакций, катализируемых подгруппами ферментов 1.1 и 1.4, очень сходны. Основное отличие заключается в том, что вместо атома — О —, 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 змеиного яда (1.4.3.2) [782]. Если, как полагают, альдегиды окисляются в форме гидратов или в виде соединений с веществами, содержащими тиоловые группы, то ферменты подгруппы 1.2 также в конечном счете окисляют CH — OH-группу. Эти три подгруппы насчитывают не менее 123 ферментов.

Особенный интерес представляет тот факт, что среди ферментов этих подгрупп встречается несколько пар ферментов, катализирующих одни и те же реакции окисления, но переносящие водород на разные акцепторы. Таковы, например, пары, в которых одни ферменты переносят водород на НАД, а другие — на НАДФ (1.1.1.1 и 2; 1.1.1.32 и 33; 1.1.1.38 и 40; 1.1.1.41 и 42; 1.2.1.3 и 4; 1.2.1.6 и 7; 1.2.1.12 и 13); пары, в которых одни ферменты используют в качестве акцепторов кофермент, а другие — цитохром (1.1.1.8 и 1.1.2.1; 1.1.1.27 и 1.1.2.3; 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). Имеются также пары, в которых оба фермента действуют на одно и то же вещество, 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; 1.1.2.3 и 1.1.3.2; 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). 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 неспецифичных ферментов, катализирующих реакции окисления альдегидов, входит несколько специфичных ферментов, действие которых связано с использованием энергии; процессы окисления, катализируемые этими ферментами, ведут к образованию таких «богатых энергией» соединений, как тиоловые эфиры или смешанные ангидриды. Поскольку глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12) играет важную роль в обмене углеводов, она была тщательно исследована. Механизм ее действия подробно разобран в табл. 41. Два других фермента, нуждающиеся в тиаминпирофосфате и использующие липоат в качестве акцептора водорода и ацетильных групп, также играют важную роль в обмене углеводов; они подробно обсуждаются в гл. IX.

В подгруппу 1.3 входят ферменты, катализирующие реакции переноса двух атомов водорода от CH — CH-групп с образованием C=C-групп; следовательно, эти ферменты катализируют образование ненасыщенных соединений. Ферменты 1.3.2.1 и 2 играют важную роль в метаболизме жиров (см. табл. 44). Сукцинатдегидрогеназа — хорошо известный фермент, играющий важную роль в цикле лимонной кислоты (табл. 42); она стоит

под номером 1.3.99.1, поскольку неизвестна природа акцептора в катализируемых ею реакциях.

В подгруппу 1.4 входят ферменты, катализирующие реакции окислительного дезаминирования; исключение составляет фермент 1.4.1.6, катализирующий процесс циклизации 5-аминовалерата. 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. Это связано с тем, что 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, рассматривающей коферменты как акцепторы. Ферменты 1.6.6.1—4 катализируют реакцию *восстановления нитрата до аммиака или аминогрупп* 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 1.9.3.1, который подробно рассматривается в гл. IX. Многие ферменты этой подгруппы содержат в своем составе медь.

Пероксидазы

В подгруппу 1.11 входит целый ряд ферментов, использующих в качестве окислителя H_2O_2. Классические пероксидазы (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 (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 (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.

Гидроксилазы и оксигеназы

Подгруппу 1.99 образуют ферменты, которые катализируют включение в молекулу субстрата атома кислорода из O_2. Многие, а возможно все, гидроксилазы в отличие от оксигеназ требуют присутствия восстановленной формы одного из коферментов, который в этом процессе окисляется с помощью O_2. Детали механизма этого сопряженного окисления остаются неясными. Гидроксилазы играют важную роль в метаболизме стероидов и других циклических соединений. Оксигеназы катализируют включение целой молекулы O_2 в процессе *окислительного расщепления двойной связи углерод — углерод*.

Гидрогеназа (1.98.1.1) принадлежит к оксидоредуктазам и включена в группу 1.

2. 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 2.4.2.13. Фермент 2.1.1.4, локализованный в эпифизе, ответствен за образование гормона мелатонина.

Другие переносчики одноуглеродных групп

В гл. IX указывается, что тетрагидрофолат служит переносчиком $-CH_3$-, $-CH_2OH$-, —CHO- или $-CH=NH$-групп. Ферменты, катализирующие перенос этих групп, играющих 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 диоксиацетон от одного альдегида на другой путем образования промежуточного комплекса диоксиацетон — фермент [2731]. Таким образом, в одном случае в реакции участвует 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 пентозофосфата (табл. 59 и 45).

Ацилтрансферазы

Все ферменты подгруппы 2.3.1 катализируют перенос ацильных групп при участии кофермента А. Кофермент А, 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 кофермента А, 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. Фосфат-ацетилтрансфераза (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 (см. табл. 41).

Гликозилтрансферазы

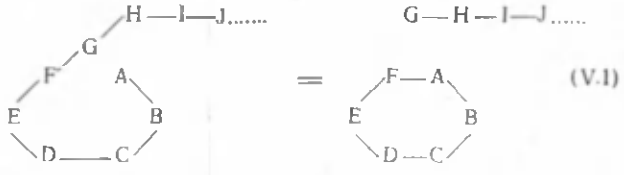
Ферменты подгруппы 2.4 катализируют реакции переноса остатков сахаров на различные акцепторы, особенно на — OH-группы другого сахара, на свободный фосфат или на атом азота в гетероциклическом кольце. Большинство реакций, которые здесь рассматриваются, протекает без уча-

стия 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 радикалов на свободный фосфат; ферменты 2.4.1.1, 2.4.1.8 и 2.4.2.1—4 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 может играть роль одного из *нескольких возможных акцепторов*.

Наиболее известная фосфорилаза (2.4.1.1) обратимо переносит глюкозу из соединения с фосфатом на нередуцирующий конец цепи полисахарида. Поэтому для начала реакции ей необходимо 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 и переносит его на другую цепь, так что при повторении переносов строится цепь, содержащая исключительно 1,6-связи.

Фермент 2.4.1.19 переносит часть цепи на нередуцирующий конец той же цепи, удаляя таким образом часть молекулы в форме кольца



(V.1)

Здесь буквы означают глюкозные остатки, *расположенные друг за другом*, если считать с нередуцирующего конца. Редуцирующая группа F переносится из положения 4 остатка G в положение 4 остатка A; при этом образуется нередуцирующий циклический декстрин, обычно содержащий 6 или 7 глюкозных остатков. Данный фермент катализирует также реакции, подобные реакциям, катализируемым ферментом 2.4.1.3, а именно перенос одного глюкозного остатка одной из двух молекул мальтозы, участвующих в реакции, в положение 4 концевого глюкозного остатка другой молекулы мальтозы:

$$2\ \text{Мальтоза} = \text{Мальтотриоза} + \text{Глюкоза}.$$

Однако фермент 2.4.1.3, насколько известно, не образует циклических декстринов. Фермент 2.4.1.3 относится к тому же классу, что и ферменты 2.4.1.4, 2.4.1.5, 2.4.1.9 и 2.4.1.10, которые, подобно фосфорилазе, строят различного типа полисахаридные цепи, перенося гликозильные группы, но не из их соединения с фосфатом, а из таких соединений, как дисахариды. 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 остатка* (даже самой сахарозы — с образованием лейкрозы); ферменты 2.4.1.9 и 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 (2.4.1.8), происходит оптическая инверсия с образованием β-формы глюкозы; это обусловлено механизмом реакции (см. гл. VII). Когда фермент 2.4.1.7 действует не как фосфорилаза, а радикал R′ представлен кетозой, образуется нередуцирующая 1,2-связь; если роль R′ играет L-арабиноза, образуется 1,3-связь, а если R′ представлен арсенатом, происходит быстрый гидролиз благодаря спонтанному гидролизу глюкозоарсената.

Следует отметить, что ферменты 2.4.1.11—17 действуют на производные уридиндифосфата. Фермент 2.4.1.11 участвует в образовании гликогена в животных тканях, фермент 2.4.1.13— в образовании сахарозы у тех растений, которые не содержат фермента 2.4.1.7, а фермент 2.4.1.c — в образовании лактозы молока.

Ферменты 2.4.2.1—6 могут образовывать нуклеозиды; в этих соединениях сахар связан непосредственно с атомом N, а не с атомом O.

Ферменты 2.4.2.7—12 подобны фосфорилазам, но в реакциях, катализируемых ими, участвует пирофосфат, а не ортофосфат. Эти ферменты часто называют пирофосфорилазами; однако они, по существу, представляют собой трансрибозилазы, и их не следует путать с пирофосфорилазами, осуществляющими реакцию трансфосфорилирования, которые помещены в подгруппу 2.7.7. Пирофосфорилазы в подгруппе 2.4.2 катализируют реакцию образования мононуклеотидов, тогда как ферменты, включенные в подгруппу 2.7.7, образуют динуклеотиды.

Фермент 2.4.2.13 превращает метионин в источник активных метильных групп. Основной особенностью реакции является превращение соединения $S(CH_3)-CH_2R$ в соединение $R'-CH_2\overset{+}{S}(CH_3)-CH_2R$, из которого затем, после удаления метильной группы ферментом трансметилазой, образуется $R'CH_2SCH_2R$.

Алкилтрансферазы

В подгруппу 2.5 входят несколько недавно открытых ферментов, которые катализируют реакцию переноса у атомов углерода в сложных по своему строению субстратах. Фермент 2.5.1.1 играет важную роль в биосинтезе изопреноидных соединений, в том числе каротиноидов, стероидов, каучука, убихинона и т. д. Фермент 2.5.1.a катализирует реакцию образования тиаминмонофосфата из замещенного тиазола и соответствующего пиримидинпирофосфата; эта реакция представляет еще один тип «пирофосфорилазной» реакции. Фермент 2.5.1.2 катализирует реакцию расщепления тиамина, осуществляя подобный перенос на целый ряд оснований. Фермент 2.5.1.b катализирует реакцию внутримолекулярного переноса, ведущего к образованию лактона.

Ферменты, переносящие азотистые группы

Трансаминазы играют важную роль в обмене аминокислот. Число трансаминаз, существование которых достоверно установлено (подгруппа 2.6.1), за последнее время значительно возросло. Многие из них в присутствии глутамата и глутаматдегидрогеназ (1.4.1.2—4) могут образовывать ряд аминокислот из кетокислот и аммиака; при этом глутамат служит переносчиком аммиака. Имеются также две трансаминазы глутамина; одна из них переносит его α-аминогруппу (2.6.1.15), а другая (2.6.1.16) — ами-

ногруппу амидной группировки. В последнем случае акцептором служит сахар. Фермент 2.6.1.14 сходен с ферментом 2.6.1.15, но специфичен в отношении аспарагина. Ферменты 2.6.1.11, 2.6.1.13, 2.6.1.b и 2.6.1.c переносят ω-аминогруппу и отличаются от других ферментов данной группы тем, что продукт, образующийся в результате их действия, представляет собой альдегид. Фермент 2.6.1.10 участвует в образовании у *Bacillus subtilis* специфических пептидов, содержащих D-аминокислоты. Активность ферментов 2.6.1.1 и 2 в сыворотке широко используется в клинике с диагностической целью, так как ткань миокарда богата первым ферментом, а печень — вторым, и в том случае, когда в указанных тканях имеют место процессы распада, эти ферменты поступают в кровь.

Глицинтрансаминаза (2.6.2.1) — единственный фермент, осуществляющий перенос — C (= NH)NH_2-группы и участвующий в биологическом синтезе креатина; фермент 2.6.3.1 катализирует реакцию переноса = NOH-группы.

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 может осуществляться перенос энергии от одной системы к другой в форме богатых энергией фосфатных связей (см. стр. 531). 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 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.

Необходимо отметить, что большинство ферментов, фосфорилирующих сахара, осуществляют фосфорилирование у одного из концевых углеродов, если оба они не блокированы, как в случае НАД (2.7.1.23) и дефосфокофермента А (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.

В общей сложности 16 ферментов (2.7.1.26—39) фосфорилируют первичные спирты. Бублитц и Кеннеди [351] с помощью меченого АТФ показали, что фермент 2.7.1.30 постоянно фосфорилирует один и тот же конец молекулы глицерина, несмотря на то что эта молекула симметрична. Бёрнет и Кеннеди [365] нашли, что фермент 2.7.1.37 фосфорилирует почти исключительно гидроксильные группы серина белков. Несколько этих ферментов играют важную роль в синтезе различных коферментов.

Недавно было изучено очень большое число реакций переноса с участием нуклеозидполифосфатов. Литература о соответствующих ферментах в какой-то степени противоречива, но, видимо, можно считать определенно установленным существование двух главных ферментов или групп ферментов, а именно 2.7.4.4 и 2.7.4.6. Главное отличие между этими двумя ферментами иллюстрируется следующими реакциями:

$$(2.7.4.4)\quad \text{ХМФ} + \text{УТФ} = \text{ХДФ} + \text{УДФ}, \qquad (V.2)$$

$$(2.7.4.6)\quad \text{ХДФ} + \text{УТФ} = \text{ХТФ} + \text{УДФ}. \qquad (V.3)$$

Аденилаткиназа (2.7.4.3) катализирует реакцию того же типа, что и фермент 2.7.4.4, но действует только на производные аденозина.

Образование ацилфосфатов катализирует ферменты подгруппы 2.7.2, тогда как ферменты подгруппы 2.7.3 катализируют образование амидофосфатов. Фермент 2.7.4.1 обратимо катализирует обмен пирофосфатных связей между АТФ и неорганическим полифосфатом.

В подгруппе 2.7.6 имеются два 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 [1370].

Подгруппа 2.7.7 содержит ряд важных, сравнительно недавно открытых ферментов, которые осуществляют перенос группировок, связанных с пирофосфатом, на другие молекулы, освобождая неорганический пирофосфат

$$X-Ф-Ф-Ф+Ф-Y \rightleftharpoons X-Ф-Ф-Y+Ф-Ф. \qquad (V.4)$$

Реакция состоит в переносе замещенной фосфатной группы X — Ф от пирофосфата на другую замещенную фосфатную группу; при этом образуется новая пирофосфатная связь в продукте X — Ф — Ф — Y. Таким образом, эти ферменты играют важную роль в синтезе динуклеотидов и других аналогичных молекул. Опыты с ферментом 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 [1437]. Реакция, катализируемая ферментом 2.7.7.4, хотя и близка по своему типу, но не вполне точно соответствует уравнению (V.4); в этом случае вместо фосфата акцептором служит сульфат и в результате реакции образуется смешанный кислотный ангидрид.

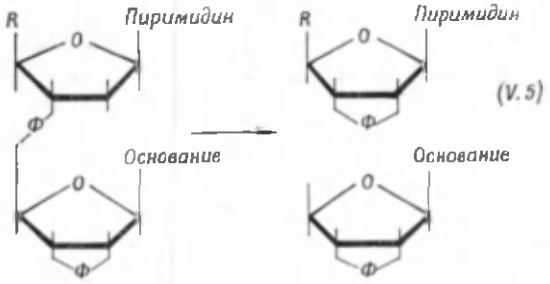
Ферменты данной группы катализируют особый тип реакции трансфосфорилирования. Между тем название «пирофосфорилаза» применяется также для обозначения другой группы ферментов, участвующих в образовании пирофосфата, а именно ферментов, которые катализируют не реакцию трансфосфорилирования, а реакцию трансгликозилирования. 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 (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 показано в Списке ферментов.

Данная реакция может начаться только в том случае, если в среде присутствуют хотя бы следы глюкозодифосфата. На каждую вновь появившуюся молекулу глюкозодифосфата одна молекула его исчезает, так что количество глюкозодифосфата все время остается постоянным; глюкозодифосфат 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 фосфоглицератфосфомутаза (5.4.2.1) из семян злаков не нуждается в кофакторе, и поэтому она помещена в раздел изомераз.

Все ферменты подгрупп 2.7.7—8 могут рассматриваться как переносчики замещенных фосфатных групп. Можно предположить, что рибонуклеазы 2.7.7.16 и h действуют аналогично дезоксирибонуклеазе (3.1.4.5), но в действительности расщепление рибонуклеата происходит с переносом

фосфата, что можно изобразить следующим образом:



Как следует из этой схемы, реакция заключается в основном в переносе связующей фосфатной группы из положения 5′ в концевом нуклеотиде в положение 2′ в пиримидиннуклеотиде с образованием циклического фосфата, который затем медленно гидролизуется [1720].

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 [907, 2473].

Сульфотрансферазы подгруппы 2.8.2 катализируют образование ряда органических сульфатов; во всех случаях 3′-фосфоаденилилсульфат участвует в реакции в качестве промежуточного «активного» сульфата [2227, 2228, 2272].

КоА-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) включено 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*» (*3.1.2.6*) *действует* на лактилглутатион, образуемый глиоксалазой I (4.4.1.5), и обе они вместе составляют глиоксалазную систему, с помощью которой метилглиоксаль превращается в лактат.

Фосфатазы

Фосфомоноэстеразы и фосфодиэстеразы (3.1.3—4) *также 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. В эту же категорию включены и дезоксирибонуклеазы, поскольку они катализируют реакции по типу фосфодиэстераз; рибонуклеаза (2.7.7.16) помещена в другую группу, так как под действием этого фермента происходит перенос фосфатного остатка с образованием циклических фосфатов.

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 один фермент, гидролизующий 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.

Известны следующие ферменты, действующие на разнообразные гликозидные связи. Ферменты 3.2.1.1—3, 3.2.1.12 и 13 действуют на α-1,4-глюкозидные связи, 3.2.1.9—11 — на α-1,6-глюкозидные связи, 3.2.1.4 — на β-1,4-глюкозидные связи, 3.2.1.27 — на α-1,3-глюкозидные связи, 3.2.1.7 — на β-1,2-фруктозидные связи, 3.2.1.8— на β-1,4-связи в ксилозе, 3.2.1.а — на β-1,3-связи в ксилозе, 3.2.1.14 и 29— на α-1,4-связи в 2-ацетиламино-2-дезоксиглюкозе, 3.2.1.15— на α-1,4-связи галактуронидов, 3.2.1.16 — на β-1,4-связи маннуронидов, 3.2.1.19— на α-1,4-связи между 2-амино-2-дезоксиглюкозой и глюкуропатом, 3.2.1.28— на α-α-диглюкозидные связи; другие ферменты действуют на разнообразные другие группы, природа которых ясна из Списка ферментов. Известно, что под номерами 3.2.1.14 и 29 значатся разные ферменты. Действие фермента 3.2.1.17 (прежде известного как «лизоцим») изучалось по его лизирующему действию на бактериальные клетки, особенно на *Micrococcus lysodeikticus*.

Расщепление нуклеотидов и нуклеозидов в животных тканях осуществляется главным образом с помощью фосфоролитического механизма. Известны, однако, 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 воздействовать 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, располагающиеся 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 переваривании 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.

Помимо концевых групп субстрата, на активность пептидаз влияет также природа боковых цепей, расположенных по соседству от связи, подлежащей расщеплению. Поскольку протеиназы обладают достаточно четко выраженной специфичностью, процент пептидных связей в белке, которые могут расщепляться данной протеиназой, не очень велик. Этот вопрос обсуждается более подробно в гл. VI. Несмотря на то что к настоящему времени очищен и даже получен в кристаллическом виде целый ряд протеиназ, специфичность действия изучена только для немногих из них. Известно, что некоторые протеиназы способны не только расщеплять пептиды, но и катализировать реакции их переноса на другие молекулы.

В подгруппы 3.5.1 и 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 раскрывание 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 раскрыванию 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.

Хотя субстраты ферментов подгруппы 3.5.99 содержат амидиновую структуру, при гидролизе эта структура остается неизменной.

Пирофосфатазы и другие сходные по действию ферменты

Эта подгруппа ферментов (3.6), гидролизующих (за одним исключением — 3.6.1.7) кислотные ангидриды, катализирует расщепление пирофосфатных связей. Обычно при классификации ферментов пирофосфатазы помещают в одну группу с фосфатазами, но в действительности они не являются эстеразами и образуют совершенно особый класс. В состав этой группы входит ряд важных ферментов, действующих на нуклеотиды. Особенно важен миозин (3.6.1.3) вследствие той роли, которую он играет при мышечном сокращении.

Нуклеотидпирофосфатаза (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

Декарбоксилазы

Реакция декарбоксилирования может рассматриваться либо как гидролитический процесс, приводящий к образованию H_2CO_3, либо как лиазная реакция, в результате которой образуется CO_2. Вследствие быстрого

взаимопревращения этих двух веществ трудно установить, которое из них образуется первым. Реакция, катализируемая пируватдекарбоксилазой (4.1.1.1), интенсивно исследовалась, но с противоречивыми результатами [495, 496, 1465], и только более поздние исследования [2050] показали, что первым образуется CO_2. Отсюда, однако, не следует, что это справедливо для всех декарбоксилаз, ибо пируватдекарбоксилаза занимает особое положение, так как из всех декарбоксилаз только она одна (подобно ферментам 4.1.1.7 и 8) требует присутствия тиаминпирофосфата. Многие декарбоксилазы действуют на азотсодержащие вещества и им необходим пиридоксальфосфат. Для некоторых из них изотопными методами было показано [2254], что первым образуется CO_2. Остальные декарбоксилазы, по-видимому, не требуют присутствия кофермента. Механизм их действия в настоящее время неизвестен, но для удобства все декарбоксилазы объединены в группу карбокси-лиаз.

Пируватдекарбоксилаза — фермент, играющий важную роль у дрожжей,— катализирует образование спирта. Она непосредственно связана с пируватдегидрогеназой (1.2.4.1), и оба эти фермента обсуждаются в гл. IX в разделе, посвященном тиаминпирофосфату.

Декарбоксилазы аминокислот (4.1.1.11—28) 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.

Последние четыре фермента подгруппы декарбоксилаз обладают способностью катализировать вторичные реакции, связанные с декарбоксилированием. Три из них представляют собой реакции фосфорилирования, а четвертая — реакцию дегидратации, сопряженную с расщеплением АТФ; эта реакция может рассматриваться как обращение лиазной реакции.

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 C — C-связи.

Альдолазы играют важную роль в обмене углеводов. Классические альдолазы (4.1.2.7 и b) катализируют распад гексоз на трехуглеродные фрагменты, которые и 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 некоторые из них вызывают и вторичные реакции — обычно ацетилирование 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 (4.2.1.20—23) также действуют на оксиаминокислоты, но в этом случае лиазная реакция связана с присоединением к оксиаминокислотам не воды, а других молекул. Лиазная реакция, катализируемая ферментом 4.2.1.24, протекает с присоединением второй молекулы субстрата и последующей циклизацией образовавшегося продукта.

Другие лиазы

Фермент 4.2.99.1 встречается у бактерий; он может быть противопоставлен гиалуронидазам (3.2.1d — e), которые гиалуронат расщепляют гидролитическим путем.

Аммиак-лиазы (4.3.1) осуществляют другой тип дезаминирования аминокислот, ведущий 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 аминогруппа оказывается связанной. Ферменты подгруппы 4.4 катализируют реакции отщепления H_2S *или его производных*.

5. ИЗОМЕРАЗЫ

Рацемазы и эпимеразы

Рацемизация часто осуществляется парами ферментов, соответственно специфичных относительно двух изомеров и образующих вместе симметрический 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 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 симметрического 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 CHOH-группы с одновременным восстановлением соседней C=O-группы. Таутомераза 5.3.2.1 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 под-

группы 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. IX.

6. ЛИГАЗЫ

Лигазы катализируют присоединение друг к другу двух молекул. Процесс этот сопряжен с разрывом пирофосфатной связи в молекуле АТФ; энергия, освобождаемая при расщеплении АТФ, используется для синтеза. Значение (и даже само существование) этого класса ферментов установлено совсем недавно. Раньше предполагали, что синтез подобного рода осуществляется путем совместного действия фосфокиназ и трансфераз, так что процесс можно было бы изобразить как

$$\text{В} + \text{АТФ} = \text{В} - \Phi + \text{АДФ},$$
$$\text{А} + \text{В} - \Phi = \text{А} - \text{В} + \Phi.$$

Было показано, например, что крахмал может быть синтезирован в результате именно такого процесса. В настоящее время, однако, известно, что большинство синтетазных реакций осуществляется одним ферментом (механизмы этих реакций обсуждаются в гл. VII).

Ферменты, отнесенные в подгруппу 6.1.1, часто неудачно называют «ферментами, активирующими аминокислоты», хотя это находится в противоречии с правилами 5 и 30, разработанными Комиссией по ферментам (см. стр. 155 и 161). Эти ферменты катализируют первую стадию биосинтеза белков, в которой каждый остаток аминокислоты присоединяется к рибозе концевого аденилатного остатка растворимой РНК, специфичной для данной аминокислоты (см. гл. XI).

Ферменты подгруппы 6.2.1 связаны с образованием производных ацил-КоА, и так как последние представляют собой соединения, богатые энергией, то реакции, катализируемые этими ферментами, легко обратимы.

Реакции, катализируемые остальными синтетазами, можно найти в Списке ферментов. Для всех ферментов, помещенных в раздел 6.4, кофактором служит биотин.

ГЛАВА VI

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Одно из наиболее характерных свойств ферментов — это их высокая специфичность, в силу которой действие каждого фермента строго ограничено одним веществом или очень небольшим числом близкородственных веществ. Специфичность действия ферментов — важнейшее биологическое явление, без которого невозможен упорядоченный обмен в живой природе, а следовательно, и сама жизнь. Гопкинс в одном из своих выступлений [1155], 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 избирать те или иные вещества из различных веществ, присутствующих в окружающей среде. Наконец, специфичный катализатор благодаря своей внутренней структуре определяет среди множества возможных путей тот единственный путь, по которому должно пойти превращение вещества. 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, сохранявшее в ходе эволюции те динамические проявления, которые характеризуют живые существа».

Достаточно взглянуть на таблицы, приведенные в гл. XII, чтобы убедиться в том, какую важную роль играет специфичность ферментов в выборе наиболее выгодных направлений процессов обмена, иными словами — в организации этих процессов из различных типов химических реакций. 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. Вопрос об «организации на основе специфичности» обсуждается в гл. XII.

Степень наблюдаемой специфичности у разных ферментов варьирует. Во многих случаях фермент действует, насколько нам известно, только на одно вещество и может катализировать 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 могут атаковать большое число родственных веществ.

В настоящее время относительно трудно дать удовлетворительное объяснение специфичности действия ферментов. Причины этого заключаются в следующем:

1. Подавляющее 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, и, следовательно, обсуждение почти всегда относится к менее специфичным ферментам, 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. Сказанное в особенности касается ферментов, участвующих в превращениях углеводов.

3. В других исследованиях дело обстояло 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 НАД·H_2 в дегидрогеназных реакциях) незначительные количества неучитываемых 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 эта реакция 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 размере 0,01% могло обусловить достаточную активность, которая и обнаруживалась в опыте.

5. В подавляющем большинстве исследований определяли только скорость реакций 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 вопроса 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 может действовать исследуемый фермент. Если субстратом для действия фермента служит оптически активное вещество, то надо стараться исследовать действие фермента на оба изомера раздельно, так как вполне возможно, что фермент будет атаковать только один изомер (см. стр. 179) и что присутствие другого будет тормозить реакцию. Известно, например, что D-аспарагин конкурентно подавляет дезаминирование L-аспарагина, происходящее под действием аспарагиназы [938].

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 Лайнуивера — Бэрка и путем экстраполяции определить величины V и K_m (см. примеры в табл. 10). 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 определять величину 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 и 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 представление о характере образования фермент-субстратного комплек-

са, 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 [979] и у Диксона [615]. 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 двух субстратов должны совпадать.

4. *Доказательство, полученное «методом смешанных субстратов».* При одновременном добавлении двух субстратов для двух реакций общая скорость реакции должна быть меньше суммы скоростей реакций, 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 окончательным 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 стр. 80.

Помимо этих четырех критериев, был предложен и ряд других, использовавшихся в отдельных работах. Однако все они менее надежны. Так, например, кривые pH — 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. В табл. 29 приведены данные, показывающие, как может заметно изменяться специфичность отдельных ферментов в зависимости от природы активирующего иона металла.

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 синтетазы. 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 синтетазами) и лишь в немногих случаях — к одному из них. Однако алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) обнаруживает, например, высокую специфичность по отношению только к одному из субстратов, а именно к НАД, и незначительную специфичность по отношению к другому субстрату — спирту. На противоположном конце шкалы находится 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 (1.2.3.2), весьма специфически настроенная на окисление пуринов, окисляет также альдегиды [615], а альдегидоксидаза печени (1.2.3.1) окисляет также производные пиридина и хинолина. В приведенных случаях фермент катализирует реакции одного и того же типа с двумя различными группами субстратов. В то же время известно и несколько случаев, когда фермент действует на один и тот же субстрат двумя различными путями. В качестве примера можно привести дегидрогеназы, декарбоксилирующие малат и изоцитрат (1.1.1.38, 40 и 42), которые либо восстанавливают, либо декарбоксилируют соответствующие кетокислоты. Необходимо также заметить, что в ряде случаев одна и та же окислительная реакция может катализироваться различными ферментами при использовании различных акцепторов (см. гл. V).

СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

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 CHOH-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 [2806]).

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). 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. 7, в которой сравнивается действие химотрипсина (3.4.4.5) на несколько пар стереоизомеров. Из этой таблицы видно, что для первых четырех пар соединений сродство фермента к форме, которая не реагирует, выше, чем к субстрату (если K_m не слишком сильно отличается от K_s, что, вероятно, справедливо для данного фермента; см. стр. 103). Даже в том случае, когда ни один из изомеров не атакуется ферментом, сродство к D-форме все же оказывается выше, нежели к L-форме. Следовательно, если соединение содержит необходимые для связывания с ферментом группы, то взаимодействовать с ферментом могут обе конфигурации; однако только при одной конфигурации создается такая взаимная ориентация групп фермента и субстрата, какая необходима для активации и реакции.

Таблица 7

СРОДСТВО НЕКОТОРЫХ ПАР СТЕРЕОИЗОМЕРОВ К ХИМОТРИПСИНУ [2806]

Соединение	K_m, мМ	K_i, мМ
Ацетил-L-триптофанамид	5,3	
Ацетил-D-триптофанамид		2,7
Ацетил-L-тирозинамид	30,5	
Ацетил-D-тирозинамид		12,0
Никотинил-L-триптофанамид	2,7	
Никотинил-D-триптофанамид		1,4
Никотинил-L-тирозинамид	15,0	
Никотинил-D-тирозинамид		6,2
Ацетил-L-триптофан		17,5
Ацетил-D-триптофан		4,8
L-триптофанамид		6,3
D-триптофанамид		3,2

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 лактатдегидрогеназой (1.1.1.27) образуется только L-лактат, но та же реакция, катализируемая другой дегидрогеназой (1.1.1.28), дает только D-лактат; при восстановлении аммонийной соли 2-оксоглутарата L-глутаматдегидрогеназами (1.4.1.2—4) образуется только L-глутамат; фосфорилирование глицерина под действием глицеролкиназы (2.7.1.30) дает только L-глицеро-3-фосфат; при конденсации глицина с ацетальдегидом под действием треониновой альдолазы (4.1.2.5) образуется только L-треонин, но та же реак-

ция, катализируемая другой альдолазой (4.1.2.6), дает только L-аллотреонин. При образовании треонина возникает одновременно два асимметрических атома углерода. В соединениях, имеющих несколько асимметрических центров, каждый центр может оказывать свое влияние на специфичность фермента [2887].

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. Фумаратгидратаза, например, действует только на фумарат и совершенно не действует на малеат; кроме того, она катализирует образование из малата только фумарата. Таким образом, этот фермент проявляет два типа стереоспецифичности: по отношению к фумарату в одном направлении реакции и по отношению к малату — в другом. Многочисленные примеры обоих типов стереоспецифичности 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 образует молекулу, в которой возможно свободное вращение вокруг соответствующей связи (например, в результате присоединения молекулы глутатиона к двойной связи), то такой фермент действует как *цис-транс*-изомераза (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.

Помимо упомянутых выше типов стереоспецифичности, известна также способность ферментов различать в симметрических молекулах группы, которые являются химически идентичными. Так, например, в реакции

$$Cx_2yz \longrightarrow Cx'xyz \qquad \text{(VI.1)}$$

(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 2.7.1.30 образуется только L-*глицеро*-3-*фосфат* [350]. Это асимметрическое фосфорилирование симметрической молекулы глицерина было подтверждено изотопным методом [351]. Показано, что при фосфорилировании 1-C^{14}-глицерина, полученного в процессе дрожжевого брожения из меченного по карбоксилу ацетата или 3,4-C^{14}-глюкозы [2587], имеет место следующая реакция:

$$\begin{array}{l} C^*H_2OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ CH_2OH \end{array} + АТФ = \begin{array}{l} C^*H_2OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ CH_2OH_2PO_3 \end{array} + АДФ. \qquad \text{(VI.2)}$$

Сходная специфичность была обнаружена у ферментов трикарбонового цикла, участвующих в образовании и распаде лимонной кислоты. При химическом расщеплении лимонной кислоты, образованной ферментативным путем из $C^*OOHCH_2COCOOH$, установлено, что C^{14} присутствует только

в одной концевой карбоксильной группе. Так как молекула лимонной кислоты — симметрическая молекула, то химически невозможно установить различие между двумя CH_2COOH-группами. Однако при ферментативном окислении этой лимонной кислоты с помощью препарата из митохондрий образуется 2-оксоглутарат, меченный только по α-карбоксилу [1617]. 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:

$$\begin{array}{llll} C^*OOH & C^*OOH & C^*OOH & C^*OOH \\ | & | & | & | \\ CH_2 & CH_2 & CHOH & CO \\ | & | & | & | \\ COCOOH \longrightarrow & C(OH)COOH \longrightarrow & CHCOOH \longrightarrow & CH_2 \quad +CO_2 \\ | & | & | & | \\ CH_3 & CH_2 & CH_2 & CH_2 \\ | & | & | & | \\ COOH & COOH & COOH & COOH \end{array} \qquad \text{(VI.3)}$$

Полная схема реакций приведена в табл. 42.

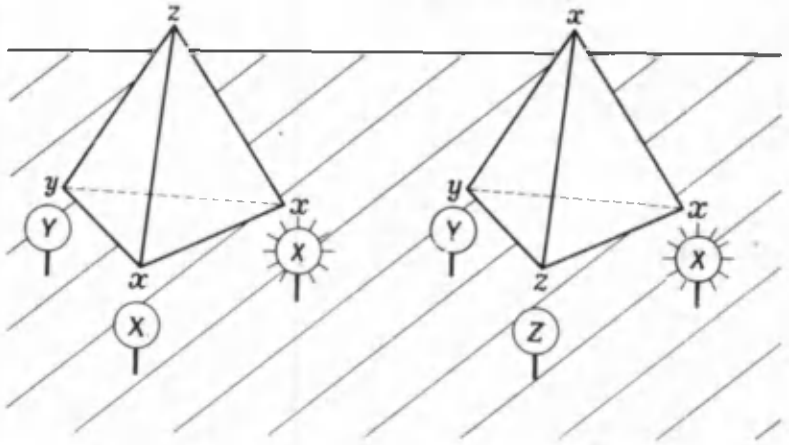
Первые стадии катализируются цитрат-синтазой (4.1.3.7) и аконитатгидратазой (4.2.1.3). Можно было бы ожидать, что в первой реакции двууглеродный остаток будет присоединяться как впереди CO-группы, так и позади нее. Однако тот факт, что в лимонной кислоте метка обнаружена только в верхней карбоксильной группе, говорит о том, что фермент катализирует присоединение двууглеродного остатка только к одной стороне 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 $-CH_2COOH$-группы, казалось бы, эквивалентны, однако аконитатгидратаза действует только на верхнюю из этих групп.

Данный тип специфичности можно легко объяснить на основе теории Огстона [2016—2017]. Если в активном центре фермента имеются группы, которые соединяются с какими-либо тремя группами субстрата Cx_2yz, то ясно, что субстрат может связываться с ферментом только в одной определенной ориентации, несмотря на то что 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. Фиг. 63, на которой изображены две возможные структуры фермент-субстратного комплекса, помогает уяснить сказанное.

Если две x-группы в молекуле со структурой Cx_2yz различны не химически, а по изотопному составу, то мы имеем дело со случаем «изотопной асимметрии». Два подобных примера мы уже видели выше (реакции VI.2 и VI.3). Использование изотопов служит общим методом для исследования этого типа стереоспецифичности ферментов. Различные типы изотопной асимметрии детально рассмотрел Гиршман [1111].

К числу хорошо изученных реакций принадлежит восстановление НАД дегидрогеназами. Используя в качестве метки дейтерий, можно показать, что данный фермент присоединяет переносимый от субстрата водород только к одной стороне никотинамидного кольца. (Этот вопрос обсуждается более подробно в гл. VII.) Известно, что некоторые дегидрогеназы катализируют присоединение водорода к одной стороне кольца, а другие — к другой стороне (табл. 18). Дегидрогеназы катализируют двусубстратные 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 удается обнаружить асимметрическое действие фермента, как это было впервые показано в опытах с дрожжевой алкогольдегидрогеназой Левусом, Вестхеймером и Веннесландом [1608]. При восстановлении CH_3CDO с помощью НАД·H_2 образуется только один изомер CH_3CHDOH; другой изомер образуется при восстановлении CH_3CHO с помощью НАД·HD. Эти формы обладают некоторой



Фиг. 63. Стереоспецифичность фермента по отношению к субстрату Cx_2yz.
На схеме представлены две возможные структуры фермент-субстратного комплекса. Молекула субстрата изображена в виде четырехгранника с группами x, y и z в вершинах. 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.

оптической активностью и различаются по знаку вызываемого ими вращения ($\alpha_D = 0{,}18°$).

Если в ферментативной реакции участвуют два оптически активных субстрата, то теоретически возможны четыре комбинации стереоизомеров. Однако любой данный фермент катализирует обычно реакцию только между одной парой форм; 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 стороной никотинамидного кольца НАД).

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 обширные 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 (1.1.1.1 и 2), альдегиддегидрогеназы (1.2.1.3—6) и ацил-КоА-дегидрогеназы (1.3.2.1 и 2), 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 проявляют высокую степень специфичности 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 работу Кейлина и Хартри [1343, 1344], проведенную с чистой глюкозооксидазой из *Penicillium* (1.1.3.4). Как видно из табл. 8, глюкозооксидаза высокоспецифична по отношению к β-D-глюкозе. Любое изменение в молекуле этого субстрата резко уменьшает скорость окисления. Так, из восьми D-альдогексоз фермент окисляет только три (D-маннозу, D-альтрозу и D-галактозу) и то с очень низкой скоростью. Даже другой аномер D-глюкозы (т. е. α-D-глюкоза) окисляется в 150 раз медленнее. Замещение при втором углеродном атоме (за исключением замены гидроксильной группы водородом) или при третьем полностью снимает активность. В то же время фермент проявляет несколько меньшую специфичность по отношению

Таблица 8

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ [1])

Углевод	Относительная скорость окисления	Углевод	Относительная скорость окисления
β-D-глюкоза	100	α-D-глюкоза	0,64
2-дезокси-D-глюкоза	25	Трегалоза	0,28
2-дезокси-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-талозу, L-арабинозу, D-аллозу, D-гулозу, D-рибозу, L-сорбозу, L-рамнозу, D-тагатозу, глюкогептозу, сахарозу, лактозу, мелицитозу, раффинозу, D-глюкуронат, D-галактуронат, 2-амино-2-дезокси-D-глюкозу, 2-амино-2-дезокси-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-триметил-β-D-метилглюкозид, 2,3,4,6-тетраацетил-D-глюкозу, пентаацетил-D-глюкозу, 3,4,6-триацетил-2-дезокси-D-глюкозу, α-D-глюкозо-1-фосфат, D-глюкозо-6-фосфат, D-фруктозо-6-фосфат, D-фруктозо-1,6-дифосфат [262, 1343, 1344, 2470].

к группам при четвертом или шестом углеродном атоме; в этих положениях возможны небольшие изменения, не влекущие за собой полной утраты активности. Так, например, введение фтора вместо гидроксильной группы при шестом углеродном атоме уменьшает скорость окисления до 3%, метилирование уменьшает ее до 2%, а фосфорилирование — до нуля. Удаление — CH_2OH-группы (т. е. образование пентозы) уменьшает скорость окисления в 100 раз.

Высокая специфичность глюкозооксидазы делает ее очень ценным реагентом в опытах по обнаружению и количественному определению глюкозы в биологическом материале.

МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Метилтрансферазы, подобно дегидрогеназам, по-видимому, обладают высокой специфичностью в отношении обоих субстратов. Диметилтетин: L-гомоцистеин — метилтрансфераза (2.1.1.3) была изучена весьма детально Дурелл ем и др. [660], а также Мо [1763], 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 гомоцистин, аминобутират, треонин и диметилглицин.

Лучшим донором является диметилтетин $(CH_3)_2\overset{+}{S}CH_2COOH$, 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 [1394], связана с действием другого специфичного фермента (2.1.1.5).

ТРАНСКЕТОЛАЗА И ТРАНСАЛЬДОЛАЗА

Транскетолаза (2.2.1.1) отличается весьма широкой специфичностью. Она катализирует реакции типа

$$R-CHOH-CO-CH_2OH + R'-CHO = R-CHO + R'-CHOH-CO-CH_2OH, \qquad (VI.4)$$

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 представление, что в качестве донора может выступать D-рибулозо-5-фосфат; однако позднее было показано, что в этом препарате присутствовала эпимераза (5.1.3.1) и что истинным субстратом транскетолазной реакции является D-ксилулозо-5-фосфат [1161, 2489]. Известно, что донором могут служить следующие соединения: седогептулозо-7-фосфат, D-фруктозо-6-фосфат, D-ксилулозо-5-фосфат, L-эритрулоза и оксипируват [587]. Так как приведенное выше уравнение транскетолазной реакции является симметричным, то достаточно ограничиться рассмотрением специфичности только в отношении донора. В случае оксипирувата группа R донора с соседним водородным атомом «заменена» атомом кислорода, так что имеет место следующая реакция:

$$HOOC-CO-CH_2OH + R'-CHO = CO_2 + R'-CHOH-CO-CH_2OH. \qquad (VI.5)$$

Таким образом, в присутствии подходящего альдегида-акцептора фермент действует в отношении оксипирувата как декарбоксилаза.

Трансальдолаза (2.2.1.2) катализирует реакцию типа

$$R-CHOH-CHOH-CO-CH_2OH+R'-CHO=$$
$$=R-CHO+R'-CHOH-CHOH-CO-CH_2OH. \qquad (VI.6)$$

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 эритрулоза.

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

$$A-G+Ф=A+G-Ф, \qquad (VI.7)$$

где G — гликозильная группа, Ф — 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 (2.4.1.1) катализирует перенос только α-D-глюкозила. В реакции, катализируемой мальтозофосфорилазой (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, она не является абсолютной. 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) [134, 775, 2816]. Глюкозильная группа под действием фермента переносится только к четвертому углеродному атому нередуцирующего концевого глюкозного остатка. Фермент хорошо действует лишь в том случае, если цепь содержит 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 [2816]. Фермент из картофеля расщепляет гликоген медленнее и менее полно, чем фермент из тканей животных [1582]. 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 [775]. 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 [2108].

Мышечная α-глюканфосфорилаза 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 может действовать 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 [503, 1089]. 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.

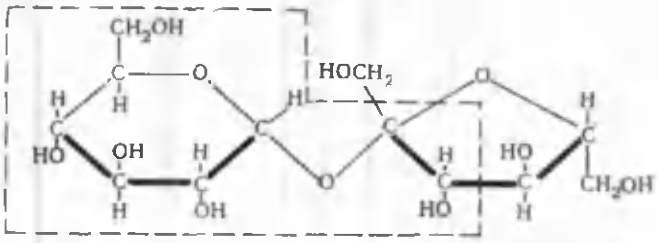
Для действия ферментов имеет значение также размер молекулы субстрата; так, например, фермент из печени действует на небольшие молекулы гликогена лучше, чем фермент из мышц [2527].

Сахарозо-глюкозилтрансфераза (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 сахарозо-глюкозилтрансферазы была детально изучена Хассидом и Дудоровым [1022]. 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 сахарозо-глюкозилтрансферазы α-D-глюкозильная группа переносится на фосфат, арсенат, D-фруктозу, L-сорбозу, D-ксилулозу, L-арабинулозу или L-арабинозу, но не может переноситься на L-фруктозу, D-тагатозу, D-фруктозо-6-фосфат, D-фруктозо-1,6-дифосфат, D-манногептулозу, D-глюкозу, D-маннозу, D-галактозу, L-рамнозу, L-фукозу, D-ксилозу, D-ликсозу, D-арабинозу, L-ксилулозу, D-арабинулозу, эритрулозу, диоксиацетон или фуранозу. Из пяти сахаров, способных служить акцепторами глюкозильных групп, четыре кетозы образуют нередуцирующие дисахариды (β-D-фруктофуранозид, α-L-сорбофуранозид, β-D-ксилулофуранозид и α-L-арабинулофуранозид), а одна альдоза — L-арабиноза,— акцептируя глюкозильный остаток, образует редуцирующий дисахарид [3-(α-D-глюкопиранозил)-L-арабинопиранозу]. Этот результат будет менее неожиданным, если обратиться к фиг. 64, которая показывает, что все пять дисахаридов имеют общую структуру (выделенную на схеме пунктирной линией).

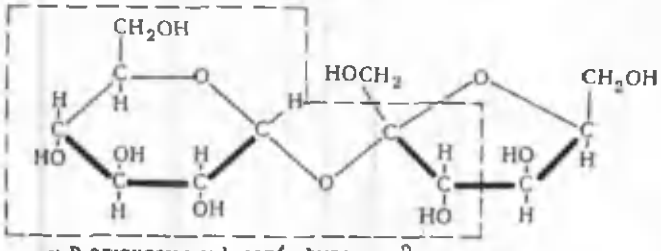
ФОСФОТРАНСФЕРАЗЫ

Киназы

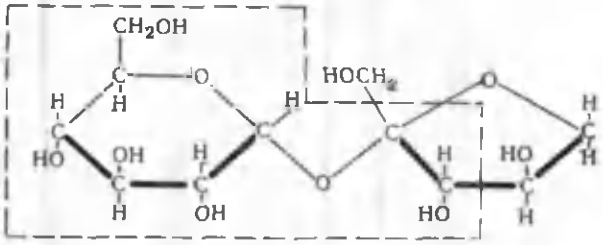
Как и в случае дегидрогеназ, мы вновь встречаем здесь группу ферментов, для которых специфичность в отношении донора и акцептора следует рассматривать раздельно (только в данном случае речь идет о донорах и акцепторах фосфата, а не водорода). В общем фосфокиназы даже более специфичны, чем дегидрогеназы, как в отношении донора, так и в отношении акцептора. Кьюби и др. [1480] показали, что в реакции переноса фосфата с АТФ на креатин, протекающей с участием креатинкиназы (2.7.3.2), креатин не может быть заменен креатинином, L-аргинином, D-аргинином или L-гистидином, а АТФ не может быть заменен АДФ, аденозин-2′-фосфатом, аденозин-3′-фосфатом, аденозин-5′-фосфатом или ИТФ; в обратной реакции АДФ не может быть заменен АТФ. Такая высокая специфичность весьма типична для фосфокиназ. Из этого правила, однако, имеется одно или два исключения; известно, например, что в реакциях, катализируемых фосфофруктокиназой (2.7.1.11) и пируваткиназой (2.7.1.40), АТФ можно заменить другими нуклеозидтрифосфатами.



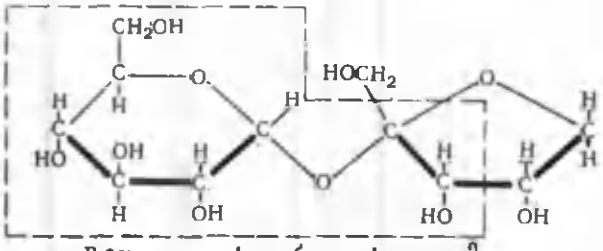
Сахароза



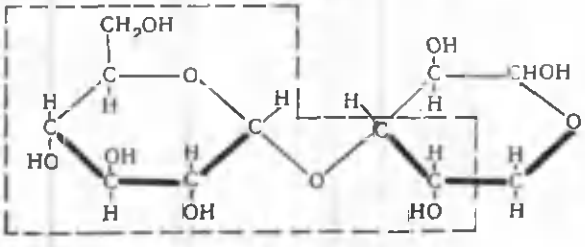
α-D-глюкозил-α-L-сорбофуранозид



α-D-глюкозил-β-D-ксилулофуранозид



α-D-глюкозил-α-L-арабинулофуранозид



3-(α-D-глюкозил)-L-арабиноза

Фиг. 64. Продукты реакции, катализируемой сахарозо-гликозилтрансферазой.

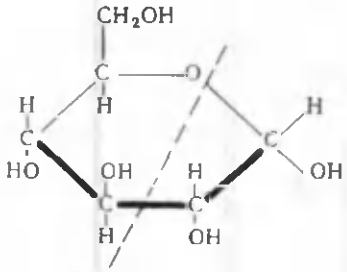
Специфичность трех гексокиназ была исследована довольно тщательно. Результаты этих исследований представлены в табл. 9. Для каждого фермента приведена величина максимальной скорости реакции по отношению к скорости реакции с D-глюкозой, а также величина сродства к каждому субстрату по отношению к соответствующей величине для D-глюкозы (при определении 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: $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ *M* (фермент из дрожжей), $8 \cdot 10^{-6}$ *M* (фермент из ткани мозга) и $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ *M* (фермент из *Aspergillus*).

Таблица 9

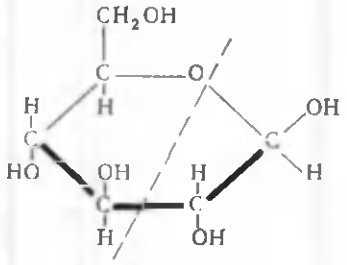
СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Субстрат *	Дрожжи [218; 1493; 2471]		Мозг [2469]		*Aspergillus* [548]	
	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-дезокси-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-дезокси-D-галактоза	—	—	—	—	0,37	0,41
2-дезокси-D-глюкоза	0,33	1,0	0,3	1,0	—	—
L-сорбоза	0	0	0	0	—	0,02
1,5-сорбитан	0,03	0,01	0,0003	1,0	—	—
1,5-маннитан	—	—	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-глюкозан	5,0	0,2	0,8	0,08	—	—
3-дезокси-D-глюкоза	—	—	0,0005	0,2	—	—
D-альтроза	—	—	0,003	0,11	—	—
2,5-сорбитан	—	—	0,00006	0,08	—	—
D-ксилоза	0,01	0	0,004	0	—	—
D-ликсоза	—	—	0,006	0	—	—
6-дезокси-D-глюкоза	—	—	0,004	0	—	—
D-манногептулоза	0,67	0	0,16	0,01	—	—
D-глюкогептулоза	—	—	0,04	0,01	—	—
2-ацетиламино-2-дезокси-D-глюкоза	0,1	0	0,1	0	—	—
2-метиламино-2-дезокси-D-глюкоза	—	—	0,04	0	—	—

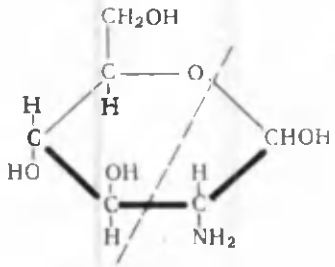
* Фермент из дрожжей не способен фосфорилировать α-метилглюкозид, 1-метилфруктозу, 3-метилглюкозу, 3-метилфруктозу, сорбит, L-рамнозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу и раффинозу; фермент из ткани мозга не фосфорилирует α- и β-метилглюкозиды, 2-метилглюкозу, 3-метилглюкозу, сорбит, α-глюкозо-1-фосфат, глюконо-δ-лактон и D-рибозу.



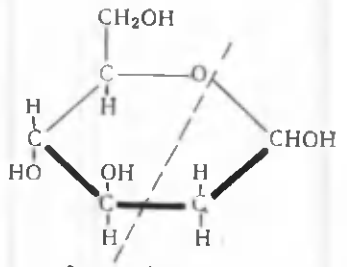
α-D-глюкопираноза



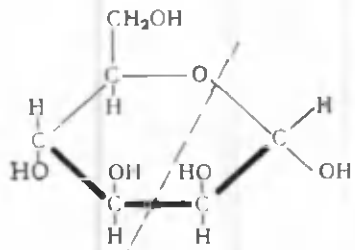
β-D-глюкопираноза



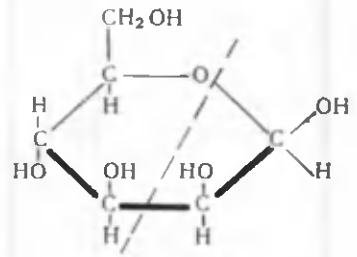
D-2-глюкозамин



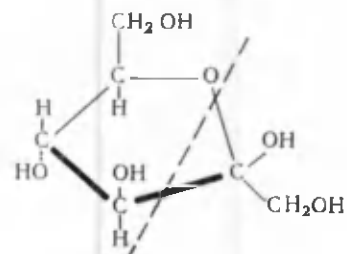
2-дезокси-D-глюкоза



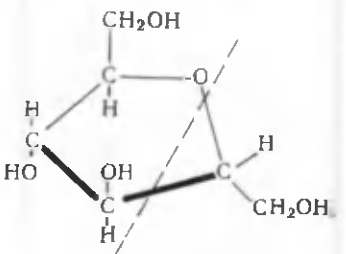
α-D-маннопираноза



β-D-маннопираноза



β-D-фруктофураноза



2,6-ангидро-D-маннитол

Фиг. 65. Субстраты гексокиназы.

Из приведенных в табл. 9 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 [876—878].

Наряду с соединениями, приведенными в табл. 9, фермент из дрожжей может фосфорилировать также 2,5-ангидро-D-маннит [366]. Эти данные говорят о том, что фермент специфичен в отношении 3,4,5,6-области молекулы, но не в отношении 1,2-области, если только к этой последней не присоединены крупные группировки (см. фиг. 65, заимствованную из работы Готшалька [879]).

Специфичность двух других гексокиназ в общем сходна со специфичностью фермента из дрожжей, однако имеются и определенные различия. Так, действие фермента из ткани мозга значительно меньше зависит от замещения у С-5, о чем свидетельствует высокая скорость фосфорилирования 1,5-сорбитана и 1,5-маннитана, медленно атакуемых ферментом из дрожжей. В то же время действие фермента из *Aspergillus* мало зависит от конфигурации при С-4, и для этого фермента галактоза, практически не атакуемая другими гексокиназами, является почти таким же хорошим субстратом, как и глюкоза.

Фосфорилирование гексоз в печени и бактериях осуществляется, по-видимому, специфичными ферментами. Глюкоза фосфорилируется глюкокиназой (2.7.1.2), которая не действует на фруктозу; фруктоза в свою очередь фосфорилируется кетогексокиназой (2.7.1.3), которая отличается от двух упомянутых выше ферментов тем, что катализирует фосфорилирование не в положении 6, а в положении 1, что характерно также для рамнулокиназы, галактозидазы и арабинокиназы (2.7.1.5, 2.7.1.6 и 2.7.1d).

Многие из фосфокиназ весьма специфичны в отношении сахаров определенной структуры; например, рибулокиназа (2.7.1.16) *Aerobacter aerogenes* из большого числа исследованных соединений фосфорилирует только D- и L-рибулозу и (более медленно) адонит и L-арабит [2406].

Фосфомутазы

Фосфомутазы отличаются высокой специфичностью. В результате детального изучения специфичности фосфоглицеромутазы (2.7.5.3) Пизер и Боллоу [2091] установили, что донорами фосфата могут быть только 2,3-дифосфо-D-глицерат и 2,3-дифосфо-D-*эритро*-диоксибутират. Из двадцати исследованных соединений только те оказались пригодными для роли акцепторов, которые имеют две гидроксильные группы, расположенные у соседних углеродных атомов и способные принимать D-*эритро*-конфигурацию (причем одна из них должна быть фосфорилирована), а также смежную с ними концевую кислотную группу (карбоксильная или сульфогруппа).

ЭСТЕРАЗЫ

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. В основу классического разделения на эстеразы и липазы легло предположение о том, что первые атакуют преимущественно короткие, а вторые — длинные цепи; выше мы, однако, уже отмечали (см. стр. 85), что панкреатическая липаза отличается тем, что она действует только на поверхности раздела масло—вода.

Карбоксилэстеразы

По всей вероятности, имеется целый ряд карбоксилэстераз (3.1.1.1) с несколько различной, но вообще достаточно широкой специфичностью. Недавно была детально изучена специфичность очищенной карбоксилэстеразы из печени лошади [2807]. Фермент атакует как алифатические, так и ароматические нейтральные эфиры, так что старое название *али-эстераза* следует считать неправильным. Результаты исследования специфичности по отношению к ряду эфиров с неразветвленными цепями приведены в табл. 10.

Таблица 10

СПЕЦИФИЧНОСТЬ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ ЛОШАДИ*

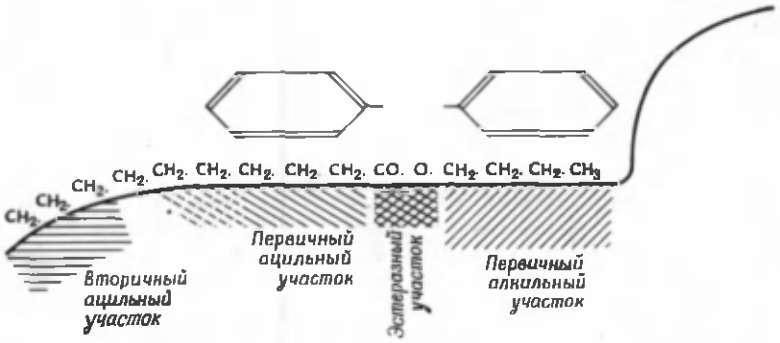
	$-OCH_3$	$-OC_2H_5$	$-OC_3H_7$	$-OC_4H_9$	$-OC_5H_{11}$	$-OC_6H_{13}$	$-OC_7H_{15}$	$-OC_8H_{17}$
HCO—	1,0							
	0,2							
CH_3CO—	0,26	0,07	0,12	0,28	0,18	0,45	0,3	0,13
	0,02	0,28	1,55	3,1	1,1	0,87	2,5	1,8
C_2H_5CO—	1,28	0,46		2,0	1,5			
	0,025	0,43		4,7	2,2			
C_3H_7CO—	2,0	1	2,0	4,5	3,5	2,5	1,1	
	0,46	1	0,93	2,9	6,7	11,7	5,3	
C_4H_9CO—	1,85	1,04		3,2				
	1,1	2,3		3,3				
$C_5H_{11}CO$—	2,35	0,6		1,7		0,32		
	1,18	2,2		4,2		2,5		
$C_6H_{13}CO$—	1,75	0,92						
	1,3	4,0						
$C_7H_{15}CO$—	1,25	0,8						
	2,85	3,4						
$C_8H_{17}CO$—	1,05							
	10,0							
$C_9H_{19}CO$—	0,36							
	22,0							

* В левом столбце приведены ацильные, а в верхней строке—алкильные группы исследованных эфиров с неразветвленной цепью. Для каждого эфира верхнее число показывает максимальную скорость реакции, а ниже—сродство (обе величины по отношению к соответствующей величине для этил-н-бутирата, принятой за единицу). В качестве меры сродства использовали величину $1/K_m$.

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—6-углеродными атомами, но дальнейшее увеличение длины цепи вызывает уменьшение реакционной способности, хотя сродство продолжает быстро возрастать. 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 развет-

вленности цепи резко возрастает сродство и несколько снижается реакционная способность. У лучших субстратов на обоих концах молекулы находятся неполярные группы.

На фиг. 66 приведена предполагаемая схема строения активного центра карбоксилэстеразы, учитывающая рассмотренные выше данные о специфичности этого фермента. *Эстеразный* участок связывает сложноэфирную группировку субстрата и, следовательно, определяет расположение его молекулы; однако связывающая сила у него меньше, чем у *ацильного* и *алкильного* участков, а так как последние взаимодействуют с неполярными цепями, то главную роль в связывании субстрата должны играть вандерваальсовы



Фиг. 66. Возможные конфигурации активного центра карбоксилэстеразы.

силы. Густота штриховки на схеме качественно характеризует величину *сил взаимодействия на* разных участках. Алкильный участок изображен сравнительно небольшим; он заполнен *н*-бутильной цепью или фенильным кольцом. На ацильной стороне показан вторичный ацильный участок, который сильно увеличивает связывание субстрата, но уменьшает реакционную способность вследствие нарушения ориентации в эстеразном участке.

Холинэстеразы

С 1943 г. известно [1794, 1795], что эти ферменты бывают двух типов. В Списке ферментов они значатся под названиями *ацетилхолинэстераза* (3.1.1.7) и *холинэстераза* (3.1.1.8) (вместо прежних довольно неудачных названий *истинная холинэстераза* и *псевдохолинэстераза*). Ацетилхолинэстераза — главный фермент, расщепляющий ацетилхолин, в нервной ткани и в эритроцитах большинства видов животных, тогда как холинэстераза у многих видов животных встречается преимущественно в плазме крови (см. обзоры Августинсона [97] и Орда и Томпсона [2031]).

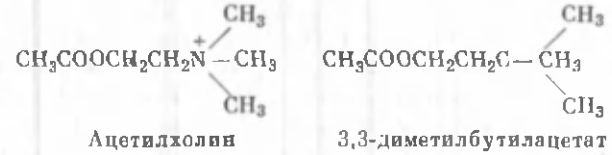
Холинэстеразы не были получены в высокоочищенном состоянии, если не считать фермента из сыворотки лошади, который был очищен в 6000 раз, но который, к сожалению, так и не был использован для детального изучения специфичности. Неочищенные препараты из различных источников различаются по своей специфичности. Неясно, однако, чем следует это объяснить — реальными различиями в самой природе ферментов или просто тем, что в разных препаратах содержится смесь из нескольких ферментов, присутствующих в различных пропорциях. Исследование специфичности затрудняется еще и тем обстоятельством, что многие сложные эфиры почти нерастворимы в воде, а это лишает нас возможности проводить изучение различных субстратов при сравнимых условиях или определять для этих случаев величину V. Кроме того, обычный субстрат — ацетилхолин — в высоких концентрациях сильно подавляет активность ацетилхолинэстеразы, чего не наблюдается с другими субстратами. Поэтому для ацетилхолин-

эстеразы трудно получить «эталонную» величину скорости, с которой можно было бы сравнить скорости реакций гидролиза других субстратов. В свете всего сказанного не приходится удивляться тому, что и в литературе о холинэстеразах, и в номенклатуре этих ферментов царит путаница.

Адамс [5] и Адамс и Уиттакер [6] исследовали специфичность действия ацетилхолинэстеразы из эритроцитов человека и холинэстеразы из плазмы человека. Авторам не удалось в надлежащей степени очистить ферменты, но они достаточно убедительно показали, что их препараты не содержат присутствующей в крови карбоксилэстеразы; кроме того, на основании опытов с ингибиторами и со смесью субстратов им удалось также показать, что наблюдаемые реакции были обусловлены в основном присутствием в каждом препарате только одного фермента. Оказалось, что ацетилхолинэстераза и холинэстераза могут гидролизовать эфиры не только холина, но и других соединений. 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 гидролизуется 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. Фермент, полученный из тканей комнатных мух и идентифицированный как ацетилхолинэстераза, обладал промежуточными свойствами и гидролизовал бутирилхолин вдвое медленнее, чем ацетилхолин [541]. Мейерс [1908] установил, что холинэстеразы некоторых видов сходны в том отношении, что их активность увеличивается с увеличением длины цепи в молекуле субстрата; для эфиров холина был установлен, например, следующий ряд: бутирил > пропионил > ацетил. В то же время с холинэстеразами ряда других видов животных наблюдали иную последовательность: пропионил > бутирил > ацетил, бутирил > ацетил > пропионил [100] и даже пропионил > ацетил > бутирил.

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 других групп эфиров.) Однако при изменении длины ацильной цепи (алкильная группа одна и та же) между двумя холинэстеразами наблюдалось выраженное различие; ацетилхолинэстераза обнаруживала отчетливый оптимум с двууглеродной ацильной группой (ацетат) и нулевую активность в случае бутирата, тогда как у холинэстеразы, наоборот, реакций 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:



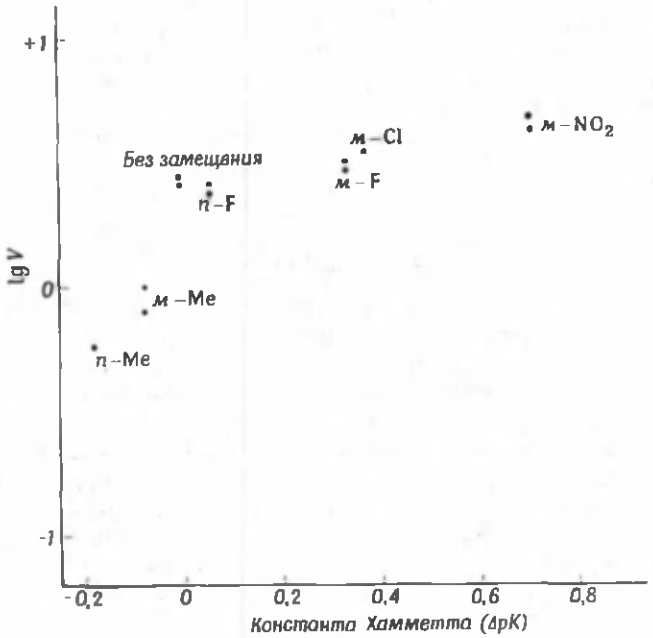
Ацетилхолин

3,3-диметилбутилацетат

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, могут гидролизовать наряду с алифатическими также и ароматические эфиры, часто с весьма высокой скоростью. Например, в случае очищенной ацетилхолинэстеразы



Фиг. 67. Влияние замещений в кольце бензоилхолина на максимальную скорость его гидролиза холинэстеразой [2033].

Зависимость $\lg V$ от константы Хаммета, которая характеризует изменение pK бензойной кислоты, вызванное соответствующим замещением [988, стр. 186].

из тканей электрического угря скорости гидролиза ацетилхолина, фенилацетата, *п*-метоксифенилацетата и *п*-нитрофенилацетата относятся как 1 : 2, 4 : 0, 85 : 0,1 [225].

Ормерод [2033], изучая влияние различных заместителей в кольце бензоилхолина на скорость (V) гидролиза этого субстрата под действием холинэстеразы из сыворотки лошади, обнаружил зависимость между величиной V и электроноакцепторной силой замещающей группы (фиг. 67). Сходная зависимость наблюдается также и при неферментативном щелочном гидролизе. По-видимому, это явление связано не с формой молекулы субстрата, а с реакционной способностью эфирной связи. Аналогичные зависимости были обнаружены и для гликозидаз.

ФОСФАТАЗЫ

В группе фосфатаз встречаются ферменты как с резко выраженной, так и с весьма широкой специфичностью. Кислая и щелочная фосфатазы (3.1.3.1 и 2) гидролизуют большое число моноэфиров ортофосфорной кислоты; в то же время они не действуют на пирофосфаты, метафосфаты или такие фосфодиэфиры, как дифенилфосфат [815, 1496, 1875]. Очищенные щелочные фосфатазы из слизистой тонкого кишечника и из *E. coli* очень сходны по своей

специфичности, если не считать того, что фермент из ткани животного способен гидролизовать амидофосфорную связь в креатинфосфате, а бактериальный фермент не способен.

При детальном исследовании специфичности кислой фосфатазы из *Neurospora* было установлено [1496], что присутствие полярной группы вблизи фосфоэфирной связи оказывает тормозящее действие. Если свободная аминогруппа и фосфомоноэфирная группа присоединены к соседним углеродным атомам, как в случае О-фосфосерина или О-фосфоэтаноламина, то подобное соединение вообще не гидролизуется. Однако соединения, у которых полярная и фосфомоноэфирная группы удалены друг от друга не менее чем на три углеродных атома, гидролизуются хорошо; так, например, 2-амино-2-дезоксиглюкозо-6-фосфат является прекрасным субстратом, тогда как соответствующий 1-фосфат совершенно не поддается гидролизу. Влияние аминогруппы может быть частично нейтрализовано в результате ее ацетилирования: 2-ацетиламино-2-дезоксиглюкозо-1-фосфат гидролизуется лишь в 6 раз медленнее 2-амино-2-дезоксиглюкозо-6-фосфата.

ГЛИКОЗИДАЗЫ

Эта большая и важная группа ферментов расщепляет в основном субстраты, в молекуле которых не содержится заряженных групп. В этих субстратах доминирующую роль играет расположение гидроксильных групп и атомов водорода, и специфичность гликозидаз определяется конфигурацией каждой — CHOH-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 нуклеозидазы) это влияние агликона бывает выражено даже сильнее, чем влияние моносахаридного компонента. Инозиназа (3.2.2.2), например, гидролизует гипоксантинрибозид, но не действует на ксантинрибозид.

Значительное число работ посвящено гликозидазам, отличающимся более широкой специфичностью, например ферментам 3.2.1.20—26; однако, к сожалению, большая часть этих работ проведена на неочищенных препаратах, и поэтому трудно сказать, с чем, собственно, имели дело исследователи — с одним ферментом или со смесью ферментов. Описание самих работ можно найти в обзорах Хельферих [1056], Пигмена [2087] и Готшалька [879]. Как правило, изменение конфигурации хотя бы у одного углеродного атома гликозида уже препятствует действию соответствующего фермента. Например, β-глюкозидаза не действует на β-D-маннозиды (и, по всей вероятности, на β-D-галактозиды), а также на α-D-глюкозиды. Для каждого из эпимеров, отличающихся конфигурацией у первого, второго и четвертого углеродного атома альдогексозного кольца, известны специфичные ферменты. Так, имеются α- и β-глюкозидазы, α- и β-галактозидазы и α- и β-маннозидазы.

Замещение гидроксильных групп в молекуле сахара обычно оказывает глубокое влияние на действие фермента. Например, при любом замещении гидроксильной группы у второго, третьего или четвертого углеродного атома субстратов β-глюкозидазы гидролиз оказывается невозможным. Замещение у шестого углеродного атома снижает скорость гидролиза, причем эффект усиливается с увеличением размера замещающей группы. Замещение — CH_2OH-группы у пятого углеродного атома на атом водорода, т. е. превращение глюкозида в β-D-ксилозид, вызывает снижение скорости гидролиза в 200 раз. Все эти примеры показывают, что для действия фермента требуется интактное (незамещенное) гексозное кольцо.

Природа агликона в гликозиде также оказывает существенное влияние на скорость ферментативного гидролиза. Большинство имеющихся данных

выражено в величинах «эффективности фермента», т. е., по существу, через начальные скорости реакции (v_0) (см., однако, [987]). Наблюдаемые различия в скорости гидролиза могут быть обусловлены влиянием структуры агликона либо на K_s, либо на V. Определяющим фактором служат, по-видимому, электроноакцепторные свойства группы, а не ее размер [1928].

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. Установление этого факта (в котором главная заслуга принадлежит Бергману) радикально изменило представления, царившие в этой области энзимологии. Теперь нам ясно, что определяющим фактором служит не величина молекулы субстрата, а природа аминокислотных боковых цепей и других 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. В табл. 11 представлены данные о действии 11 пептидаз (полученных в кристаллическом или высокоочищенном виде) на 400 синтетических пептидов и родственных им соединений. Эти данные отобраны из большого числа статей, и, хотя во многих случаях авторы выражали активность ферментов количественно (через «протеолитический коэффициент» или «максимальную скорость»), невозможно все же представить их все в сравнимых показателях, потому что разные авторы пользовались различными ферментными препаратами и вели опыты в разных условиях. Вследствие этого мы выразили результаты полуколичественно, различным числом знаков +. Поскольку диапазон наблюдаемых скоростей очень велик, эта шкала по характеру ближе к логарифмической.

Большинство ранних работ с синтетическими пептидами проведено на неочищенных смесях пептидаз; эти данные трудно интерпретировать, и поэтому они не включены в таблицы. Сведения по первым шести ферментам относятся к кристаллическим препаратам; остальные данные были получены с высокоочищенными препаратами, которые, по-видимому, не содержали других пептидаз.

Хотя с пептидазами было проведено много работ, полного представления о специфичности этих ферментов мы пока не имеем. Число ди- и трипептидов, которые теоретически можно синтезировать из обычных аминокислот, достигает примерно 10 000, т. е. в 25 раз превышает число соединений, приведенных в табл. 11 (в которую, кстати, включено также много ацилированных пептидов и соединений непептидной природы). Кроме того, подавляющее большинство соединений, перечисленных в табл. 11, испытывалось только с одной или двумя пептидазами, так что даже с этими соединениями проверено не более 10% возможных комбинаций. И все же даже на основании этих немногих имеющихся сведений можно составить общее представление о специфичности каждого протеолитического фермента.

Специфичность пептидаз неожиданно оказалась очень четко выраженной. Хотя все они катализируют разрыв пептидных связей, ни одна из них не способна гидролизовать все пептиды. Соединение, быстро гидролизуемое одной пептидазой, может слабо гидролизоваться другими или вообще не гидролизоваться. Это дало возможность разработать специальный метод идентификации отдельных ферментов в неочищенных препаратах, содержащих

Таблица 11

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЕПТИДАЗ [1])

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 223, 584, 1007, 2097]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1501, 1959, 2097, 2377, 2720, 2761, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221—223, 562, 743, 764, 850, 1177, 1322, 1359, 2351, 2367, 2463]	Катепсин С (3.4.4.9) [704, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [562, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.11) [562, 2488, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 891, 795]	Глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [563, 564]	Иминодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Форм — Фен						0					
2	Ац — Гли						0					
3	Ац — Фен						0					
4	Ац — Три						0					
5	Cl-Ац — Лей		0	0								
6	Cl-Ац — Фен						+					
7	Cl-Ац — Тир		0	0			+					
8	Cl-Ац— NCH_3 — Тир						0					
9	Cl-Ац — Три						+					
10	Бз — Фен						0					
11	Бз — Тир	0										
12	Кб — Фен						0					
13	Кб — Тир						0					
14	Кб — Три						±					
15	Феннир — Гли						0					
16	Феннир — Лей						++					
17	Феннир — Фен						++					
18	Феннир — Глу						++					
19	Гли — NH_2					0		+		0		
20	Ац — Гли — NH_2			0								

21	Бз — Гли — NH_2		0	0		±						
22	Ник — Гли — NH_2			0								
23	Ац — Гли — $COOCH_3$			0								
24	Бз — Гли — $COOCH_3$			++								
25	Гли — $COOC_2H_5$		0									
26	Бз — Гли — О-β-Фениллактат					++++						
27	Гли — Гли		0	0		0			±	++++		0
28	Бз — Гли — Гли				±	±				0		
29	Кб — Гли — Гли					0				0		
30	CH_3 | Гли — Гли									0		+
31	CH_3 | Кб — Гли — Гли					0						
32	Гли — D, L-Ала		0	0			±			0		
33	Кб — Гли — Ала					±						
34	Гли — β-Ала									±		
35	Гли — D, L-Вал											0
36	Кб — Гли — Амин					±						
37	Гли — Лей				0		++		±	0		0
38	Кб — Гли — Лей					++						
39	Кб — Гли — D-Лей					0						
40	Кб — Гли — Илей					+						
41	Кб — Гли — Мет					++						
42	Кб — Гли — D-Мет					0						
43	Бз — Гли — Фенгли					++						
44	Гли — D, L-Фен											
45	Бз — Гли — Фен					++++						0

Продолжение табл. 11

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 223, 584, 1007, 2097]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1561, 1959, 2097, 2377, 2720, 2761, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221 — 223, 562, 643, 764, 858, 1177, 1322, 1859, 2351, 2367, 2463]	Катепсин С (3.4.4.9) [794, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [502, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1) [562, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 691, 795]	Глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [563, 564]	Имидодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
46	Кб — Гли — Фен			0		0	++++	0	0			
47	Кб — Гли — D-Фен						0					
48	Бзс — Гли — Фен						±					
49	Кб — Гли — Дегидрофен						0					
50	Гли — Тир		0	0			0	+				
51	Кб — Гли — Тир	±					+++					
52	Гли — Про							0	±		++	++++
53	Гли — D-Про											0
54	Кб — Гли — Про											±
55	Гли — Оксипро											+
56	Кб — Гли — Оксипро						0					0
57	CH_3 | Гли — Оксипро											0
58	Гли — Аллооксипро											++
59	Гли — Три			0				+				
60	Кб — Гли — Три					0	+++					
61	Кб — Гли — D-Три						0					
62	Гли — Гис							±				
63	Кб-Гли — Гис						±					
64	Бз — Гли — Лиз						+					

65	Кб | Бз — Гли — Лиз						0					
66	Гли — Асп		0	0								
67	Кб — Гли — Глу						0					
68	CH_3 | Гли — Гли									++		
69	$(CH_3)_2$ | Гли — Гли									0		
70	Бз — Фенгли — $COOC_2H_5$			0								
71	Ала — NH_2							+				
72	Бз — Ала — NH_2			0								
73	Ала — Гли							+		0		0
74	Ала — Лей							++++				
75	Кб — Ала — Фен						++++					
76	Кб — Ала — Тир						+++					
77	β-Ала — Гли									0		
78	β-Ала — β-Ала									0		
79	β-Ала — Про											0
80	β-Ала — Гис							0				
81	D,L-α-Амм — NH_2							++				
82	α-Аминм — NH_2							0				
83	Вал — NH_2							++				
84	D,L-Норвал — NH_2							++++				
85	Бз-Норвал-$COOC_2H_5$		0	±								

Продолжение табл. 11

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 223, 584, 1007, 2087]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1561, 1959, 2097, 2377, 2720, 2761, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221 — 223, 562, 643, 764, 859, 1177, 1322, 1959, 2351, 2367, 2483]	Катепсин С (3.4.4.9) [794, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [562, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.11.1) [562, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.11.3) [11, 691, 795]	Глицилглициндипептидаза (3.4.13.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [583, 584]	Имидодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
86	Лей — NH_2					±		++++	±			0
87	D-Лей — NH_2							0				
88	Ба — D-Лей — NH_2					0						
89	Кб — Лей — NH_2					±		0				
90	Лей — NH-Наф	0	0	0								
91	Лей — Гли		0	0		0	0	++++	±	0		0
92	Ба — Лей — Гли							0				
93	D-Лей — Гли			0				0				
94	Лей — Ала							+++				
95	Лей — D-Ала							+				
96	Лей — β-Ала							++++				
97	Лей — Вал							+++				
98	Лей — D-Вал							±				
99	Лей — Лей		0	0				++++				
100	Лей — D-Лей							+				
101	Лей — Илей							+++				
102	Лей — D-Илей							±				
103	Лей — Фен							++				
104	Лей — D-Фен							±				
105	Лей — Тир		0					+				
106	D-Лей — Тир							0				

107	Илей — NH_2							++				
108	Аллоилей — NH_2							+				
109	D,L-Норлей — NH_2							++++				
110	Бз — Норлей — $COOC_2H_5$		0	±								
111	D, L-Третлей — NH_2							±				
112	D,L — α-Амкапр — NH_2							+++				
113	Сер — NH_2							+				
114	Кб — Сер — NH_2			0								
115	Бз — D, L-Сер — $COOC_2H_5$			0								
116	Ац-D, L-Тре-$COOC_2H_5$			0								
117	Бз — D,L-Тре — $COOC_2H_5$			0								
118	Ци-SH — Тир	++										
119	Кб — Ци-SH — Тир	++++										
120	Бз | Кб — Ци-S — Тир	++										
121	Ник — Мет — NH_2			0								
122	Бз — Мет — $COOC_2H_5$			+++								
123	КБ — Мет — Мет						+					
124	Мет — Тир	++										
125	Кб — Мет — Тир	+++					+++					
126	Фен — NH_2			±				++				
127	Ац — Фен — NH_2			+								
128	Ник — Фен — NH_2			++								
129	Ник — Фен — NH-Наф			++								
130	Ац — Фен — NHOH			++								
131	Бз — Фен — NHOH			++								
132	Без — Фен — $COOCH_3$			++++								

Продолжение табл. 11

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 229, 584, 1007, 2097]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1581, 1959, 2097, 2377, 2720, 2761, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221—223, 562, 648, 764, 859, 1177, 1322, 1959, 2351, 2367, 2463]	Катепсин С (3.4.4.9) [784, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [562, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1) [562, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 691, 795]	Глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [583, 564]	Имидодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
133	Фен — $COOC_2H_5$		±									
134	Ац — Фен — $SCOOC_2H_5$			++++								
135	Ац — Фен — $COOC_2H_5$				0							
136	Бз — Фен — $COOC_2H_5$			++++								
137	Фт — D,L-Фен — $COOCH_3$			0								
138	Ац — Фен — О-β-Наф			++++								
139	Фт — Фен — О-β-Наф			++								
140	Ник — Фен — О-*п*-анизидид			0								
141	Ац — Фен — Гли					0						
142	Ац — Фен — Фен	+++++						0				
143	Ац — D-Фен — Тир	0										
144	Ац — D-Фен — Тир (I_2)	0										
145	Фен — Оксипро											+
146	Кб — Фен — Глу	+		0								
147	Бз — Дегидрофен — NH_2			±								
148	Ац — Дегидрофен — $COOC_2H_5$											
149	Ац — Дегидрофен — Лей						0					
150	Ац — Дегидрофен — Фен						±					
151	Дегидрофен — Про											0
152	Ац — Гексагидрофен — NH_2			+								

153	Тир — NH_2		0	±				++					
154	Форм — Тир — NH_2			+									
155	Ац — Тир — NH_2			+		0		0					
156	Cl-Ац — Тир — NH_2			++									
157	F_3-Ац — Тир — NH_2			++									
158	Бз — Тир — NH_2		0	+++									
159	Ник — Тир — NH_2			++									
160	Изоник — Тир — NH_2			++									
161	Тир — NHOH			+									
162	Ац — Тир — NHOH			++									
163	Ник — Тир — $NHNH_2$			++									
164	Тир — $COOC_2H_5$		±	±									
165	Ац — Тир — $COOC_2H_5$		+	+++++									
166	Бз — Тир — $COOC_2H_5$			+++++									
167	*o*-NO_2												
	Бз — Тир — $COOC_2H_5$			+++++									
168	Кб — Тир — Гли			0									
169	Тир — Ци-SH	+											
170	Кб — Тир — Ци-SH	+++											
171	Кб — Тир — Фен	+++++											
172	Ац												
	Кб — Тир — Фен	0											
173	Тир — Тир							±					
174	Ац — Тир — Тир	+++++											
175	Ац — D-Тир — Тир	0											
176	Тир — Арг							±					
177	Бз — Дегидротир — NH_2			±									

Продолжение табл. 11

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 223, 584, 1007, 2097]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1584, 1959, 2097, 2377, 2720, 2781, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221—223, 562, 843, 764, 850, 1177, 1322, 1959, 2351, 2387, 2463]	Катепсин С (3.4.4.9) [794, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [562, 1423, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.11.1) [562, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 691, 785]	Глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [563, 564]	Имидодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
178	Ац — Дегидротир — Тир	0										
179	Про — NH_2							+			0	
180	Про — Гли							+	±		+++	0
181	Про — Тир										++++	
182	Про — Про										+	++
183	Кб — Про — Про											0
184	Про — Оксипро										±	±
185	Про — Асп										0	
186	Оксипро — NH_2							+			0	0
187	Оксипро — Гли							+			++++	0
188	Оксипро — Ала										+++	
189	Оксипро — Лей										++	
190	Оксипро — Фен										+++	
191	Оксипро — Тир										+++	
192	Оксипро — Асп										0	
193	Оксипро — Глу										0	
194	Аллооксипро — Гли										++++	
195	CH_3 | Оксипро — Гли										++++	
196	Три — NH_2							++				

197	Ац — Три — NH_2			++							
198	Ник — Три — NH_2			++							
199	Ац — Три — $COOC_2H_5$			++++							
200	Кб — Три — Гли						±				
201	Кб — D-Три — Гли						0				
202	Кб — Три — Ала						±				
203	Кб — Три — Тир						+++				
204	Кб — Три — Про						0				
205	Кб — Три — Три						++				
206	Гис — NH_2					±		++			
207	Ба — Гис — NH_2		0								
208	Кб — Гис — NH_2					+					
209	Ник — Гис — NH_2			0							
210	Гис — Гли						0	++			
211	Кб — Гис — Гли						0				
212	Кб — Гис — Фен						++++				
213	Кб — Гис — Тир						+++				
214	Арг — NH_2							+			
215	Ба — Арг — NH_2		++	0		++++	0	0	0		
216	Тс — Арг — NH_2		+++								
217	Кб | Ба — Арг — NH_2										
218	NO_3 | Кб — Арг — NH_2		0			+					
219	Ба — Арг — $COOCH_3$		++++++	+			0				
220	Тс — Ар — $COOCH_3$		+++++			++++					

Продолжение табл. 11

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 228, 584, 1007, 2097]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1561, 1959, 2097, 2377, 2720, 2761, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221—223, 562, 643, 784, 859, 1177, 1322, 1959, 2351, 2367, 2483]	Катепсин С (3.4.4.9) [794, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [562, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1) [562, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 691, 795]	Глицилглицилдипептидаза (3.4.3.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [563, 564]	Имидодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
221	Ба — Арг — $COOC_2H_5$		+++++	+								
222	Тс — Арг — $COOC_2H_5$			±								
223	Арг — Гли		±			0						
224	Арг — Лей		±			0						
225	NO_3 | Кб — Арг — Лей		0			±						
226	Арг — Фен		±									
227	NO_3 | Кб — Арг — Фен		0			±						
228	Арг — Глу		±			0						
229	Лиз — NH_2		±					+				
230	Ба — Лиз — NH_2		++			++						
231	Кб | Лиз — NH_2					0						
232	Кб | Ба — Лиз — NH_2		0									
233	Лиз — $COOC_2H_5$		++++									
234	Кб | Лиз — $COOCH_3$		0									
235	Ба — Лиз — Лиз		0									

236	NH_2										
	Асп — NH_2							+			
237	Глу — NH_2							+			
238	Бз — Глу — NH_2		0								
239	Кб — Глу — NH_2		0		±						
240	NH_2										
	Кб — Глу — NH_2				++						
241	Кб — Глу — Гли	0									
242	Кб — Глу — Мет					±					
243	Кб — Глу — Фен	++				++					
244	Кб — Глу — D-Фен	0									
245	NH_2										
	Кб — Глу — Фен	+									
246	Глу — Тир	±		0	±	+					
247	Кб — Глу — Тир	++++									
248	Кб — D-Глу — Тир	0									
249	I_2										
	Кб — Глу — Тир	0									
250	Кб — Глу — Глу	0		0							
251	ε-Амкапр — $COOC_2H_5$		0								
252	L-β-Фениллактат — $COOCH_3$			++							
253	D-β-Фениллактат — $COOCH_3$			+							
254	D,L-α-Cl-β-Фенилпропионат — $COOCH_3$			++							
255	Гидроциннамат — $COOCH_3$			++							
256	α-Ац-β-Фенилпропионат — $COOC_2H_5$			0							
257	α-Бензилмалонат — $COOC_2H_5$			0							

Продолжение табл. 11

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 229, 584, 1007, 2097]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1561, 1959, 2097, 2377, 2720, 2761, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221–223, 562, 643, 764, 859, 1177, 1322, 1959, 2351, 2367, 2463]	Катепсин С (3.4.4.9) [794, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [562, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1) [562, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 691, 795]	Глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [563, 564]	Иминодипептидаза (3.4.3.7) [112, 14, 565, 2442]
258	NH_2 | α-Бензилмалонат — NH_2			0								
259	$HOC_6H_4CH_2CH_2COCH_2COOH$			±								
260	$HOC_6H_4CH_2CH_2COCH_2COOC_2H_5$			±								
261	$C_6H_5CH_2CH_2COCH_2COOH$			0								
262	$NH_2(CH_2)_5COCH_2COOC_2H_5$		±									
263	Гли — Гли — NH_2			0					+1	0		
264	Гли — Гли — $COOC_2H_5$				++							
265	Гли — Гли — Гли		0	0				+?	+++??	0	0	0
266	Кб — Гли — Гли — Гли								0			
267	CH_3 | Гли — Гли — Гли								++1			
268	Гли — Гли — β-Ала								+1			
269	Гли — Гли — Лей								++1			
270	Гли — Гли — D-Лей								+1			
271	Гли — Гли — Про								+++1			0
272	Гли — Гли — Оксипро								+++1			0
273	Ала — Гли — Гли		0	0					++++1			
274	D-Ала — Гли — Гли								±1			
275	β-Ала — Гли — Гли								0			

276	β-Ала — Гли — β-Ала								0			
277	Лей — Гли — Гли		0			±		++++1	+++1			0
278	D-Лей — Гли — Гли			0					0			
279	Кб — Лей — Гли — Гли								0			
280	Фен — Гли — NH_2			+								
281	Ба — D,L-Фен — Гли — NH_2			0								
282	Тир — Гли — NH_2			+1								
283	Бэ — Тир — Гли — NH_2		0	+++2		++						
284	Бэ — D-Тир — Гли — NH_2			0								
285	Кб — Тир — Гли — NH_2		0	+++2								
286	Кб — D-Тир — Гли — NH_2			0								
287	Ац — Тир — Гли — NH_2			++2								
288	Ац | Кб — Тир — Гли — $COOC_2H_5$		±	0								
289	Про — Гли — Гли								+++++1		0	
290	Оксипро — Гли — Гли								++1		0	
291	Кб — Три — Гли — NH_2			±2								
292	Гис — Гли — Гли							+-+1				
293	Лиз — Гли — NH_2		±1									
294	CH_3 | Ала — Гли — Гли								0			
295	Лей — Ала — NH_2							++++?				
296	Гли — β-Ала — Гли								±			
297	Гли — β-Ала — β-Ала								+1			
298	β-Ала — β-Ала — Гли								0			
299	β-Ала — β-Ала — β-Ала								0			
300	Лей — Вал — NH_2							++++?				

Продолжение табл. 11

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 223, 584, 1007, 2097]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1561, 1959, 2097, 2377, 2720, 2761, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221—223, 562, 643, 784, 859, 1177, 1322, 1959, 2351, 2367, 2403]	Катепсин С (3.4.4.9) [794, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [562, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1) [562, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 681, 795]	Глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [563, 564]	Иминодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
301	Гли — Лей — NH_2							++				
302	Кб — Гли — Лей — NH_2							0				
303	Гли — Лей — $COOC_2H_5$				++							
304	Гли — Лей — Гли								++++1			
305	Гли — D-Лей — Гли								±1			
306	Бз — Гли — Лей — Гли					++2						
307	Гли — Лей — D-Лей								+1			
308	Ала — Лей — NH_2							++++1,2				
309	D-Ала — Лей — NH_2							0				
310	β-Ала — Лей — NH_2							0				
311	Бз — Лей — Лей — Гли			0								
312	γ-Глу — Ци-SH — Гли						+		±1			
313	Гли — Фен — NH_2			+	++				0			
314	Гли — D-Фен — NH_2				0							
315	Кб — Гли — Фен — NH_2						0					
316	Гли — Фен — $COOC_2H_5$				++++							
317	Кб — Гли — D,L-Фен — $COOC_2H_5$		0	++								
318	CH_3 | Гли — Фен — NH_2				±							

319	CH_3 | Гли—Фен—$COOC_2H_5$				+							
320	β-Ала—Фен—$COOC_2H_5$				0							
321	Амин—Фен—$COOC_2H_5$				+							
322	Лей—Фен—$COOC_2H_5$				+							
323	Сер—Фен—NH_2				+							
324	Фен—Фен—NH_2			±								
325	Кб—Фен—Фен—NH_2	0										
326	Про—Фен—NH_2				++							
327	Про—Фен—$COOC_2H_5$				++++							
328	Лиз—Фен—NH_2				0							
329	Ац | Лиз—Фен—NH_2				±							
330	Бз | Лиз—Фен—NH_2				0							
331	Лиз—Фен—$COOC_2H_5$				0							
332	Ац | Лиз—Фен—$COOC_2H_5$				±							
333	Кб—Глу—Фен—NH_2			0			0					
334	γ-Глу—Фен—NH_2			±								
335	Гли—$N(CH_3)$Фен—NH_2				0							
336	Гли—Тир—NH_2			±	++							
337	Кб—Гли—Тир—NH_2			±								
338	Гли—Тир—$COOC_2H_5$				++++							
339	Кб—Гли—Тир—$COOC_2H_5$		0	+								
340	CH_3 | Гли—Тир—NH_2				±							

Продолжение табл. 11

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 223, 584, 1007, 2087]	Трипсин (3.4.4.4) [1122, 1561, 1959, 2097, 2377, 2720, 2781, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221—223, 362, 643, 764, 859, 1177, 1322, 1959, 2351, 2367, 2463]	Катепсин С (3.4.4.9) [794, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [562, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [562, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1) [562, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 681, 795]	Глицилглицин-дипептидаза (3.4.9.1) [2438]	Иминодипептидаза (3.4.3.6) [563, 564]	Имидодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
341	CH_3 | Гли — Тир — $COOC_2H_5$				+							
342	Ала — Тир — NH_2				+							
343	Ала — Тир — $COOC_2H_5$				+							
344	D-Ала — Тир — $COOC_2H_5$				+							
345	Амим — Тир — $COOC_2H_5$				+							
346	Сер — Тир — NH_2				+							
347	Фен — Тир — NH_2			+								
348	Тир — Тир — NH_2			+								
349	Кб — Тир — Тир — NH_2			+								
350	Про — Тир — NH_2				+							
351	Про — Тир — $COOC_2H_5$				+							
352	Лиз — Тир — NH_2				0							
353	Ба | Лиз — Тир — NH_2				0							
354	Лиз — Тир — $COOC_2H_5$				0							
355	Ац | Лиз — Тир — NH_2				±							
356	Ац | Лиз — Тир — $COOC_2H_5$				±							

357	Кб—Глу—Тир—NH_2	+2										
358	Кб—Глу—Тир—Гли	++2		0								
359	NH_2											
	Кб—Глу—Тир—NH_2	±2										
360	γ-Глу—Тир—NH_2			±								
361	CH_3				++							
	Гли—Тир—NH_2											
362	Гли—Про—Гли							0		0	0	
363	Кб—Гли—Три—NH_2			±			0					
364	Ба—Гли—Гис—NH_2					+2						
365	Кб—Гли—Гис—NH_2			0								
366	Ба—Гли—Арг—NH_2		++++									
367	Кб											
	Ба—Гли—Арг—NH_2		0									
368	Гли—Лиз—NH_2		+									
369	Ба—Гли—Лиз—NH_2		++++	0								
370	Тир—Лиз—Глу		0				±					
	Лиз—Лиз—NH_2											
371	Лиз—Лиз—Лиз		+									
372	Ба—Лиз—Лиз—Лиз		+1									
373	Кб		++++2									
	Ба—Гли—Лиз—NH_2		0			0						
374	Гли—Глу—Гли											
375	Гли—Глу—Тир	++										
376	Кб—Гли—Глу—Тир	+++										
377	Ник—Фен—Мочевина—О-β-Наф			0								
378												

№ п/п	Пептид	Пепсин (3.4.4.1) [142, 223, 584, 1007, 2097]	Трипсин (3.4.4.4.) [1122, 1561, 1959, 2097, 2377, 2720, 2781, 2974]	Химотрипсин (3.4.4.5) [221—223, 562, 613, 764, 859, 1177, 1322, 1959, 2351, 2367, 2463]	Катепсин С (3.4.4.9) [794, 1223]	Папаин (3.4.4.10) [582, 1381, 2720]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) [582, 1123, 1959, 2351, 2503]	Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1.) [582, 2438, 2488]	Аминотрипептидаза (3.4.1.3) [11, 691, 795]	Глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1) [2438]	Иминопептидаза (3.4.3.8) [563, 564]	Имидодипептидаза (3.4.3.7) [12, 14, 565, 2442]
379	Гли — Гли — Гли — NH_2								±1			
380	Гли — Гли — Гли — Гли		0	0					±1			
381	Кб — Тир — Гли — Гли — NH_2			±2								
	CH_3					0						
382	Кб — Гли — Гли — Гли — Гли											
383	Кб — Гли — Лей — Гли — NH_2			0								
384	Гли — Лей — Гли — Лей								0			
385	Гли — Фен — Гли — NH_2				0							
386	Кб — Гли — Фен — Гли — NH_2			+3								
387	Гли — Тир — Гли — NH_2			+++2								
388	Кб — Гли — Тир — Гли — NH_2	±2	0	+++3								
389	Глу — Тир — Гли — NH_2	0		++2								
390	Кб — Глу — Тир — Гли — NH_2	++2		++++3								
391	Кб — Гли — Глу — Гли — NH_2	0		0								
392	Гли — Глу — Гли — $COOC_2H_5$											
393	Ала — Ала — Ала — Ала			0								
394	Гли — Гли — Лей — Гли					±?		±?	0			
395	Гли — Гли — Фен — NH_2				0							
396	Гли — Гли — Фен — $COOC_2H_5$				±							
397	Лиз — Лиз — Лиз — Лиз		+++?									

398	Гли — Гли — Глу — Гли									±[1]			
399	Тир — Лиз — Глу — Тир	±	+[2]	±[1]			+						
400	Ала — Ала — Ала — Ала — Ала			0									
401	Тир — Тир — Лиз — Глу — Тир		+3										
402	Гли — Гли — Гли — Гли — Гли — Гли		0	0									
403	$(Лиз)_{>4}$		++++?										
404	$(D\text{-}Лиз)_{>4}$		0										
405	$(Орн)_{>4}$		0										
406	Ци-S — Тир | Ци-S — Тир	±											
407	Кб — Ци-S — Тир | Кб — Ци-S — Тир	+											
408	Тир — Ци-S | Тир — Ци-S	±											
409	Кб — Тир — Цис-S | Кб — Тир — Ци-S	+											

1) Субстраты приведены в порядке возрастания сложности. Каждый аминокислотный остаток, а также каждая α-амидная, α-оксамидная, α-гидразидная или эфирная группа рассматривается как одна единица (ацилированная или ω-замещенная аминокислота тоже рассматривается как одна единица). В таблице представлены соединения, состоящие как из одинаковых, так и из разных единиц — двух, трех или четырех. Приведено также и несколько относительно более сложных соединений. Внутри групп соединения расположены в зависимости от природы предпоследней единицы, которая во многих случаях определяет специфичность. Во всех пептидах N-концевой остаток показан слева, а С-концевой справа. Ацильные группировки, являющиеся заместителями в α-NH_2-группе, написаны слева; группировки, являющиеся заместителями в боковых цепях аминокислот, написаны над соответствующей аминокислотой. Скорость гидролиза выражена полуколичественно, числом знаков +. Так как сродство к субстрату обычно невелико, скорость в большинстве случаев приближается к v_0, а не к V. Во всех случаях, за исключением специально оговоренных, гидролизуется крайняя правая связь; если гидролизуется какая-либо другая связь, то цифры при знаках + или ± указывают ее порядковый номер, считая слева. В тех случаях, когда положение гидролизуемой связи точно не установлено, вместо цифры стоит знак вопроса. Приведенные в таблице аминокислоты являются L-изомерами (имеющиеся исключения специально оговорены).

В таблице использованы следующие сокращения:

Для обозначения аминокислот: Гли — глицин; Фенгли — фенилглицин; Ала — аланин; Амм — α-амино-*н*-масляная кислота; Амим — α-аминоизомасляная кислота; Вал — валин; Норвал — норвалин; Лей — лейцин; Илей — изолейцин; Аллоилей — аллоизолейцин; Норлей — норлейцин; Третлей — третичный лейцин; α-Амкапр — α-амино-*н*-капроновая кислота; Сер — серин; Тре — треонин; Ци-SH — цистеин; Ци-S — цистин; Мет — метионин; Фен — фенилаланин, Тир — тирозин; Про — пролин; Оксипро — оксипролин; Аллооксипро — аллооксипролин; Три — триптофан; Гис — гистидин; Арг — аргинин; Лиз — лизин; Асп — аспарагиновая кислота; Глу — глутаминовая кислота; ε-Амкапр — ε-амино-*н*-капроновая кислота; Орп — орнитин.

Для обозначения заместителей по карбоксильной группе: NH_2 — амид; NH-Наф — β-нафтиламид; NHOH — оксамид; $NHNH_2$ — гидразид; $COOCH_3$ — метиловый эфир; $COOC_2H_5$ — этиловый эфир; O-β-Наф — β-нафтиловый эфир.

Для обозначения заместителей по аминогруппе: Форм — формил; Ац — ацетил; Cl-Ац — хлорацетил; F_3-Ац — трифторацетил; Бз — бензоил; Бзс — бензилсульфонил; Тс — толуолсульфонил; Кб — карбобензокси-группа ($C_6H_5CH_2OCO$ —); Ник — никотинил; Изоник — изоникотинил; Фенпир — фенилпирувил.

смесь ферментов; идентификация производится с помощью «специфических субстратов», каждый из которых гидролизуется только одним определенным ферментом. Подобные субстраты были описаны для большинства перечисленных в таблице ферментов. Ниже мы рассмотрим специфичность отдельных ферментов.

Пепсин

Точная специфичность этого фермента еще не совсем ясна. Хотя пепсин первым из всех протеолитических ферментов был получен в кристаллическом виде, специфичность его 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 лосося не расщепляет те синтетические пептиды, которые гидролизует пепсин млекопитающих [1988]. Однако имеются данные [1133], подтверждающие, что и пепсин млекопитающих действительно может расщеплять синтетические пептиды.

В противоположность некоторым другим пептидазам пепсин не действует ни на амидные, ни на сложноэфирные связи [1] 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 (ср. в табл. 11 следующие пары соединений: 142 и 143, 174 и 175, 243 и 244, 247 и 248). Особенно благоприятствует действию пепсина наличие ароматического кольца в боковой цепи одной из аминокислот. Это можно проиллюстрировать на примере соединений 118—120, 124, 125, 243, 247, 358, 376, 377, 388 и 390, у которых расщепляемая связь образована аминогруппой тирозина или фенилаланина; соединений 169—171, 408 и 409, у которых эта связь образована карбоксильной группой ароматической аминокислоты, и соединений 142, 171 и 174, у которых оба остатка принадлежат ароматическим аминокислотам и которые расщепляются значительно быстрее, чем остальные субстраты. Замещение в ароматическом кольце или введение вместо тирозина дегидротирозина полностью подавляет действие пепсина (ср. соединения 171 и 172, 247 и 249, 174 и 178).

Действие пепсина на субстраты, содержащие справа от гидролизуемой связи остаток ароматической аминокислоты, облегчается, если место левого аминокислотного остатка занимает остаток глутаминовой кислоты (ср. соединения 51 и 247, 388 и 390). Амидирование карбоксильной группы в боковой цепи несколько уменьшает скорость гидролиза (ср. соединения 243 и 245, 357 и 359). Глутамилпептиды расщепляются только в том случае, если они содержат остаток ароматической аминокислоты (ср. соединения 241 и 250 с соединением 243). Присутствие в тирозинсодержащих пептидах серусодержащих аминокислотных остатков также благоприятствует действию пепсина (см. соединения 118—120, 124, 125, 169 и 170). Наличие свободной тиоловой группы в боковой цепи не является обязательным, так как бензоилирование не препятствует действию пепсина (см. соединение 120), и $—SCH_3$-группа метионина также эффективна (соединения 124 и 125).

Амидирование С-концевой карбоксильной группы препятствует гидролизу (ср. соединения 247 и 357). Присутствие свободной α-аминогруппы

[1] В работе Л. А. Локшиной, В. Н. Ореховича и В. А. Склянкиной («Вопросы медицинской химии», т. X, в. 5, стр. 552, 1964) показана способность пепсина гидролизовать сложноэфирные связи.— *Прим. перев.*

в непосредственной близости от гидролизуемой пептидной связи также тормозит расщепление субстрата (ср. соединения 118 и 119, 124 и 125, 246 и 247, а также 246 с 376 и 377). Эти примеры показывают, что ацилирование аминогруппы или отдаление ее от расщепляемой связи уменьшает ее влияние.

В табл. 11 приведены данные о действии пептидаз только на короткие пептиды. В настоящее время, однако, имеется возможность изучать специфичность действия пептидаз на пептидах с длинной цепью и на белках путем идентификации образующихся концевых групп, например по методу Сэнгера. Для белка неизвестной структуры полностью определить этим методом природу гидролизуемых связей, разумеется, невозможно. Если, например, при гидролизе образуются N-концевые группы A и B и C-концевые группы C и D, то ясно, что существует два возможных варианта строения расщепившихся связей: A — C и B — D или A — D и B — C. Когда же субстратом является полипептид известной структуры (например, A- или B-цепь молекулы инсулина), такого рода затруднения могут быть преодолены. Однако и в этом случае обычно трудно определить последовательность расщепления различных связей.

Данные о действии пепсина на A- и B-цепи инсулина [2299, 2300], а также на глобин и яичный альбумин [598, 2261] в общем согласуются с данными табл. 11. Однако в белках наблюдали гидролиз некоторых дополнительных связей, например связи Лей-Вал, как показано стрелками с буквой П, на фиг. 68.

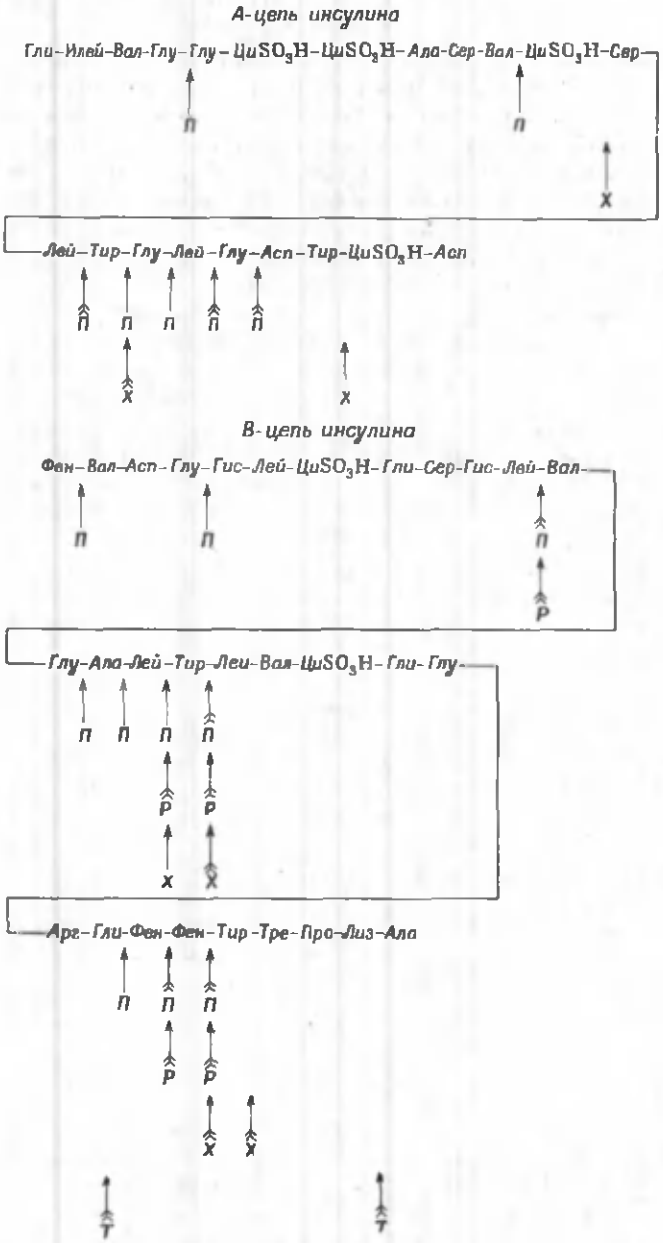
Специфичность кристаллического реннина (3.4.4.3), по-видимому, сходна со специфичностью пепсина [741] (см. действие реннина на B-цепь инсулина на фиг. 68; действие на A-цепь изучено не было).

Трипсин

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; в табл. 11 приведено только два соединения из серии эфиров бензоиларгинина (219 и 221); остальные ведут себя сходно [1959]. Даже такое простое соединение, как этиловый эфир лизина [233], быстро гидролизуется трипсином. Замещение аминогруппы в боковой цепи делает гидролиз невозможным (ср. соединения 215 и 217, 230 и 232, 366 и 367, 369 и 374), тогда как замещение α-аминогруппы, наоборот, благоприятствует гидролизу (ср. соединения 229 и 230, 368 и 369, 372 и 373). В то же время при удалении α-аминогруппы гидролиз также оказывается невозможным (см. соединение 251). Боковая цепь не должна быть короче боковой цепи лизина (ср. соединения 403 и 405). Кислотный остаток в боковой цепи аминокислоты, расположенной рядом с гидролизуемой связью, замедляет гидролиз; это можно видеть на примере субстратов 399 и 401, которые плохо расщепляются, а также на примере соединения 370, которое вообще не расщепляется. *Установлено* [2377], *что трипсин оказывает слабое гидролизующее действие на β-кетокислоты с боковой цепью типа лизина* (см. соединение 262).

Химотрипсин

Этот фермент сходен с трипсином и отличается от пепсина тем, что он гидролизует не только пептиды, но также амиды и эфиры [1]; в то же время он сходен с пепсином и отличается от трипсина тем, что предпочтительно расщепляет связи, образованные остатками ароматических аминокислот.



Фиг. 68. Действие некоторых пептидаз на пептидные цепи инсулина.

Простыми стрелками обозначены точки расщепления молекулы инсулина различными пептидазами, оперенными стрелками — главные точки приложения действия пептидаз. *П* — пепсин; *Р* — реннин; *Х* — химотрипсин; *Т* — трипсин. Трипсин не оказывает никакого действия на А-цепь; действие реннина на А-цепь не изучено.

Лучшими субстратами оказываются эфиры, особенно эфиры N-ацилтирозина (см. соединения 165—167); эфиры фенилаланина гидролизуются медленнее. Гидролизуются также и некоторые эфиры триптофана и метионина (см. соединения 122 и 199); эфиры аргинина, норлейцина и норвалина расщепляются чрезвычайно медленно (см. соединения 85, 110, 219 и 222).

Нитрование тирозинового кольца в *о*-положении (см. субстрат 167) не влияет на действие химотрипсина, тогда как удаление метиленовой группы из боковой цепи фенилаланина полностью предотвращает гидролиз (ср. соединения 70 и 136).

Как правило, ацилирование α-аминогруппы ароматической аминокислоты благоприятствует действию химотрипсина, т. е. влияет так же, как и в случае пепсина (ср. соединения 153 и 154—160; 161 и 162; 164 и 165, 166; 282 и 283; 285 и 287). Подобное же влияние оказывает и удаление аминогруппы от гидролизуемой связи (ср. соединения 389 и 390). В то же время для действия химотрипсина в отличие от пепсина очень важна природа ацильной группы, причем это влияние особенно заметно проявляется в случае таких ароматических ацильных групп, как бензоил-, карбобензокси- и никотинил-группы (ср. соединения 23 и 24, 127 и 128, а также соединения 154 и 155 с соединениями 158—160). Группы этого типа, по-видимому, увеличивают как сродство фермента к субстрату, так и скорость распада комплекса ES (табл. 12). Бензоильная группа может обеспечить необходимое для фермента присутствие ароматического кольца в молекуле субстрата; в соединении 24 единственное ароматическое кольцо представлено именно бензоильной группой (ср. с соединением 23). При замещении обоих атомов водорода в α-аминогруппе (например, при образовании фталимидной группы; см. соединение 137) образуется соединение, которое химотрипсин не способен расщеплять.

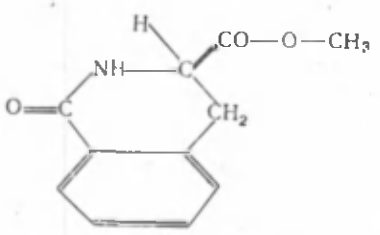
Было показано, что если вместо ацилирования заменить α-аминогруппу водородом, то полученное соединение все же будет гидролизоваться химотрипсином (см. соединение 255, которое можно рассматривать как метиловый эфир фенилаланина без аминогруппы). Аминогруппу можно также заменить гидроксилом (соединения 252 и 253) или хлором (соединение 254), но не карбоксильной группой (соединение 257) и не CH_3CO-группой (соединение 256).

Подобно трипсину, химотрипсин способен расщеплять β-кетокислоты, содержащие определенную боковую цепь (см. соединения 259 и 260).

Для ряда субстратов химотрипсина имеются данные, показывающие, как влияют изменения в структуре на величины K_m и V. Эти данные, заимствованные из разных работ [643, 764, 1322, 2463], приведены в табл. 12.

Для того чтобы субстрат мог гидролизоваться химотрипсином, ароматическая аминокислота должна иметь L-конфигурацию. В то же время химотрипсин имеет высокое сродство и к соответствующим D-изомерам; они действуют как конкурентные ингибиторы (см. табл. 7).

Следует рассмотреть один случай оптической специфичности химотрипсина, представляющий особый интерес. В соединении



эфирная связь гидролизуется только в D-форме, а L-форма не атакуется в отличие от того, что имеет место в случае эфиров фенилаланина с откры-

Таблица 12

КИНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ НЕКОТОРЫХ СУБСТРАТОВ ХИМОТРИПСИНА

Номер по табл. 11	Субстрат	$Km \cdot 10^3$	$V \cdot 10^3$, моль/мин·мл на 1 мг N
24	Ба—Гли—$COOCH_3$	6,5	2,2
122	Ба—Мет—$COOC_2H_5$	0,83	8,0
127	Ац—Фен—NH_2	31	0,8
128	Ник—Фен—NH_2	19	2,0
136	Ба—Фен—$COOC_2H_5$	5,7	390
152	Ац—Гексагидрофен—NH_2	27	0,65
154	Форм—Тир—NH_2	12	0,45
155	Ац—Тир—NH_2	32	2,4
156	Cl-Ац—Тир—NH_2	27	4,0
157	F_3-Ац—Тир—NH_2	26	2,6
158	Ба—Тир—NH_2	2,5	4,0
159	Ник—Тир—NH_2	12	5,0
160	Изоник—Тир—NH_2	9,0	6,4
161	Тир—NHOH	41	3,6
162	Ац—Тир—NHOH	43	33
165	Ац—Тир—$COOC_2H_5$	74	4500
166	Ба—Тир(o-NO_2)—$COOC_2H_5$	3,9	820
167	Ба—Тир—$COOC_2H_5$	11,4	3400
197	Ац—Три—NH_2	5,0	0,55
198	Ник—Три—NH_2	2,5	1,5
199	Ац—Три—$COOC_2H_5$	4,8	363
252	L-β-Фениллактат—$COOCH_3$	10	14
253	D-β-Фениллактат—$COOCH_3$	35	2,4
254	D, L-α-Cl-β-Фенилпропионат—$COOCH_3$	2,3	83
255	Гидроциннамат—$COOCH_3$	0,2	22
259	$HOC_6H_4CH_2CH_2CO—CH_2COOH$	140	0,8
260	$HOC_6H_4CH_2CH_2CO—CH_2COCOOC_2H_5$	40	2,5
287	Ац—Тир—Гли—NH_2	23	7,5
336	Гли—Тир—NH_2	122	4,1

той цепью. Так как оптически активный углеродный атом находится в насыщенном кольце, то конфигурация молекулы фиксирована и, значит, действие на D-форму следует рассматривать как указание на то, что активный центр фермента специфичен по отношению к этой конфигурации. L-формы с открытой цепью вследствие своей «гибкости» могут принимать необходимую для действия фермента конфигурацию; что же касается D-форм с открытой цепью, то у них соответствующему изменению препятствуют стерические ограничения [108].

Катепсин С

Этот фермент, подобно пепсину и химотрипсину, действует главным образом на соединения, содержащие ароматические аминокислоты, однако он отличается от упомянутых ферментов тем, что для его действия необходимо присутствие свободной α-аминогруппы. Последняя должна принадле-

жать не ароматической, а другой аминокислоте (соединенной с аминогруппой ароматической аминокислоты), хотя в образовании расщепляемой связи участвует карбоксильная группа ароматической аминокислоты. Большинство испытанных субстратов представляет собой амиды или эфиры дипептидов. Было показано, что при ацилировании α-аминогруппы эти соединения утрачивают способность гидролизоваться катепсином С. Таким образом, данный фермент по характеру действия можно считать аминопептидазой, которая отщепляет дипептиды с N-конца (ср. с β-амилазой). На N-конце молекулы субстрата должны находиться по преимуществу аминокислоты с небольшой боковой цепью, например глицин, аланин или серин, а также пролин (см. соединения 313, 316, 323, 326, 327, 336, 338, 342, 343, 350 и 351). Атом водорода левой пептидной связи не должен быть замещен, хотя эта пептидная связь гидролизу не подвергается (ср. соединения 313 и 335).

Метилирование аминогруппы глицина значительно замедляет действие катепсина (ср. соединения 338 и 341), а удаление α-аминогруппы от расщепляемой связи (в результате введения одной метиленовой группы) дает негидролизуемое соединение (ср. соединения 316 и 320). Для некоторых субстратов были определены значения K_m и V [794].

Катепсин С не действует на белки, если только они не содержат соответствующих N-концевых дипептидных группировок [2094].

Папаин

Хотя с кристаллическим папаином был проведен ряд исследований, однако на основании полученных данных нельзя составить столь ясного представления о специфичности этого фермента, какое имеется в отношении ряда других пептидаз. Папаин (как и трипсин) гидролизует в первую очередь амиды и эфиры основных аминокислот (см. соединение 215, 220 и 230), имеющих незамещенную аминогруппу в боковой цепи (ср. соединения 215 и 218). Он гидролизует также ряд производных глицина и лейцина и некоторые производные глутаминовой кислоты, если эти последние амидированы в боковой цепи (см. соединение 240).

Карбоксипептидаза

Этот фермент в отличие от рассмотренных выше действует лишь при наличии свободной карбоксильной группы и не гидролизует амиды или эфиры простых спиртов. Специфичность фермента определяется главным образом той аминокислотой, которая несет свободную карбоксильную группу, и лишь в значительно меньшей степени — частью молекулы, расположенной слева от этой аминокислоты; эта часть может быть представлена даже ацильной группой, как, например, в соединениях 6, 7, 9, 14 и 16—18.

Подобно пепсину и химотрипсину, карбоксипептидаза лучше всего действует на соединения, содержащие остаток ароматической аминокислоты, однако в данном случае этот остаток находится справа от расщепляемой связи (см. соединения 45, 46, 51, 60, 75, 76, 125 и 203). Это может быть даже остаток ароматической оксикислоты, как, например, в соединении 26. Ароматическая аминокислота должна принадлежать к L-ряду (ср. соединения 38 и 39, 41 и 42, 46 и 47, 60 и 61). Длина боковой цепи не имеет решающего значения; так, например, карбоксипептидаза может отщеплять С-концевой остаток фенилглицина (см. соединение 43). Фермент отщепляет также С-концевые остатки ряда других аминокислот, хотя и с меньшей скоростью. Поэтому он используется для идентификации С-концевых аминокислот.

При таком анализе следует помнить, однако, что отрицательные результаты не обязательно означают отсутствие в субстрате соответствующих С-концевых аминокислот (см. гл. XI). Фермент весьма слабо гидролизует дипептиды, если только аминогруппа дипептида не ацилирована (см. соединения 173 и 176; ср. соединения 50 и 51), хотя в трипептидах или в полипептидах длина пептидной цепи не имеет большого значения. При действии на белки и длинные пептидные цепи фермент способен отщепить с С-конца 15 аминокислот из 20, встречающихся в природе.

Лейцинаминопептидаза

Этот фермент действует только на субстраты, в молекуле которых имеется свободная α-аминогруппа, и, следовательно, он по праву носит название *аминопептидаза*; блокирование α-аминогруппы препятствует действию фермента (ср. соединения 91 и 92). В большинстве случаев, приведенных в табл. 11, фермент гидролизует пептидную связь, находящуюся рядом с этой аминогруппой; однако известен по крайней мере один случай, когда гидролизу подвергается не соседняя, а вторая по счету связь (см. соединение 301).

Лейцинаминопептидаза гидролизует амиды большинства аминокислот, причем амиды лейцина, норлейцина, норвалина и 2-аминокапроновой кислоты расщепляются быстрее, чем амиды других аминокислот. Замещение NH_2-группы амида на остаток глицина не оказывает большого влияния, так что дипептиды гидролизуются приблизительно с такой же скоростью, как и амиды. В отличие от трипсина и химотрипсина лейцинаминопептидаза не гидролизует эфиры аминокислот [2448]. В соответствии с этим отсутствием эстеразной активности данный фермент не подавляется диизопропилфторфосфатом (см. стр. 307). Лейцинаминопептидаза не отличается строгой специфичностью (в отношении лейцина), однако она действует главным образом на соединения, у которых N-концевая аминокислота имеет алифатическую боковую цепь, причем эффективность действия увеличивается с увеличением длины этой боковой цепи. Кроме того, она действует на соединения, имеющие на N-конце остатки фенилаланина, тирозина, гистидина или триптофана. Большое значение имеет конфигурация аминокислот по обе стороны от расщепляемой связи, в особенности слева от нее (ср. соединения 86 и 87, 91 и 93, 94 и 95, 99 и 100, 101 и 102, 103 и 104, 105 и 106, 308 и 309). Для действия фермента благоприятно, если в образовании гидролизуемой связи участвует остаток лейцина (ср. соединения 74 и 94).

Аминотрипептидаза

Пока нам известно только одно, а именно что аминотрипептидаза быстро действует на трипептиды. Испытаны главным образом трипептиды глицина, аланина и лейцина (см. соединения 265, 269, 271, 273, 277, 289, 290 и 304), а так как трипептиды других аминокислот проверке не подвергались, то мало что можно сказать о специфичности действия этого фермента по отношению к боковым цепям отдельных аминокислот. Небольшую активность, проявляемую в отношении некоторых дипептидов (отмечена в табл. 11 знаком ±), возможно, следует объяснить присутствием следов других ферментов, так как трипептидаза еще не была получена в чистом виде. Для действия этого фермента необходимо наличие как свободной α-аминогруппы (ср. соединения 265 и 266, 277 и 279), так и свободной α-карбоксильной группы (ср. соединения 265 и 379), и он является специфичной трипептидазой. Его называют, однако, «аминотрипептидазой», а не «карбокситрипептидазой», потому что он отщепляет аминокислоту с N-конца [795]. Фер-

мент стереохимически специфичен по отношению к L-изомерам аминокислот во всех трех положениях; эта стереоспецифичность является абсолютной для N-концевого остатка (ср. соединения 273 и 274, 277 и 278), очень высокой для среднего остатка (ср. соединения 304 и 305) и наименьшей для С-концевого остатка (ср. соединения 269 и 270). В расщепляемой пептидной связи должен присутствовать атом водорода (ср. соединения 273, 294 и 362), тогда как в пептидной связи, находящейся справа от расщепляемой связи, его присутствие не обязательно (ср. соединения 265 и 267). Свободная аминогруппа должна находиться в α-положении (ср. соединения 273 и 275). Фермент не обладает амидазной активностью, и сомнительно, чтобы он обладал эстеразной активностью [2438].

Глицилглицин-дипептидаза

Этот фермент испытан с еще меньшим числом субстратов, нежели предыдущий. Наилучшим субстратом оказался глицилглицин. По-видимому, фермент обладает высокой специфичностью по отношению к этому дипептиду, так как он не гидролизует такие близкородственные дипептиды, как глицилаланин или аланилглицин, и такие амиды, как амид глицина. По характеру своего действия фермент является истинной дипептидазой, поскольку он действует только на дипептиды, содержащие свободную α-аминогруппу и свободную α-карбоксильную группу (ср. соединения 27 с 28 и 29; 27 и 263; 27 и 265). В отношении глицилглицин-дипептидазы не возникает вопроса об оптической специфичности. Для действия фермента важно, чтобы водород пептидной связи оставался незамещенным (ср. соединения 27 и 30); однако при замене метильной группой одного атома водорода в аминогруппе (но не обоих атомов) субстрат сохраняет способность гидролизоваться (ср. соединение 27 с 68 и 69).

Иминодипептидаза

Установлено, что этот фермент действует только на дипептиды, содержащие пролин или оксипролин [564]. По-видимому, он представляет собой дипептидазу и не действует на трипептиды, содержащие пролин (см. соединения 289, 290 и 362). Лучшие субстраты имеют иминокислоту в N-концевом положении (см. соединения 180, 181, 187—191, 194 и 195), но она может занимать также и С-концевое положение (см. соединение 52). Амиды иминокислот не расщепляются (см. соединения 179 и 186). Фермент не гидролизует пептиды, содержащие остатки аспарагиновой или глутаминовой кислоты (см. соединения 185, 192 и 193). Наличие в остатке оксипролина свободной гидроксильной группы не является обязательным; эта группа может быть замещена или перемещена в другое положение; пептид при этом не утрачивает способности гидролизоваться (ср. соединение 187 с 194 и 195).

Имидодипептидаза

Этот фермент отличается от рассмотренных выше пептидаз тем, что он гидролизует только имидные связи, образованные α-карбоксильной группой аминокислот и иминогруппой циклической иминокислоты — пролина или оксипролина; нормальные пептиды этих иминокислот не расщепляются (см. соединения 179, 180, 186 и 187). Типичным субстратом для имидодипептидазы служит глицил-L-пролин (соединение 52). Фермент представляет собой специфичную дипептидазу и действует лишь при наличии у соседних аминокислотных остатков свободной α-карбоксильной группы и свободной α-аминогруппы (ср. соединения 52 и 54, 182 и 183, 52 и 271, 362). Он специфичен по отношению к L-форме иминокислоты (ср. соединения 52 и 53).

Введение гидроксильной группы, т. е. замена пролина оксипролином, снижает скорость расщепления субстрата (ср. соединения 52 и 55, 182 и 184). Метилирование гидроксильной группы вызывает еще более заметное снижение скорости (см. соединение 57). Перемещение гидроксильной группы на другую сторону кольца частично снимает ее «тормозящее» действие (см. соединение 58). На основании этого было высказано предположение [2443], что фермент соединяется только с одной плоскостью пирролидинового кольца. Особенно интересно отметить, что если пептид содержит имидную связь, то присутствие пирролидинового кольца не является обязательным. Так, например, фермент гидролизует глицилсаркозин, хотя он и не расщепляет глицилглицин (ср. соединения 27 и 30).

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 даже 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 сродство). Для действия других пептидаз необходимо наличие в молекуле субстрата пирролидинового кольца иминокислоты. По крайней мере в одном случае (лейцинаминопептидаза) для действия фермента требуется, чтобы в молекуле субстрата имелась углеводородная цепь, за счет которой, по-видимому, осуществляется ван-дерваальсово взаимодействие между ферментом и субстратом.

Если указанные выше требования выполнены, то природа гидролизуемой связи не всегда имеет решающее значение. Во многих случаях 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. Так, пептидазы, гидролизующие эфиры и амиды, катализируют также реакции транспептидирования ацильного типа [325, 793]. С другой стороны, пепсин катализирует транспептидирование типа аминопереноса на свободные карбоксильные группы акцепторов [1953].

ЛИАЗЫ

Фумаратгидратаза

Этот фермент (4.2.1.2) абсолютно специфичен и действует только на L-малат (прямая реакция) или на фумарат (обратная реакция). Фермент проявляет два типа стереоспецифичности, 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. 13 приведены данные по специфичности фумаратгидратазы, 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 [1746].

Таблица 13

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФУМАРАТГИДРАТАЗЫ

Субстраты	Конкурентные ингибиторы	Неактивные соединения
L-малат Фумарат	D-малат Цитрат D-тартрат L-2-окси-3-сульфопропионат Малеат Мезаконат *транс*-Аконитат Сукцинат Малонат Адипат Глутарат Глицин	L-аспартат D-аспартат Монометиловый эфир фумаровой кислоты Диметиловый эфир фумаровой кислоты Кротонат Ацетоацетат Ацетат Бутират Ацетилендикарбоксилат L-цистеат

Из этой таблицы видно, что для соединения с ферментом молекула вещества должна иметь две кислотные группировки; родственные монокарбоновые кислоты, а также моно- или диэфиры 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 малеат) хотя и не подвергаются превращениям, но довольно прочно соединяются с активным центром фермента и вследствие этого действуют как конкурентные ингибиторы.

Фосфопируват-гидратаза

Этот фермент (4.2.1.11) 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. 14).

Таблица 14

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФОСФОПИРУВАТ-ГИДРАТАЗЫ

Субстраты	Конкурентные ингибиторы	Неактивные соединения
2-фосфо-D-глицерат	3-фосфо-3-оксипропионат	D-лактат
Фосфоенолпируват	2-фосфо-D-лактат	D-глицеральдегид-3-фосфат
	3-фосфо-D-глицерат	
	2-фосфо-D-*эритро*-2, 3-диоксибутират	Диоксиацетонфосфат
	3-фосфо-D-*эритро*-2, 3-диоксибутират	Глицеро-2-фосфат

Гомосериндегидратаза

До недавнего времени считали, что дегидратация гомосерина и расщепление цистатионина на цистеин, оксобутират и аммиак осуществляются различными ферментами. Теперь известно, что эти превращения катализируются одним ферментом (4.2.1.15). Этот фермент получен в кристаллическом виде, и специфичность его изучена весьма детально [1758]. Он отщепляет R — OH- или R — SH-группы от различных аминокислот, содержащих гидроксильные, тиоловые или тиоэфирные группы (табл. 15).

Таблица 15

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГОМОСЕРИНДЕГИДРАТАЗЫ[1])

Аминокислота	Относительная скорость расщепления
L-гомосерин	100
L-цистатионин	80
L-дьенколат	30
L-(и *мезо*-)лантионин	17
L-цистеин	5
L-серин	2
O-ацетил-DL-гомосерин	2
S-карбамидометил-L-цистеин	1
S-карбоксиэтил-L-гомоцистеин	1
D, L-гомоцистеин	0,7

[1]) По отношению к следующим соединениям обнаружили слабую активность (или полное отсутствие активности): L-треонин, L-аллотреонин, D, L-2-амино-5-оксивалерат, D, L-2-амино-6-оксикапронат, 3-окси-D, L-аспартат, 3-окси-D, L-глутамат, 2-амино-2-дезокси-D-глюкоза, S-метил-L-цистеин, S-этил-L-цистеин, L-метионин, D, L-метионин и L-пенициллами́н.

Полагают, что при отщеплении воды от гомосерина и при отщеплении цистеина от цистатионина образуется один и тот же продукт — винилглицин. Затем в результате последующей перегруппировки и гидролиза образуются оксобутират и аммиак.

Еноил-КоА—гидратаза

Этот фермент (L-3-оксиацил-КоА — гидро-лиаза, 4.2.1.17) интересен во многих отношениях [2516]. Он действует только на тиоэфиры соответствующих кислот и КоА и не действует (в отличие от фермента 1.1.1.35) на тиоэфиры более простых аналогов КоА или других тиолов. Он обратимо гидратирует ряд ненасыщенных эфиров КоА с углеводородной цепью различной длины, до C_8; при этом скорость реакции уменьшается по мере увеличения длины цепи (табл. 16).

Таблица 16

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЕНОИЛ-КоА—ГИДРАТАЗЫ[1])

Субстрат	Относительная скорость гидратации
(*транс*-)Кротонил-КоА	100
(*цис*-)Изокротонил-КоА	30
транс-2-пентеноил-КоА	77
цис-2-гексеноил-КоА	20
транс-2-гексеноил-КоА	15
транс-3-гексеноил-КоА	0,86
3-метилкротоноил-КоА	14
цис-2-метилкротоноил-КоА	+
Акрилоил-КоА	+
Винилацетил-КоА	1,5
Метакрилоил-КоА	+
Сорбоил-КоА	+
S-кротоноилпантетоин	0,01

[1]) Знак + означает, что соединение служит субстратом, но скорость гидратации не была определена. Следующие соединения не являются субстратами: кротонат, 4-пентеноил-КоА, 3-окси-4-гексеноил-КоА, малеил-КоА, итаконил-КоА, мезаконил-КоА, *транс*-циннамоил-КоА, фумарат, *цис*-аконитат.

Еноил-КоА — гидратаза — 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-КоА. При гидратации *транс*-ненасыщенных субстратов образуются L-оксиизомеры; 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.

Аспартат — аммиак-лиаза

Другим примером очень специфичной лиазы может служить аспартат — — аммиак-лиаза (4.3.1.1). Этот фермент 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, малеат, моноэтиловый эфир фумаровой кислоты, диамид фумаровой кислоты или диэтиловый эфир фумаровой

кислоты, пируват, кротонат, мезаконат, аконитат, глютаконат, 2,4-гексадиеноат, глицин, аланин, лейцин, фенилаланин, тирозин, гистидин и глутамат [686]. 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.

Альдозомутаротаза

Этот фермент (5.1.3.3) 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 [1368, 1369, 1567]. Результаты этих работ приведены в табл. 17, 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 17

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АЛЬДОЗОМУТАРОТАЗ

Соединение	Относительная скорость мутаротаций		
	неферментативная реакция [1368, 1567]	мутаротаза из *Penicillium* (pH 4,7) [1567]	мутаротаза из почки (pH 7,1) [1368, 1369]
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-дезокси-D-глюкоза	112	0	
D-арабиноза	420		0
L-рамноза	420		0
3-метил-D-глюкоза			0
Сахароза	0		0
Раффиноза	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 конфигурацией 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 мутаротазой.

ФЕРМЕНТЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ НА СУБСТРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ УГЛЕВОДОРОДНЫЕ ЦЕПИ

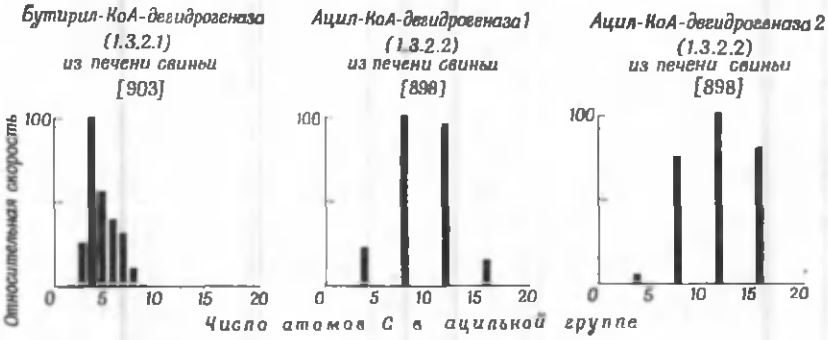
Если фермент действует на субстрат, содержащий алкильную цепь с более чем одним или двумя углеродными атомами, то длина цепи обычно не имеет решающего значения и фермент может действовать на ряд гомологичных субстратов. В этом случае интересно исследовать влияние длины цепи на скорость ферментативной 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 фиг. 69.

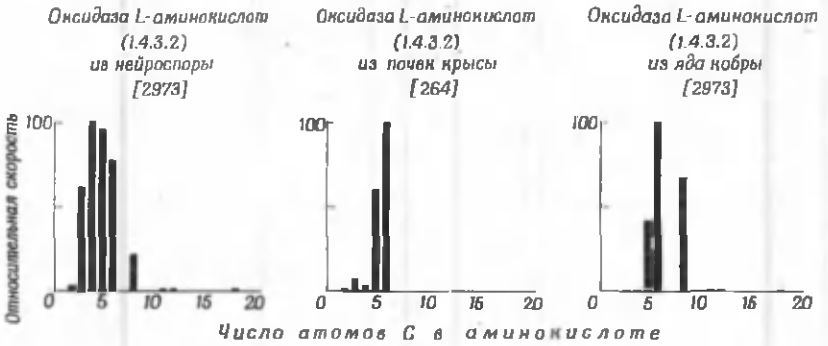
Эта фигура иллюстрирует ряд общих черт, обнаруживающихся при изучении данной зависимости. Во всех случаях наблюдается более или менее определенная зависимость между скоростью катализируемой ферментом реакции и длиной цепи. В большинстве случаев имеется некоторая оптимальная для действия фермента длина цепи; вероятно, такой оптимум мог бы быть найден для всех ферментов, если бы наши данные в этой области были достаточно полными. Как видно из фиг. 69, 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 высшие члены одной и той же серии субстратов (ср., например, дегидрогеназы 1.3.2.1 и 2, а также синтетазы 6.2.1.2 и 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 2.3.1.15).

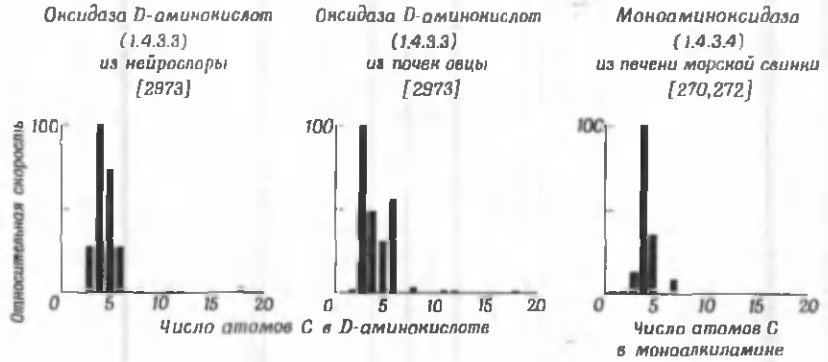
Общие выводы

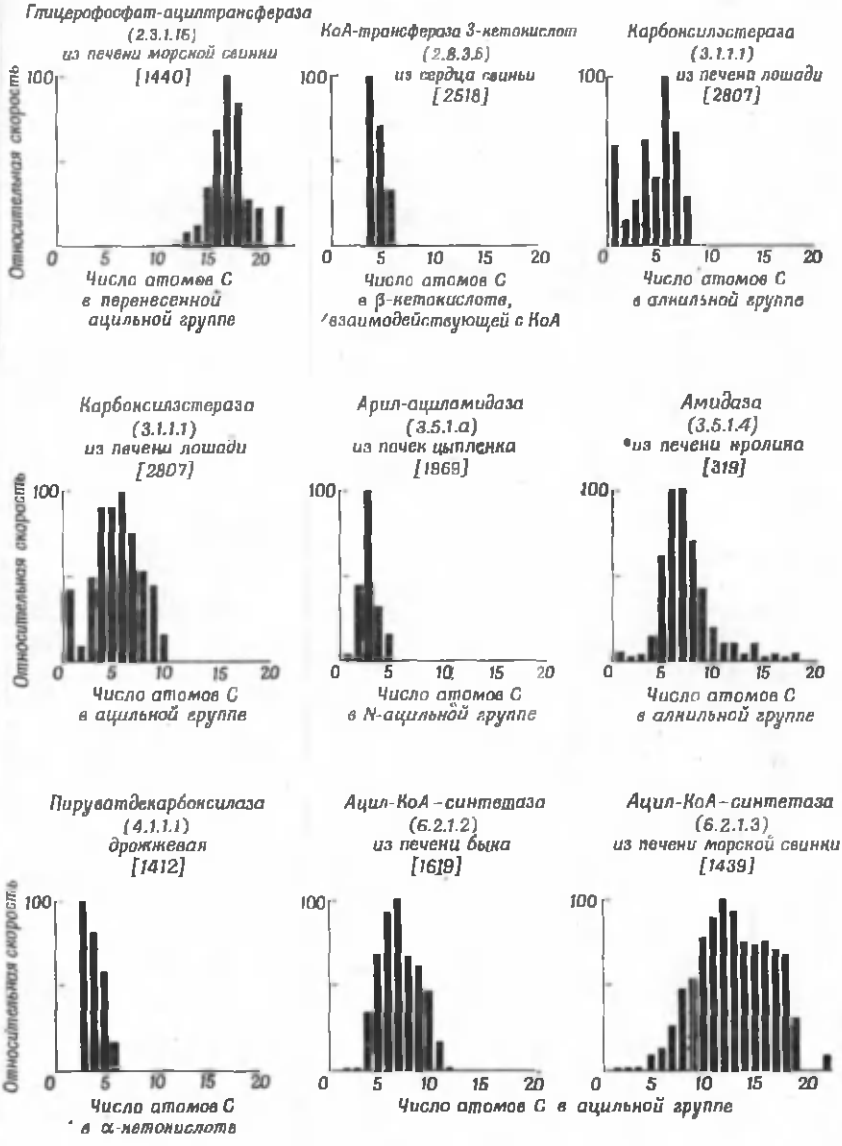
Явление специфичности ферментов проливает свет на механизм взаимодействия фермента с субстратом, и всякая теория ферментативного действия должна учитывать экспериментальные данные по изучению специфичности. В большинстве случаев, для того чтобы вещество могло соединиться с активным центром данного фермента, 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 НАД, относятся к высокоспецифичным.

Связывание высокоспецифичных ферментов со своими субстратами, имеющими сложную структуру (т. е. большое число функциональных


Бутирил-КоА-дегидрогеназа
(1.3.2.1)
из печени свиньи
[903]
Ацил-КоА-дегидрогеназа 1
(1.3.2.2)
из печени свиньи
[898]
Ацил-КоА-дегидрогеназа 2
(1.3.2.2)
из печени свиньи
[898]
Относительная скорость
100
0
5
10
15
20
Число атомов С в ацильной группе


Оксидаза L-аминокислот
(1.4.3.2)
из нейроспоры
[2973]
Оксидаза L-аминокислот
(1.4.3.2)
из почек крысы
[264]
Оксидаза L-аминокислот
(1.4.3.2)
из яда кобры
[2973]
Относительная скорость
100
0
5
10
15
20
Число атомов С в аминокислоте


Оксидаза D-аминокислот
(1.4.3.3)
из нейроспоры
[2973]
Оксидаза D-аминокислот
(1.4.3.3)
из почек овцы
[2973]
Моноаминоксидаза
(1.4.3.4)
из печени морской свинки
[270,272]
Относительная скорость
100
0
5
10
15
20
Число атомов С в D-аминокислотах
Число атомов С
в моноалкиламине



Фиг. 69. Влияние длины алкильных и ацильных группировок в субстрате на скорость различных ферментативных реакций.

Во всех случаях использованы субстраты типа $CH_3(CH_2)_nX$. Активность выражена в процентах от скорости, полученной с наилучшим субстратом.

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 (см. стр. 181). Как мы увидим в следующей главе, во многих теориях ферментативного действия постулируется деформация молекулы 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 обусловливать 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 ван-дер-ваальсовым силам. Наконец, в немногих случаях (см., например, пероксидазы) соединение обусловливается образованием координационной связи между субстратом и атомом металла в молекуле фермента.

ГЛАВА VII

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Можно без преувеличения сказать, что наиболее фундаментальной проблемой энзимологии является выяснение механизма действия ферментов. Ферменты — превосходные катализаторы, осуществляющие (во многих случаях с большой скоростью и со 100%-ным выходом) такие химические реакции, которые трудно осуществить в лаборатории, а потому механизм их действия в равной мере интересует и химика и биолога. Однако эта область исследования представляет очень большие трудности, и, хотя в ней уже достигнуты некоторые успехи, предстоит еще сделать очень многое. Только в последние годы были разработаны эффективные методы, позволяющие получить определенные сведения о механизме действия ферментов.

То обстоятельство, что процесс ферментативного катализа зависит от *соединения субстрата с ферментом*, *стало ясным уже при изучении* кинетики действия ферментов в то время, когда ни один фермент еще не был выделен в чистом виде. Вопросы, связанные с кинетикой действия ферментов, довольно подробно рассмотрены в гл. IV, и поэтому мы их больше касаться не будем. Здесь мы рассмотрим природу взаимодействия фермента и субстрата, влияние этого взаимодействия на субстрат и механизм ферментативного катализа. В основе всех выдвинутых теорий лежит одна общая идея, а именно представление *о том, что соединение с ферментом* вызывает известного рода «активацию» молекулы субстрата вследствие поляризации, смещения электронов или деформации связей, вовлекаемых в реакцию.

В последнее время выражение «механизм ферментативной реакции» применяется для характеристики ферментативного процесса в том смысле, о котором мы говорили на стр. 103, т. е. для характеристики порядка соединения реагирующих веществ с ферментом, числа и последовательности образования промежуточных комплексов и порядка диссоциации продуктов. *Очевидно, что такое ограничение понятия является* искусственным, поскольку истинное понимание механизма включает не только данные о последовательности превращений, но также и выяснение причин, обусловливающих протекание реакций.

В первом издании этой книги был рассмотрен ряд гипотез, предложенных для объяснения механизма действия ферментов. Все они касаются действия определенных групп ферментов. Поскольку многие из этих гипотез *представляют в настоящее время лишь исторический интерес*, в этом новом издании мы их рассматривать не будем. Во всех гипотезах постулируется некоторое изменение молекулы субстрата при соединении с химическими группировками активного центра фермента. В числе причин повышения реакционной способности указываются напряжение, растяжение или поляризация связей, а также инициирование цепных реакций путем образования свободных радикалов. Одна из любопытных гипотез основывается на аналогии с неферментными «бифункциональными *катализаторами*»; эта гипотеза исходит из согласованной атаки субстрата электрофильной и нуклеофильной группами фермента [2578].

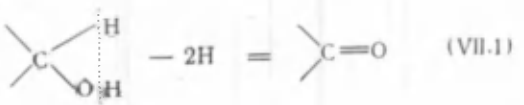
Общей теории, которая описывала бы процесс активации под действием ферментов, пока не существует, однако в гл. V мы отмечали, что, хотя ферменты катализируют множество реакций, число *типов* реакций очень невелико и фактически свыше 90% известных ферментов могут рассматриваться как катализаторы реакций переноса. Весьма возможно поэтому, что процессы активации, осуществляемые различными ферментами, имеют много общего и что, следовательно, нет причин, препятствующих разработке общей теории активации в свете достижений современной физической химии органических соединений.

Вместе с тем необходимо подчеркнуть и опасность упрощенного представления. Не следует думать, что если какая-либо неферментативная реакция протекает по какому-то определенному пути, то по этому же пути должна протекать и соответствующая ферментативная реакция. Механизмы ферментативных и неферментативных реакций могут быть совершенно различными.

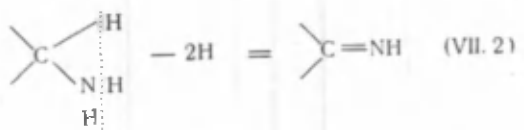
В данной главе мы рассмотрим новейшие экспериментальные методы, используемые для изучения механизма действия ферментов, а также результаты, которые были получены с помощью этих методов.

Механизм реакций переноса водорода

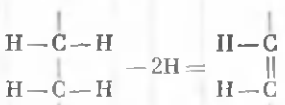
Как отметил много лет назад Виланд, подавляющее большинство процессов биологического окисления — это, в сущности, процессы дегидрогенирования, заключающиеся в удалении двух атомов водорода и соответствующем перемещении связей в молекуле. К числу типичных реакций (многочисленные примеры таких реакций можно найти в группе 1 Списка ферментов) относятся следующие:



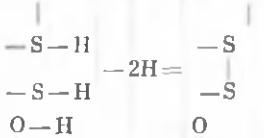
(VII.1)



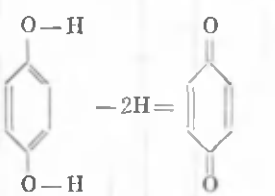
(VII.2)



(VII.3)



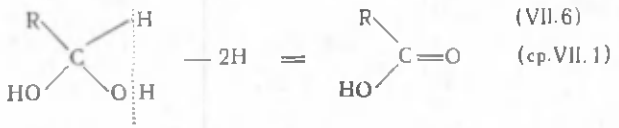
(VII.4)



(VII.5)

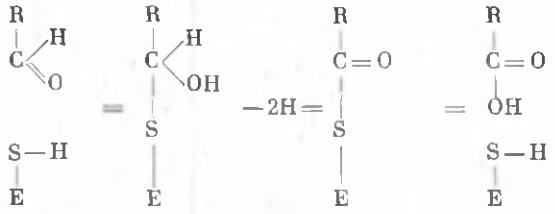
Реакция (VII.2) катализируется, как полагают, оксидазами аминокислот; в качестве первичного продукта образуется иминокислота, которая затем превращается в кетокислоту и аммиак.

Даже окисление альдегидов, которое на первый взгляд представляется реакцией другого типа, почти с полной уверенностью можно считать дегидрогенированием. Альдегиды существуют в водных растворах главным образом в форме гидратов и могут реагировать в этой форме следующим образом:



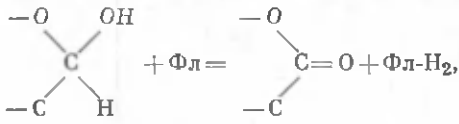
(VII.6)
(ср. VII.1)

В некоторых случаях, в частности в ферментативных реакциях с участием глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы, окисление осуществляется, *как предполагают, путем дегидрогенирования соединения, в котором альдегид* связан с SH-группой фермента:



(VII.7)

Во многих окислительных системах субстраты не окисляются непосредственно молекулярным кислородом, а вместо этого происходит перенос водорода через одно или несколько промежуточных соединений (коферменты, флавины и т. п), которые действуют как переносчики. Например, реакция, катализируемая глюкозооксидазой (1.1.3.4),



(VII.8)

$$Фл\text{-}H_2 + O_2 = Фл + H_2O_2 \qquad (VII.9)$$

(на схеме представлена только непосредственно относящаяся к реакции часть молекулы β-глюкозы; Фл — флавиновая простетическая группа фермента), наиболее легко интерпретируется как перенос двух атомов водорода от глюкозы на флавиновую группу и уже оттуда на молекулярный кислород.

Эти превращения породили терминологию, берущую за основу водород; при этом окисляемое вещество (глюкоза в первой реакции и флавин во второй) называют донором водорода, окисляющий агент (флавин в первой реакции и O_2 во второй) — акцептором водорода, флавин — переносчиком водорода, а весь процесс в целом — переносом водорода.

Позднее, однако, появилась и вошла в довольно широкое употребление другая терминология, которая берет за основу перенос электронов от одной молекулы к другой. В этом случае переносчики водорода рассматриваются как переносчики электронов, реагенты называются донорами или акцепторами электронов и процесс в целом именуется переносом электронов. Причины появления этой новой терминологии не совсем ясны и, как нам кажется, не содержат ничего конкретного [1]. Главная из них состоит, по-видимому, в том, что во многих дыхательных системах участвует цитохром. Окисление цитохрома связано с изменением валентности атома железа, и, хотя механизм этого процесса еще не известен, представляется заманчи-

[1] Мы не будем придерживаться здесь «электронной» терминологии, ибо считаем, что она способна ввести в заблуждение.

вым считать его аналогичным механизму окисления свободных ионов двухвалентного железа, который наиболее просто можно представить как удаление электрона:

$$Fe^{2+} - e = Fe^{3+}. \qquad (VII.10)$$

Желание иметь единую теорию, описывающую механизм процессов биологического окисления, побудило многих исследователей распространить это допущение также и на дегидрогеназные реакции.

Необходимо, однако, признать, что в приложении к дегидрогенированию органических соединений данная концепция представляется весьма искусственной. Согласно этой концепции, такая реакция переноса водорода, как

$$AH_2 + B = A + BH_2, \qquad (VII.11)$$

состоит из следующих стадий:

$$AH_2 = A^{2-} + 2H^+, \qquad (VII.12)$$

$$A^{2-} + B = A + B^{2-}, \qquad (VII.13)$$

$$B^{2-} + 2H^+ = BH_2. \qquad (VII.14)$$

Оба водородных атома, участвующие в реакции, вначале диссоциируют с образованием ионов водорода. При этом образуется анион донора; в этой форме донор и реагирует. Затем анион передает два электрона на B, и образующийся анион B^{2-} присоединяет два иона водорода с образованием BH_2. Легко заметить, что этот процесс представляет собой не только перенос электронов, но также и перенос протонов в том же самом направлении. От классического представления о переносе водорода он отличается в двух отношениях: а) электроны и протоны переносятся раздельно, а не вместе в форме водородных атомов, б) водородные атомы в продукте реакции BH_2 не обязательно те самые, которые первоначально присутствовали в AH_2,— они могут вести свое происхождение и от воды.

Этим путем действительно можно объяснить окисление небольшого числа веществ, таких, как дифенолы (реакция VII.5), у которых оба участвующих в реакции водородных атома обнаруживают слабовыраженные кислотные свойства. Однако в большинстве случаев водородные атомы, участвующие в процессах биологического окисления, не обнаруживают никаких кислотных свойств; поэтому и нет причин постулировать образование аниона на первой стадии процесса.

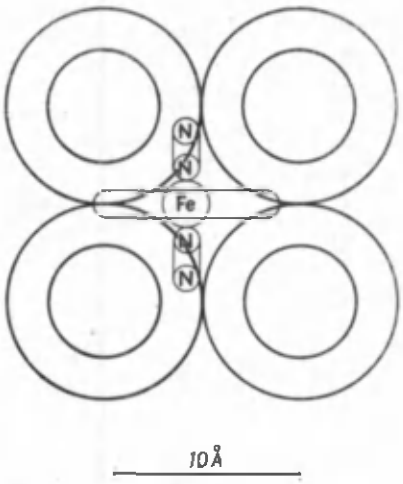
Более того, есть все основания сомневаться и в том, что окисление и восстановление цитохрома происходит путем простого удаления или присоединения электронов. Состояние атома железа в таких гемопротеидах, в которых он соединен ковалентными связями с шестью азотсодержащими кольцевыми структурами, значительно отличается от состояния свободных ионов двухвалентного и трехвалентного железа, и нет необходимости предполагать, что один и тот же механизм действует в обоих случаях. Измерения окислительно-восстановительных потенциалов показывают, что при значениях pH, сдвинутых в щелочную сторону от $\sim 7{,}5$, заряд молекулы цитохрома *c* при восстановлении не изменяется, как это должно было быть в том случае, если бы процесс представлял собой простое присоединение электрона к атому железа (хотя в кислом растворе и происходит изменение заряда). Выраженные изменения спектра поглощения при восстановлении показывают, что в процессе участвует система сопряженных двойных связей гематиновой структуры. Следовательно, изменение, вероятно, не является таким простым, каким оно может показаться с первого взгляда. Необходимо признать, что природа процесса, в ходе которого про-

исходят окисление и восстановление цитохрома, остается еще в значительной степени неясной.

Заслуживает обсуждения следующий механизм окисления соединений железа:

$$RFe^{2+} : OH_2 — H = RFe^{3+} : OH^-, \qquad (VII.15)$$

где одна из групп, с которой железо связано координационной связью, представлена молекулой воды. Этот механизм, возможно, действует и при превращении ионов. Ионы двухвалентного и трехвалентного железа в растворе не находятся в свободном состоянии, а соединены с водой ($Fe^{3+}(OH_2)_6$), так что в действительности они окружены оболочкой из атомов водорода.



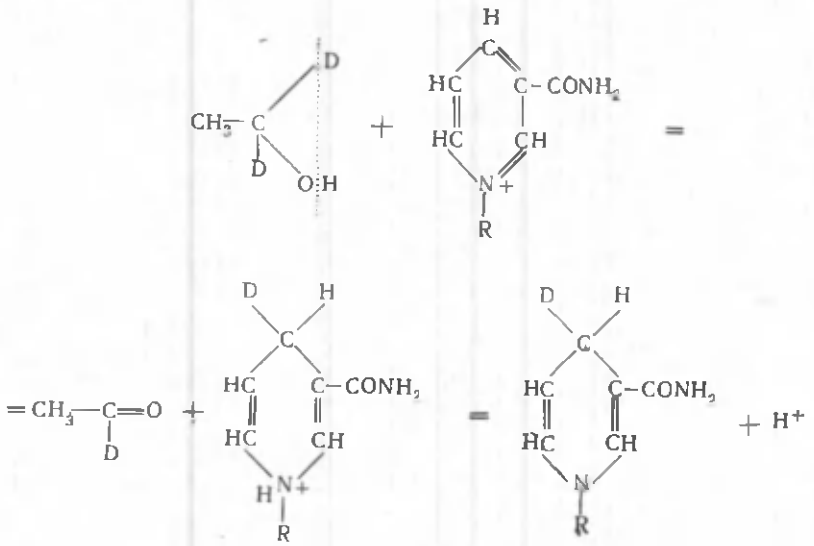
Фиг. 70. Схема строения цитохрома *c* по Эренбергу и Теороллу [679].

Теорелл [2627] предположил, что восстановление цитохрома *c* осуществляется путем гидрирования одной из имидазольных групп, которые связаны координационными связями с железом, и последующего перераспределения заряда между этим кольцом и атомом железа. Тот или иной механизм подобного рода представляется совершенно необходимым в свете данных по структуре цитохрома *c*, полученных Эренбергом и Теореллом [679] (фиг. 70). На фиг. 70 показан гем, плотно упакованный между четырьмя спиральными пептидными цепями; атом железа находится в центре порфиринового диска, который располагается под прямым углом к гистидиновым остаткам в молекуле белка, лежащим над и под этим атомом. Теорелл считает, что железо тем самым предохраняется от прямой атаки со стороны окисляющих агентов; он предполагает, что местом атаки служит атом азота самого верхнего гистидинового остатка, представляющий собой наиболее доступную точку. Гистидин действует как переносчик между восстанавливающими или окисляющими молекулами и атомом железа; вероятно, в этом процессе участвует его система сопряженных двойных связей. Истинный механизм процесса пока не известен.

Вопрос о том, как осуществляются реакции дегидрогенирования — путем переноса электронов или путем переноса водорода,— оставался открытым до 1953 г., когда Веннесланд и его сотрудники начали серию исследований при помощи изотопных методов с использованием дейтерия. Они получили убедительные доказательства того, что ряд окислительных реакций, катализируемых дегидрогеназами и сходными ферментами, осуществляется путем прямого переноса атомов водорода.

Работа основывалась на приведенном выше анализе процесса дегидрогенирования, согласно которому при переносе водорода атомы H, находимые в продукте, представляют собой те самые атомы, которые были удалены из молекулы донора (напомним, что, согласно концепции, рассматривающей восстановление как перенос электронов, водородные атомы продукта реакции, как правило, ведут свое происхождение от воды).

В опытах Фишера и др. [742] этанол, меченный дейтерием по первому углеродному атому (CH_3CD_2OH), использовался в качестве субстрата для алкогольдегидрогеназы (1.1.1.1). Протекающая при этом реакция может быть представлена следующим образом:



(VII.16)

где R — остаток молекулы НАД. В этих опытах НАД был выделен в восстановленной форме (мы будем обозначать ее через НАД·H_2). При этом обнаружилось, что он содержит один атом дейтерия на молекулу, так же как и образовавшийся ацетальдегид. Содержащий дейтерий восстановленный НАД (который мы будем обозначать через НАД·HD) мог быть затем вновь окислен либо алкольдегидрогеназой (за счет ацетальдегида), либо лактатдегидрогеназой (за счет пирувата). В обоих случаях весь дейтерий удалялся из НАД·HD, а лактат, образовавшийся из пирувата, содержал один атом дейтерия на молекулу.

На основании этих наблюдений можно сделать ряд интересных заключений:

1. Данная реакция осуществляется путем прямого переноса атомов водорода (или дейтерия) от одной молекулы к другой; так как реакция проводилась в H_2O, а не в D_2O, то перенос электронов, если бы он имел место, должен был бы сопровождаться поглощением ионов водорода, а не ионов дейтерия. Первоначально атомы дейтерия имелись только в субстрате, и эти атомы были перенесены на НАД без прохождения какой-либо стадии, на которой они могли бы быть обменены на ионы или атомы водорода.

2. Относительная ориентация субстрата и кофермента во время реакции всегда сохраняется неизменной; атом водорода (или дейтерия), присоединенный к углероду, всегда переносится в положение 4 кольца НАД, а водород гидроксила всегда присоединяется к азоту и никогда наоборот. Если бы некоторые молекулы реагировали иным образом, то атомы, переносимые к азоту, должны были бы теряться в результате ионизации и содер-

жание дейтерия в восстановленном коферменте было бы меньше, чем один атом на молекулу.

3. Реакция характеризуется стереохимической специфичностью, т. е. в ней участвует только одна сторона кольца НАД. Связи, соединяющие атомы D и H с углеродом кольца НАД, образуют прямой угол с плоскостью кольца. Чтобы нагляднее представить себе это, допустим, что плоскость кольца совпадает с плоскостью чертежа; в таком случае атом D будет расположен под кольцом, а атом H над ним. Мы можем представить себе дело таким образом, что этанол и НАД располагаются рядом на молекуле фермента и взаимодействуют между собой. Одна сторона никотинамидного кольца обращена при этом к субстрату, а повороту кольца препятствует взаимодействие его амидной группы с ферментом; в результате атомы H или D из молекулы этанола всегда переходят в определенное положение в кольце (см. ниже). Если бы амидная группа отсутствовала, так что обе стороны кольца были бы эквивалентными, или если бы субстрат мог реагировать с любой из сторон кольца, то в восстановленном НАД атомы D были бы равномерно распределены между двумя возможными положениями и только половина дейтерия могла бы быть удалена при последующем ферментативном окислении. Другими словами, дейтерий «разбавлялся» бы водородом, уже присоединенным ранее к углеродному атому в положении 4. Тот факт, что удаляется весь дейтерий, показывает, что он сосредоточен только в одном положении. Интересно, что если НАД восстанавливается неферментативным путем, а именно гидросульфитом в D_2O, то восстановленный НАД также содержит один атом D на молекулу, но дейтерий распределяется в этом случае между двумя положениями [1]. Если такой НАД·HD, меченный в обоих положениях, окисляется затем пируватом при участии лактатдегидрогеназы, то удаляется только около половины дейтерия, и это свидетельствует о том, что ферментативная реакция затрагивает только одно положение.

4. Субстраты обеих дегидрогеназ (алкоголь- и лактатдегидрогеназы) реагируют с одной и той же стороной кольца, так что атомы D, присоединившиеся в результате действия одной из этих дегидрогеназ, могут быть удалены под действием другой. Однако не все дегидрогеназы реагируют с одной и той же стороной никотинамидного кольца; многие из них реагируют с противоположной его стороной. В системе, содержащей две дегидрогеназы и НАД вместе с меченым восстановленным субстратом одной из этих дегидрогеназ и окисленным субстратом другой, дейтерий будет переноситься от одного субстрата к другому, если оба фермента реагируют с одной и той же стороной никотинамидного кольца, но он будет задерживаться в молекуле кофермента, если дегидрогеназы реагируют с противоположными сторонами. Это вооружает нас удобным методом для выяснения вопроса о том, к какой из двух групп принадлежит исследуемая дегидрогеназа.

Для форм НАД·HD, которые образуются при действии алкогольдегидрогеназы и β-оксистероид-дегидрогеназы, были предложены обозначения «форма А» и «форма В» [2] соответственно. С помощью фосфатазы, которая

[1] Правда, даже и при неферментативном восстановлении НАД (в противоположность тому, что наблюдается при восстановлении простых никотинамидных соединений) распределение дейтерия между обоими положениями не бывает совершенно одинаковым. Из наблюдений Пулмена и др. [2125] и Фишера и др. [742] следует, по-видимому, что при восстановлении НАД гидросульфитом в D_2O всегда образуется больше «формы А» (см. ниже), нежели «формы В», хотя точное соотношение количеств двух образующихся форм разными авторами оценивается по-разному.

[2] Позднее другие исследователи [656, 1571] пользовались такими обозначениями, как «α- и β-конфигурации», «α- и β-стороны» и «α- и β-положения». Мы предпочитаем говорить о «форме А» и «форме В», как было предложено первоначально, чтобы не путать эти обозначения с α- и β-изомерами коферментов (см. гл. IX) или с обозначением определенных атомов углерода.

отщепляет 2′-фосфатную группу НАДФ без изменения конфигурации кольца, две формы НАДФ·HD могут быть сопоставлены с соответствующими формами НАД·HD. Из формы А НАДФ·HD образуется форма А НАД·HD; следовательно, формы А обоих коферментов имеют одинаковую конфигурацию [1921]. Абсолютная конфигурация форм А и В была определена Корнфортом и др. [2977]. Если молекулу расположить так, как показано в реакции (VII.16), то у формы А атом D будет находиться над плоскостью бумаги, а атом H — под ней.

В табл. 18 указаны формы восстановленных коферментов, образуемые теми ферментами, которые были изучены в этом отношении к настоящему времени.

Таблица 18

СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НАД И НАДФ
[658, 1251, 1576, 1714, 1921, 2514]

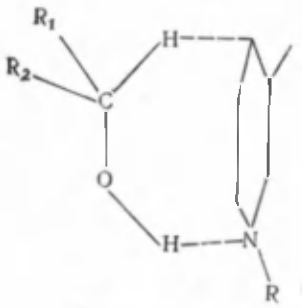
Образует указанную форму с НАД		Образует указанную форму с НАДФ	
1. Ферменты, образующие форму А			
1.1.1.1	Алкогольдегидрогеназа (печень)	1.1.1.42	Изоцитратдегидрогеназа (сердце)
1.1.1.27	L-лактатдегидрогеназа (сердечная мышца)		
1.1.1.28	D-лактатдегидрогеназа		
1.1.1.29	Глицератдегидрогеназа (шпинат)		
1.1.1.37	Малатдегидрогеназа (сердце, зародыш пшеницы)		
1.2.1.3	Альдегиддегидрогеназа (печень)		
1.3.3.1	Дигидрооротатдегидрогеназа (бактерии)		
1.6.2.2	НАД·H_2-цитохром-b_5-редуктаза (печень)		
2. Ферменты, образующие форму В			
1.1.1.8	Глицерофосфатдегидрогеназа (мышца)	1.1.1.44	Фосфоглюконатдегидрогеназа (дрожжи)
1.1.1.35	3-оксиацил-КоА-дегидрогеназа (сердце)	1.1.1.49	Глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназа (дрожжи)
1.1.1.47	Глюкозодегидрогеназа (печень)		
1.1.1.50	3-α-оксистероид-дегидрогеназа (бактерии)		
1.1.1.i	Эстрадиол-17-β-дегидрогеназа (плацента)		
1.1.1.51	β-Оксистероид-дегидрогеназа (бактерии)		
1.2.1.12	Глицеральдегидрофосфат-дегидрогеназа (дрожжи, мышца)		
1.4.1.3	Глутаматдегидрогеназа (печень)	1.4.1.3	Глутаматдегидрогеназа (печень)
1.6.1.1	НАД(Ф)-трансгидрогеназа (бактерии)		
1.6.2.1	НАД·H_2-цитохром-c-редуктаза (печень, сердце)		
1.6.4.2	Глутатионредуктаза (дрожжи, бактерии)	1.6.4.2	Глутатионредуктаза (дрожжи, бактерии)

Отметим, что в этой таблице только два фермента помещены одновременно в двух колонках; это ферменты, которые могут функционировать как с одним, так и с другим коферментом и которые, как этого и следовало ожидать, образуют с обоими коферментами одинаковые формы. Если фермент действует на ряд субстратов (примером может служить алкогольдегидрогеназа), то он всегда образует одну и ту же форму НАД·HD (независимо от того, из какого источника этот фермент получен).

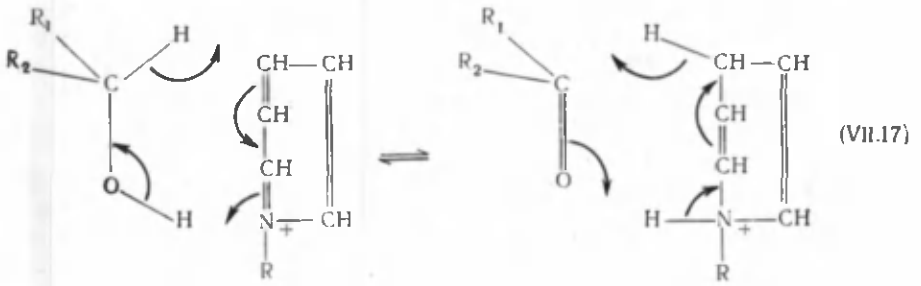
Специфичность фермента 1.6.1.1 охарактеризована для реакции восстановления НАД. Было бы интересно выяснить, с какой стороной нико-

тинамидного кольца НАДФ·H_2 реагирует НАД; если оба кофермента располагаются «бок о бок», то следовало бы ожидать, что сторона А НАДФ·H_2 будет реагировать со стороной В НАД.

Фактором, определяющим, какая именно сторона кольца участвует в реакции, должно быть относительное расположение молекул субстрата и кофермента у активного центра фермента; корреляции со структурой субстрата или характером окислительного процесса обнаружить не удалось.



Если изобразить реагирующие группы, соблюдая правильную длину связей, то легко понять, как может осуществляться типичная дегидрогеназная реакция. Допустим, что мы смотрим сверху вниз на поверхность молекулы фермента и что реагенты расположены рядом таким образом, что их активные группы взаимодействуют. Предполагается, что никотинамидное кольцо кофермента, плоскость которого на схеме перпендикулярна плоскости чертежа, одной своей стороной обращено к субстрату и не может повернуться из-за наличия амидной группы. Оба водородных атома СНОН-группы субстрата оказываются в таком случае недалеко от тех положений, которые они займут в молекуле восстановленного кофермента. Следовательно, требуется только перераспределение электронов для того, чтобы переместить оба водородных атома от субстрата к коферменту и наоборот. Можно, вероятно, представить активированный комплекс как стабилизированную резонансом структуру, в которой водородные атомы поделены между субстратом и коферментом и которая может распадаться любым способом, т. е. либо на субстрат и кофермент, либо на окисленный субстрат и восстановленный кофермент. Легко объясняется, следовательно, обратимость реакции; вообще этот механизм просто и удовлетворительно объясняет наблюдаемые особенности дегидрогеназных реакций.



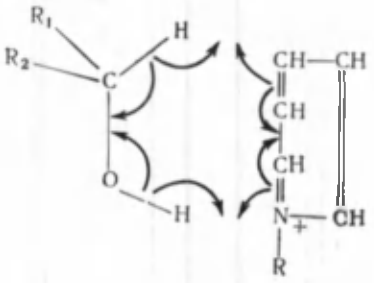
(VII.17)

Предполагаемое перераспределение электронов имеет много общего с механизмом «согласованного замещения» Швайна и Брауна, упоминавшимся ранее в этой главе. Таким путем удается объяснить одновременный перенос двух водородных атомов.

На приведенной выше схеме кривыми стрелками показано перемещение пар электронов согласованно по кругу в одном направлении. Альтернативное представление, в пользу которого также можно привести определенные соображения, предполагает, что одна половина электронов движется по часовой стрелке, а другая половина — против часовой стрелки.

Здесь стрелки показывают движение одиночных электронов (в этом случае ток по кольцу не идет). Разумеется, получить экспериментальные данные, позволяющие сделать выбор между этими двумя представлениями, было бы чрезвычайно трудно.

Интересно отметить, что вообще в дегидрогеназных реакциях расстояние между обоими удаляемыми водородными атомами субстрата приблизительно такое же, как в рассматриваемой схеме.



Опыты с дейтерием ясно показали, что реакции биологического дегидрогенирования, катализируемые связанными с коферментом дегидрогеназами, осуществляются путем переноса атома водорода, а не путем переноса пары электронов, как предполагают многие исследователи, введенные в заблуждение «электронной» терминологией.

Высказывались отдельные предположения о том, что рассматриваемые реакции могут протекать путем переноса отрицательно заряженного иона водорода H^-; однако мы не располагаем доказательствами того, что так обстоит дело при какой-либо ферментативной реакции. Все эти предположения, по-видимому, исходят в конечном счете из предположения Хаммета [988] о том, что реакция Канниццаро для альдегидов в щелочном растворе (при которой, как было доказано опытами с дейтерием, происходит перенос атома водорода от одной молекулы альдегида на другую без обмена с растворителем) протекает путем переноса иона H^- от анионной формы альдегида. Однако Хаммет указывает только, что рассматриваемое явление «согласуется» с этим механизмом; Ингольд же отмечает [1211, стр. 708], что возможны и другие механизмы, особенно для гетерогенных реакций. Верно, что при восстановлении НАД к нему присоединяются *компоненты* иона H^- (т. е. один протон и два электрона), если иметь в виду суммарную реакцию, включающую ионизацию восстановленной формы кофермента. Но это еще не означает, что они переносятся как одно целое; кроме того, вообще нельзя делать заключения о механизме реакций только по уравнениям суммарных реакций.

Некоторые авторы ссылаются на результаты опытов по восстановлению органических веществ с помощью $LiAlH_4$ в абсолютном эфире; по их мнению, эти опыты подтверждают данный механизм, т. е. перенос иона H^-. Примером, более всего напоминающим восстановление кофермента, может служить восстановление хинолинметиодида до 1,2-дигидрохинолина — очень нестойкого вещества, которое может быть выделено лишь при полном отсутствии кислорода [2333]. Шмид и Каррер пишут: «Необходимо допустить, что H^- из гидрида металла соединяется с аммониевым основанием, образуя нестабильный гидрид аммония», который превращается в восстановленный продукт. Они, однако, не приводят доказательств того, что ион H^- действительно участвует в данной реакции; во всяком случае, на основании реакции гидридов металлов в безводном эфире трудно судить о течении ферментативных реакций, протекающих в водных растворах.

Коферменты могут быть восстановлены в водных растворах с помощью $NaBH_4$ [1756]. При этом образуется продукт со спектром поглощения, подобным спектру обычного НАД·H_2, но с активностью вдвое меньшей, чем у НАД·H_2 в дегидрогеназных реакциях. В других случаях были отмечены различия между восстановлением с помощью гидридов металлов и с помощью более обычных восстановителей, таких, как гидросульфит.

Например, тиамин, у которого восстановление гидросульфитом приводит к разделению двух колец, восстанавливается с помощью $LiAlH_4$ в *о*-дигидросоединение; это соединение, однако, практически неактивно в биологическом отношении [1310].

Восстановление такого рода соединений с помощью $LiAlH_4$ неизменно приводит к присоединению водорода в *о*-положение по отношению к азоту, как следует ожидать в том случае, когда атом водорода и электрон присоединяются вместе, в форме одной частицы. Однако для случая ферментативного восстановления кофермента опыты с дейтерием (см. гл. IX) показали, что присоединение осуществляется в *п*-положении по отношению к азоту и что в дегидрогеназных реакциях не происходит переноса водорода ни в одно из *о*-положений, равно как и отщепления водорода из *о*-положений. Присоединение атома водорода и электрона в противоположных точках кольца значительно труднее объяснить, если они присоединяются вместе, как одна частица.

Не возникает, конечно, вопроса об участии свободных ионов H^- в реакциях, происходящих в водных растворах, вследствие выраженной неустойчивости этих ионов. Однако в комплексе, изображенном в уравнении (VII.17), различие между переносом двух водородных атомов и переносом одного иона H^- и одного иона H^+ стирается. Механизм, который приведен там для переноса двух водородных атомов в результате перемещения электронов, может рассматриваться также как перенос иона H^- на одном конце и иона H^+ — на другом. Важная особенность его состоит в том, что оба переноса происходят одновременно, оба они являются частью одного и того же перераспределения электронов, и реакцию, следовательно, нельзя рассматривать как двустадийный процесс с последовательными переносами ионов H^- и H^+.

Мы обсуждали главным образом дегидрогеназные реакции, потому что механизмы этих реакций изучались в опытах с применением дейтерия. Применение этого метода оказывается успешным благодаря тому, что интересующие исследователя водородные атомы не обмениваются с растворителем. Если, однако, перейти к следующей стадии в окислительной цепи, т. е. к флавопротеидам, то в этом случае водородные атомы переносчика обмениваются с растворителем, так что атомы дейтерия, поступающие на переносчик, будут утрачены. Безуспешность попыток продемонстрировать прямой перенос дейтерия от субстрата к флавопротеиду привела к утверждению, что флавопротеиды функционируют путем переноса электронов, а не путем переноса водорода. Нам теперь совершенно очевидно, что эти утверждения неубедительны и что отрицательные результаты были обусловлены просто утратой дейтерия вследствие обмена с растворителем.

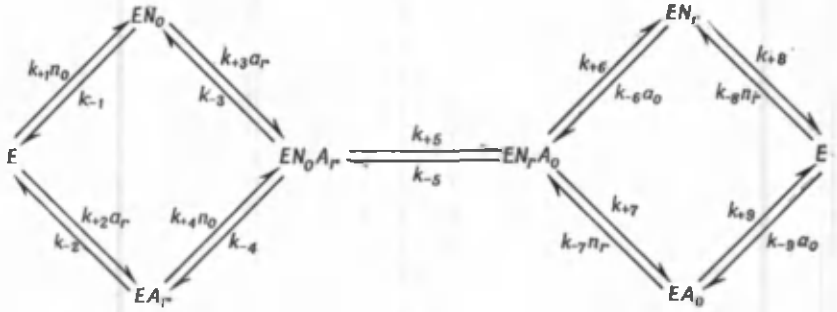
В некоторых случаях, однако, обмен с растворителем достаточно замедлен, и это позволяет обнаружить прямой перенос дейтерия на флавиновую группу. При действии глутатионредуктазы скорость переноса дейтерия от НАД·HD к глутатиону (через флавиновую группу) в 35 раз больше, чем скорость прямого обмена дейтерия, присоединенного флавиновой группой, на водород воды [2514]. Далее, в системе НАД·H_2 : цитохром-b_5-редуктазы (1.5.2.2.) при добавлении НАД·HD дейтерий переносится на флавиновую группу и может быть впоследствии перенесен с нее на аналог НАД; это показывает, что восстановление и окисление флавопротеидов осуществляется путем прямого переноса атомов водорода [658]. Можно отметить определенное сходство восстанавливающейся группировки флавинов и кофермента, проявляющееся главным образом в пространственном расположении присоединяемых атомов водорода; это говорит в пользу механизма одновременного переноса двух атомов водорода. В случае цитохромов не составляет большого труда представить (на бумаге) их окисление и восстановление либо как перенос атомов водорода, либо как перенос электронов; однако вопрос остается открытым.

Особенно важен случай, в котором акцептором служит молекулярный кислород, так как в аэробных условиях именно кислород играет роль конечного акцептора почти во всех окислительных процессах, протекающих в клетках. Прямое восстановление O_2 до H_2O_2, возможность которого предсказал Виланд, впервые было продемонстрировано для ферментной системы Турловом [2653] на примере ксантиноксидазы. Как выяснилось, это явление вообще характерно для аутоокисления флавопротеидов. Можно представить себе, что оно состоит либо в прямом присоединении двух атомов водорода с образованием H_2O_2, либо в присоединении двух электронов с образованием O_2^{2-} (т. е. аниона перекиси водорода), за которым следует присоединение двух ионов водорода. Возможно также, что это восстановление может осуществляться в ходе двух одноэквивалентных стадий с промежуточным образованием свободных радикалов, например HO_2·. Основываясь на изучении кинетики действия ксантиноксидазы, Гутфрейнд и Стёртевант [960] постулировали образование промежуточного комплекса восстановленного флавопротеида с O_2 (происходящее очень быстро в сравнении с окислением флавиновой группы). Немного позднее Вельнер и Майстер [2837] при исследовании оксидазы L-аминокислот получили спектроскопические данные, подтверждающие существование подобного O_2-флавопротеидного комплекса. Образование комплекса такого рода должно, по-видимому, облегчать прямой перенос двух атомов водорода от ФАД·H_2 к O_2.

В ряде случаев было показано, что при действии флавопротеидных ферментов образуется семихинонная форма — ФАД·Н. К этому вопросу мы еще вернемся на стр. 248. Теперь же мы рассмотрим несколько дегидрогеназ, механизм действия которых исследован более или менее детально.

АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА

В случае алкогольдегидрогеназы (а также некоторых других дегидрогеназ) присоединение НАД·H_2 к белковой части фермента может быть прослежено по изменению спектра поглощения или спектра флуоресценции [2629]. Процесс, катализируемый алкогольдегидрогеназой, можно представить в виде следующей схемы:



где N_o и N_r — окисленная и восстановленная формы НАД, A_r и A_o — спирт и альдегид.

Кинетика действия алкогольдегидрогеназы дрожжей указывает на образование тройных комплексов, как изображено на схеме. Суммарная реакция лимитируется скоростью взаимопревращения этих комплексов (т. е. самой реакцией окисления — восстановления). Таким образом осуществляются условия, предусматриваемые теорией Михаэлиса [534, 2003]. Величины K_m для обеих форм НАД и для альдегида достаточно хорошо согласуются со значениями K_s, полученными прямым путем (методом центрифугирования [1044]).

Действие фермента из печени характеризуется кинетикой другого рода [2635, 2636]. В этом случае взаимопревращение тройных комплексов происходит быстро, кофермент диссоциирует из этих комплексов значительно медленнее, чем субстрат или продукт, и взаимодействие фермента с коферментом не зависит от предварительного соединения фермента с субстратом или продуктом. Это означает, что k_{+5} и k_{-5} велики, а k_{+7} и k_{+8} (*или, в обратной реакции*, k_{-1} и k_{-4}) относительно малы. Следовательно, скорость прямой реакции в условиях избытка субстрата лимитируется диссоциацией восстановленного кофермента (т. е. величиной k_{+8}); в присутствии спирта наблюдается быстрое превращение EN_o в EN_r и кинетическое поведение системы не дает указаний на образование тройных комплексов. Этот механизм получил название «механизм Теорелла — Чанса». Для обратной реакции он может быть представлен следующими уравнениями:

$$E + N_r = EN_r, \qquad \text{(VII.18)}$$

$$EN_r + A_o = EN_o + A_r, \qquad \text{(VII.19)}$$

$$EN_o = E + N_o. \qquad \text{(VII.20)}$$

Теорелл и Мак-Кинли Мак-Ки [2636] считают, что кофермент и субстрат располагаются относительно друг друга в тройном комплексе так, как это представлено на стр. 243; кофермент и атом кислорода субстрата связаны с белком через атом цинка.

Было проведено большое число исследований по изучению природы групп, *участвующих в связывании* НАД в различных дегидрогеназах. О связывании кофермента судили обычно по изменению флуоресценции. Эти данные суммированы Шифрином и Капланом [2388]. В настоящее время твердо установлено, что важную роль в связывании НАД играют тиоловые группы.

ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИДФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗА

Действие этого фермента характеризуется рядом особенностей. Это определяется отчасти тем, что окисление глицеральдегидрофосфата сопряжено обычно с фосфорилированием, отчасти же тем, что данный фермент *способен в определенных условиях катализировать и некоторые другие* реакции. Между ферментом из дрожжей и ферментом из мышц имеются существенные различия. Сродство этих ферментов к НАД велико, особенно у фермента из мышц, который обычно кристаллизуется с НАД (две молекулы НАД на молекулу фермента). НАД можно отделить от фермента посредством адсорбции древесным углем.

НАД связывается с тиоловыми группами белковой части фермента и освобождается, если эти группы связать SH-реагентами. Пока еще не известно, с каким участком молекулы НАД взаимодействуют тиоловые группы.

Наиболее вероятный механизм реакции дегидрогенирования предложен Рекером:

$$E{-}SH + НАД^+ = E{-}S{-}НАД + H^+, \qquad \text{(VII.21)}$$

$$E{-}S{-}НАД + CHOR = E{-}S{-}COR + НАД{\cdot}H, \qquad \text{(VII.22)}$$

$$E{-}S{-}COR + H_3PO_4 = E{-}SH + H_2PO_3{-}O{-}COR. \qquad \text{(VII.23)}$$

В этом механизме предполагается, что альдегидная группа субстрата вступает во взаимодействие с E — S — НАД, и ацильная группа переносится на SH-группу. Ацильная группа далее переносится на ортофосфат, в результате чего образуется ацилфосфат. Эта схема, несомненно, упрощена; она, например, не может объяснить высокую специфичность фермента в отношении его субстрата (обусловленную, по-видимому, присоединением RCHO к определенному участку активного центра фермента).

В случае обычного субстрата ($R = -CHOHCH_2OPO_3H_2$) ацилфермент стабилен и в отсутствие фосфата окисления субстрата не происходит. Однако если субстратом служит нефосфорилированный глицериновый альдегид, то и в отсутствие фосфата реакция хоть и медленно, но все же идет вследствие медленного гидролиза ацилфермента; при добавлении фосфата скорость реакции несколько увеличивается.

Фермент из мышц способен также катализировать реакцию трансацилирования (например, перенос ацетата от ацетилфосфата на различные SH-соединения или от одного SH-соединения к другому) и расщепление ацетилфосфата путем арсенолиза. Эти реакции, подобно реакции окисления, тормозятся SH-реагентами, но не цианидом. Кроме того, фермент катализирует и прямой гидролиз ацетилфосфата; на этот процесс SH-реагенты не влияют, но 10^{-5} *M* цианид оказывает тормозящее действие. После отделения НАД путем обработки древесным углем дегидрогеназа может катализировать медленный гидролиз *п*-нитрофенилацетата; эта реакция в отличие от реакции гидролиза ацетилфосфата тормозится ДФФ и SH-реагентами, но не цианидом [2053]. Таким образом, при помощи соответствующей обработки можно превратить дегидрогеназу в ацетилтрансферазу, фосфатазу или эстеразу.

Характеристика ферментативной активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы приведена в табл. 19.

Таблица 19

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИДФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ [1011, 2053]

Реакция	Относительная скорость	Оптимум pH	Влияние иодуксусной кислоты	Влияние цианида	Присоединение НАД к ферменту
Дегидрогеназная	100	8+	Тормозит	Не влияет	Необходимо для реакции
Ацетилтрансферазная	0,006—0,02	8+	»	То же	То же
Эстеразная	0,018	8+	»	» »	Тормозит реакцию
Ацилфосфатазная	0,023	7—	Не влияет	Тормозит	Необходимо для реакции

Другие виды каталитической активности этой дегидрогеназы удалось обнаружить только благодаря получению больших количеств кристаллического фермента. Интерпретация полученных результатов с точки зрения природы субстратсвязывающих групп фермента сможет быть осуществлена только после получения дополнительных данных.

ЛИПОАМИДДЕГИДРОГЕНАЗА

Массей [1749] установил, что этот фермент идентичен флавопротеиду (ранее называвшемуся *диафоразой*), о котором было известно только то, что он катализирует окисление $НАД \cdot H_2$ искусственными акцепторами. Липоамиддегидрогеназа входит в состав ферментных систем, окисляющих пируват и 2-оксоглутарат. Механизм действия этого фермента был исследован Массеем и Вигером [1755]. Они показали, что при восстановлении избыт-

ком НАД·H_2 фермент переходит в форму, в которой флавин восстановлен только наполовину. Это может быть обнаружено по поглощению фермента при 530 *ммк*; *при этой длине волны ни окисленная, ни полностью* восстановленная форма не обладают заметным поглощением. Следует отметить, что препараты НАД·H_2 обычно содержат небольшие количества НАД. Массей и Вигер показали, что при восстановлении фермента препаратом НАД·H_2, из которого следы НАД были удалены с помощью НАД-нуклеозидазы, образуется полностью восстановленная форма фермента. При титровании флавопротеида обычным препаратом НАД·H_2 был получен график, изображенный



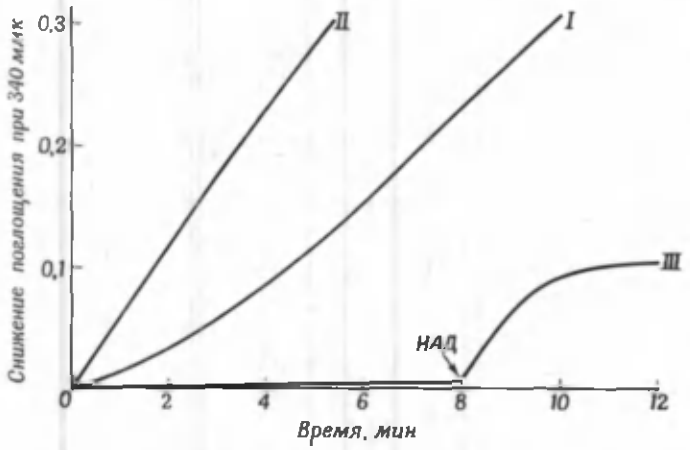
Фиг. 71. Титрование липоамиддегидрогеназы при помощи НАД·H_2 [1755].
Кружочки и крестики показывают результаты, полученные соответственно в отсутствие и в присутствии НАД(Ф)-нуклеозидазы (3. 2. 2. 6).

на фиг. 71, *I*. Из этого графика видно, что при добавлении одной молекулы НАД·H_2 на флавиновую группу фермента фермент переходит в полувосстановленную форму, и при дальнейшем добавлении НАД·H_2 его состояние уже не меняется. Иной результат получается с препаратом НАД·H_2, освобожденным от примеси НАД; и здесь добавление одной молекулы НАД·H_2 на флавиновую группу фермента приводит к *появлению полувосстановленной* формы, но добавление второй молекулы НАД·H_2 полностью восстанавливает фермент. Так как одна молекула НАД·H_2 поставляет два эквивалента *водорода*, а *для перехода флавина* в полувосстановленную форму необходим только один эквивалент, то очевидно, что одновременно происходит восстановление какой-то другой группы в молекуле фермента; Массей и Вигер получили данные, свидетельствующие о том, что это дисульфидная группа. Взаимоотношения трех форм фермента могут быть схематически представлены следующим образом:

$$\left|\begin{matrix}\text{-F}\\ \text{-S—S-}\end{matrix}\right| \overset{2H}{\rightleftharpoons} \left|\begin{matrix}\text{-FH}\\ \text{-S}\quad\text{HS-}\end{matrix}\right| \overset{2H}{\rightleftharpoons} \left|\begin{matrix}\text{-FH}_2\\ \text{-SH}\quad\text{HS-}\end{matrix}\right|$$

Было доказано, что каталитическая активность флавопротеида обусловлена обратимым взаимопревращением первой и второй формы, а не первой и третьей. Фиг. 72 показывает, что при полном восстановлении липоамиддегидрогеназы препаратом НАД·H_2, не содержащим НАД, фермент оказывается

каталитически неактивным и что для предотвращения полного восстановления необходимо присутствие в препарате НАД·H_2 некоторого количества НАД.



Фиг. 72. График, показывающий, что НАД необходим для окисления НАД·H_2 липоевой кислотой (реакция катализируется липоамиддегидрогеназой).

I — липоамиддегидрогеназа, окисленный липоат и НАД·H_2 без добавлений; *II* — то же плюс 0,5 *мкмоль* НАД; *III* — то же плюс НАД(Ф)-нуклеозидаза и 1 *мкмоль* НАД (в момент, отмеченный стрелкой). В случае *I* образование НАД в ходе реакции увеличивает скорость процесса. В случае *III* разрушение следов НАД делает реакцию невозможной; после добавления НАД реакция начинается, но затем она останавливается вновь, когда весь НАД оказывается разрушенным.

В несколько более сложной схеме, предложенной Массеем и Вигером, постулируется образование двух рядом расположенных свободных радикалов.

Механизм действия трансфераз (или гидролаз)

Гидролитические ферменты объединены с ферментами переноса отчасти потому, что гидролиз может рассматриваться как перенос части молекулы субстрата на гидроксильную группу воды; кроме того, в настоящее время ясно, что между механизмами обоих типов реакций имеется много общего; наконец, многие из гидролитических ферментов могут также переносить отщепляемые группы на другие молекулы и, наоборот, многие трансферазы способны осуществлять гидролиз. Таким образом, разделение этих двух типов ферментов не является четким; ниже, в разделе «г», мы увидим, что различие основывается лишь на том, насколько устойчива к воде химическая связь, образующаяся между ферментом и переносимой группой.

В результате проведенных экспериментальных исследований взгляды на действие ферментов претерпели за последние годы существенное изменение по крайней мере в одном отношении. Ферментативные реакции было принято рассматривать как реакции, протекающие между молекулами на поверхности фермента; предполагалось, что действие фермента носит при этом чисто каталитический характер, т. е. что сам он в реакцию не вступает. В настоящее время верх одерживает другая точка зрения, согласно которой сам фермент непосредственно участвует в реакции как один из реагентов. Это изменение взглядов нашло свое отражение и в изменении формы уравнений реакций. Реакция, представляющая собой перенос группы B от A

к D, ранее писалась так:

$$A-B+D \xrightarrow{E} A+B-D. \qquad \text{(VII.24)}$$

В настоящее время принято писать эту реакцию в две стадии:

$$A-B+E=A+B-E, \qquad \text{(VII.25)}$$

$$D+B-E=B-D+E. \qquad \text{(VII.26)}$$

При этом предусматривается образование определенного соединения — продукта связывания фермента с транспортируемой группой. Если, например, реакция представляет собой перенос фосфатной группы, то первой стадией будет образование фосфорилированного фермента; если речь идет о переносе ацетильного радикала, то первой стадией будет образование ацетилированного фермента, и так далее. Теперь ясно, что очень многие, хотя, по-видимому, и не все, реакции переноса протекают именно таким путем.

а) Идентификация связи, расщепляемой в ходе реакции

При рассмотрении реакций, в которых имеет место расщепление молекулы субстрата на две части, не всегда легко определить, где именно произошло расщепление. Две части молекулы обычно соединены связующим атомом, чаще всего — атомом кислорода, и расщепление может происходить либо по одну, либо по другую сторону от этого атома. Например, при гидролизе сахарозы разрыв может произойти между связующим атомом О и глюкозной частью молекулы (в этом случае кислород должен остаться в составе свободной молекулы фруктозы) или же может быть расщеплена связь между кислородом и фруктозной частью молекулы. При гидролизе фосфорных эфиров может расщепляться либо связь С — О, либо связь Р — О. Вопрос о том, какая именно связь расщепляется, очень важен для установления механизма действия ферментов, *особенно в сочетании с данными об оптических инверсиях* (см. ниже, раздел «в»).

Этот вопрос изучали изотопными методами с применением O^{18} (особенно много работала в данной области М. Кон [471]). Наиболее прямой подход состоит в том, чтобы синтезировать субстрат, у которого место связующего атома занимает O^{18}, и затем определить, какая часть молекулы содержит O^{18} после реакции. Однако такой синтез может представлять известные трудности; поэтому используют также и два других, значительно более простых метода.

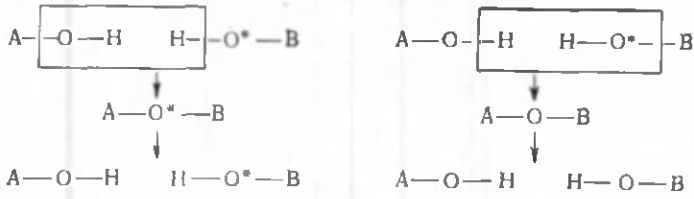
Первый метод основан на следующем. Если гидролиз немеченого субстрата проводится в H_2O^{18}, то ясно, что в зависимости от места расщепления O^{18} будет найден либо в одной, либо в другой части молекулы. Рассмотрим гидролиз молекулы А — О — В. Очевидно, здесь возможен разрыв в *одном из двух положений*



В первом случае O^{16} будет найден в АОН, во втором случае — в ВОН. Этот метод использовали Полани и Забо [2099] при изучении щелочного гидролиза сложного эфира.

Во втором методе используется обычная вода, а к раствору, содержащему фермент, добавляют АОН и $BO^{18}H$. При этом во время обратной реак-

ции (т. е. реакции синтеза), которая всегда в известной степени катализируется ферментом, образуется — в зависимости от места расщепления — либо меченый (A — O¹⁸ — B), либо немеченый (A — O — B) продукт.



В результате ферментативного гидролиза (как показано на схеме во второй стадии) в первом случае будет образовываться BO¹⁸H, как и в исходном состоянии, а во втором — немеченый BOH (поскольку реакция протекает в обычной воде). Следовательно, если время позволит реакции пройти в прямом и обратном направлении достаточное число раз, то во втором случае BO¹⁸H потеряет практически весь свой O¹⁸, тогда как в первом случае не будет наблюдаться потери O¹⁸. В исследованиях, в которых был применен этот метод, роль BOH играла ортофосфорная кислота $H_3PO_4^{18}$, в молекуле которой все атомы кислорода были мечеными. В ходе каждой отдельной реакции удалялось не более одного атома O¹⁸, но так как все OH-группы $H_3PO_4^{18}$ принимали участие в реакции с равной вероятностью, то при достаточном числе оборотов удалялись все атомы O¹⁸.

Этот метод можно использовать также при изучении реакций переноса, например при изучении действия фосфорилаз; в этом случае $H_3PO_4^{18}$ выполняет роль акцептора D (реакция VII.26). Если группа B (в данном случае гликозильная группа) переносится в форме B — O —, то O¹⁸ в молекуле D будет замещен на O; если же перенос происходит в форме B —, то D будет сохранять свою метку.

Ряд данных, полученных этим методом, приведен в табл. 20. Эти данные можно сопоставить с данными по неферментативному гидролизу карбоксильных эфиров. При неферментативном гидролизе может разорваться любая из связей (какая именно, это зависит от условий гидролиза и от природы данного сложного эфира), хотя расщепление связи ацил — кислород наблюдается наиболее часто (см., например, [1211, гл. 14]). Установлено, что все фосфатазы атакуют связь P — O, а фосфорилазы — связь C — O.

Опыты с ферментами убедительно показывают, что при ферментативном гидролизе разрывается связь, расположенная с той стороны связующего атома, к которой примыкает «специфический участок» молекулы субстрата, т. е. участок, в отношении которого фермент проявляет наибольшую специфичность [1451]; таким образом, разрыв происходит настолько близко к переносимой группе, насколько это возможно. Фосфатазы специфичны по отношению к фосфатной части молекулы, и обе фосфатазы могут переносить фосфатные группы на другие молекулы, так что разрыв происходит непосредственно за атомом фосфора; фосфорилазы же, переносящие гликозильные группы, специфичны по отношению к глюкозной части молекулы, и в этом случае разрыв происходит непосредственно за атомом углерода глюкозы.

Подтверждение этого было получено Кошландом и Штейном [1451] при изучении действия дрожжевой инвертазы (фруктофуранозидазы) на сахарозу. Этот фермент специфичен по отношению к фруктозной части молекулы и может катализировать перенос фруктозильных групп на другие молекулы. Выяснилось, как этого и следовало ожидать, что расщеплению подвергается связь, расположенная ближе к фруктозной части молекулы.

Таблица 20

СВЯЗИ, РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОМ И НЕФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ

Катализатор	Расщепляемая связь (указана стрелкой)	Субстрат
Кислота	C—O—P	Глюкозо-1-фосфат
Кислота	C—O—P	Триметилфосфат
Щелочь	C—O—P	Триметилфосфат
Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12)	C—O—P	Ацетилфосфат
α-глюканфосфорилаза (2.4.1.1)	C—O—P	Гликоген + Фосфат
Сахарозо-глюкозилтрансфераза (2.4.1.7)	C—O—P	Глюкозо-1-фосфат + + Фосфат
Рибонуклеаза (2.7.7.16)	C—O—P	Полинуклеотид
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)	C—O—P	Глюкозо-1-фосфат
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)	C—O—P	Фенилфосфат
Кислая фосфатаза (3.1.3.2)	C—O—P	Глюкозо-1-фосфат
Фосфодиэстераза (3.1.4.1)	C—O—P	Полинуклеотид

Число ферментов, механизм действия которых был исследован этими методами, еще недостаточно велико для того, чтобы считать данное правило универсальным; однако все свидетельствует о том, что оно имеет важное значение, и следует надеяться, что вскоре будут получены дополнительные доказательства в его пользу.

М. Кон [472, 473] изучала также действие глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (1.2.1.12) и фосфоглицераткиназы (2.7.2.3) (см. реакции 8—10 табл. 41). При проведении суммарной дегидрогеназной реакции

$$\text{Глицеральдегидфосфат} + \text{Фосфат} + \text{НАД} \rightleftarrows \text{Дифосфоглицерат} + \text{НАД}\cdot\text{H}_2 \qquad \text{(VII.27)}$$

с использованием $H_3PO_4^{18}$ М. Кон не обнаружила изменения содержания O^{18} в фосфатной группе. Так же обстояло дело и в том случае, когда реакция проходила в обратном направлении. Это указывает, что в реакцию вовлекается именно связь C — O, а не связь P — O (результат, вполне согласующийся с тем фактом, что фермент специфичен по отношению к альдегиду). В то же время при действии фосфокиназы расщепляется связь P — O, а это согласуется с тем, что данный фермент переносит фосфатные группы. Если в фосфокиназной реакции (реакция 10 табл. 41) в качестве субстрата используется дифосфоглицерат, образованный в рассмотренной выше дегидрогеназной реакции (и поэтому содержащий атомы O^{18} в фосфатной группе, *находящейся в положении* 1), то в образующейся молекуле фосфоглицерата содержится $COO^{18}H$-группа, потому что связующий атом O, который перво-

начально принадлежал фосфатной группе, остается связанным с атомом С при разрыве связи Р — О. Следовательно, в результате функционирования этой двуферментной системы один из атомов О фосфатной группы переносится на карбоксил. Реакция в целом, однако, обратима, так что атом О из карбоксила может перейти обратно в фосфатную группу; но так как оба атома в СООН-группе в химическом отношении эквивалентны, то перейти в фосфатную группу может любой из них. Как было найдено в опытах Кон, это приводит в итоге к разведению O^{18} в фосфатной группе и притом только тем количеством O^{16}, которое первоначально было связано с данным атомом С фосфоглицерата.

Аналогичные исследования [473] показали, что связь Р — О расщепляется при действии дрожжевой гексокиназы (2.7.1.1) и аденилаткиназы (2.7.4.3).

б) Методы изотопного обмена

Эти методы позволяют сделать выбор между двумя приведенными выше механизмами реакций переноса, катализируемых ферментами, а именно между реакцией (VII.24), при которой происходит прямой перенос группы от одной молекулы к другой, и реакциями (VII.25) и (VII.26), в которых образуется промежуточное соединение (продукт связывания фермента с транспортируемой группой).

Если истинный механизм представлен реакцией (VII.24), то реакция изотопного обмена не может происходить, пока не будут добавлены оба субстрата А — В и D. В то же время для реакции (VII.25) достаточно присутствия одного субстрата, и если к ферменту добавить А — В при полном отсутствии D, то в результате обратимой реакции будет образовываться небольшое количество свободного А (не превышающее в эквивалентном отношении количества присутствующего фермента). Если теперь добавить, помимо А — В, еще и некоторое количество меченого А, т. е. А*, то мы должны будем ожидать вслед за реакцией (VII.25) обратной реакции

$$B-E+A^*=A^*-B+E. \qquad \text{(VII.28)}$$

И хотя количество присутствующего фермента может быть в стехиометрическом отношении очень мало, этот процесс будет протекать до тех пор, пока не установится изотопное равновесие. Другими словами, в отсутствие акцептора D фермент будет катализировать реакцию изотопного обмена, затрагивающую ту часть молекулы субстрата, которая *не переносится* ферментом. Подобный же эксперимент можно провести и с продуктом реакции; если добавить к ферменту В — D и D* в отсутствие А, то фермент будет катализировать изотопный обмен D. Если же мы введем в систему В*, то ни в одном из случаев не будет происходить изотопного обмена.

Этот метод весьма эффективен при исследовании реакций, которые протекают с промежуточным переносом группы на фермент, и в последнее время он все шире входит в употребление. Ниже мы приведем несколько случаев, в которых с помощью этого метода удалось достаточно полно раскрыть механизм реакции.

Сахарозо-глюкозилтрансфераза (2.4.1.7) катализирует реакцию

$$\alpha\text{-Г-1-Ф}+\text{Фр}=\alpha\text{-Г-1-Фр}+\text{Ф}, \qquad \text{(VII.29)}$$

где Ф — фосфат, Г — глюкоза, Фр — фруктоза, α-Г-1-Фр — сахароза. Реакция представляет собой, следовательно, обратимый перенос остатка глюкозы от фосфата на фруктозу. Если добавлен только глюкозофосфат (либо вместе со свободным фосфатом, либо без него), то мы, очевидно, не можем ожидать протекания *химической* реакции, так как в отсутствие фруктозы не имеется акцептора для фосфата. Однако было найдено [650],

что в среде, содержащей $H_3P^{32}O_4$ и глюкозофосфат, фермент катализирует быструю реакцию изотопного обмена

$$\text{α-Г-1-Ф} + \text{Ф}^* = \text{α-Г-1-Ф}^* + \text{Ф}. \qquad \text{(VII.30)}$$

Это указывает, что фермент соединяется с остатком глюкозы, освобождая фосфат; изотопный обмен в таком случае осуществляется следующим образом:

$$\text{Г-1-Ф} + \text{Е} = \text{Г-1-Е} + \text{Ф}, \qquad \text{(VII.31)}$$

$$\text{Г-1-Е} + \text{Ф}^* = \text{Г-1-Ф}^* + \text{Е}. \qquad \text{(VII.32)}$$

Позднее это было подтверждено путем использования фруктозы, меченной C^{14} (обозначается через Фр*) [2901]. В отсутствие фосфата фермент катализирует обмен

$$\text{α-Г-1-Фр} + \text{Фр}^* = \text{α-Г-1-Фр}^* + \text{Фр}, \qquad \text{(VII.33)}$$

который возможен только в том случае, если фермент образует соединение с остатком глюкозы, т. е. именно с той частью молекулы, по отношению к которой он специфичен и которую он переносит на другие молекулы. Данный фермент, следовательно, не является истинной фосфорилазой, так как фосфат не обязательно участвует в реакции. Фермент может переносить остатки глюкозы на различные другие молекулы, и это обстоятельство дает дальнейшее подтверждение правильности указанного гипотетического механизма. Другие доказательства промежуточного переноса остатка глюкозы на фермент приведены ниже, в разделе «в».

Если обратиться к мальтозофосфорилазе (2.4.1.8), то положение окажется совершенно иным. Катализируемая реакция может быть изображена в этом случае следующим образом:

$$\text{α-Г-Г} + \text{Ф} = \text{β-Г-1-Ф} + \text{Г}. \qquad \text{(VII.34)}$$

То обстоятельство, что в результате реакции происходит оптическая инверсия, является указанием скорее на прямой перенос, нежели на перенос с образованием промежуточного соединения (комплекса с ферментом; см. раздел «в»). В соответствии с этим рассматриваемый фермент не катализирует изотопный обмен ни по реакции [746]

$$\text{β-Г-1-Ф} + \text{Ф}^* = \text{β-Г-1-Ф}^* + \text{Ф}, \qquad \text{(VII.35)}$$

ни (в отсутствие фосфата) по реакции

$$\text{α-Г-Г} + \text{Г}^* = \text{α-Г-Г}^* + \text{Г}. \qquad \text{(VII.36)}$$

В присутствии фосфата катализируется реакция (VII.36), но это объясняется просто обратимостью реакции (VII.34).

Таким образом, имеющиеся данные показывают, что в этом случае не образуется соединения фермент — глюкоза и трансгликозилирование осуществляется путем прямого переноса остатка глюкозы от одного субстрата к другому в соответствии с уравнением (VII.24). α-Глюканфосфорилаза (2.4.1.1) также не способна катализировать реакцию изотопного обмена (VII.30) [476].

Эти результаты согласуются с поведением ферментов в присутствии арсената. В опытах с сахарозо-глюкозилтрансферазой добавление арсената вызывает быстрый гидролиз сахарозы с образованием свободной глюкозы и фруктозы и гидролиз глюкозо-1-фосфата с образованием свободной глюкозы и фосфата. Причина этого заключается в том, что арсенат может участвовать в реакции вместо фосфата, образуя крайне нестабильный глюкозоарсенат, который спонтанно распадается с большой скоростью. Следовательно,

после реакций (VII.37) и (VII.38) будут идти реакции (VII.39) и (VII.40):

$$Г\text{-}1\text{-}Фр + Е = Г\text{-}1\text{-}Е + Фр, \quad (VII.37)$$

$$Г\text{-}1\text{-}Ф + Е = Г\text{-}1\text{-}Е + Ф, \quad (VII.38)$$

$$Г\text{-}1\text{-}Е + Ар = Г\text{-}1\text{-}Ар + Е, \quad (VII.39)$$

$$Г\text{-}1\text{-}Ар + H_2O = Г + Ар, \quad (VII.40)$$

где Ар обозначает H_3AsO_4.

Мальтозофосфорилаза, которая не образует промежуточного соединения фермент — глюкоза, не способна катализировать гидролиз β-глюкозо-1-фосфата в присутствии арсената, и это согласуется с ее неспособностью катализировать реакцию (VII.35). Однако, как и следовало ожидать, этот фермент катализирует гидролиз мальтозы в присутствии арсената, так как данный процесс может осуществляться в результате прямого переноса остатка глюкозы на арсенат

$$\alpha\text{-}Г\text{-}Г + Ар = \beta\text{-}Г\text{-}1\text{-}Ар + Г, \quad (VII.41)$$

после чего следует реакция (VII.40). Приведенные результаты убедительно подтверждают различие в механизме действия указанных двух ферментов, которое было установлено методом изучения изотопного обмена.

Некоторые другие ферменты также были исследованы подобным образом. КоА-трансфераза β-кетокислот (2.8.3.5) катализирует обменную реакцию [2989]

$$Сукцинил\text{-}КоА + Сукцинат^* = Сукцинил^*\text{-}КоА + Сукцинат, \quad (VII.42)$$

и это указывает, что данный фермент также образует промежуточное соединение с группой, которую он переносит, т. е. с коферментом А.

Ариламин-ацетилтрансфераза (2.3.1.5) катализирует обменную реакцию

$$Ацетил\text{-}ариламин + Ариламин^* = Ацетил\text{-}ариламин^* + Ариламин, \quad (VII.43)$$

но не обменную реакцию [240]

$$Ацетил\text{-}ариламин + Ацетат^* = Ацетил^*\text{-}ариламин + Ацетат. \quad (VII.44)$$

Следовательно, и в данном случае с ферментом соединяется именно транспортируемая (ацильная) группа, а не ариламин.

В то же время имеющиеся данные указывают, например, на то, что при действии фосфокиназ транспортируемая фосфатная группа не образует промежуточного соединения фермент — фосфат. Было показано [2246], что ацетаткиназа (2.7.2.1) не катализирует включения меченого АДФ в АТФ (если только не добавлен также и ацетат), или меченого ацетата в ацетилфосфат (если только не добавлен также и АДФ), или, наконец, меченого фосфата в АТФ (даже если добавлен ацетат). Если бы образовывалось соединение фермент — фосфат, то в двух первых случаях следовало бы ожидать включения. По аналогии с этим пируваткиназа (2.7.1.40) не катализирует включения меченого пирувата в фосфопируват, если только одновременно не добавлен и АДФ [305]. На основании ряда других данных был предложен гипотетический механизм действия фосфоглицераткиназы и пируваткиназы, который согласуется с упомянутыми наблюдениями (см. также раздел «г»).

Было показано, что гидролаза, а именно НАД(Ф)-нуклеозидаза (3.2.2.6), катализирует обменную реакцию

$$N\text{—}R + N^* = N^*\text{—}R + N, \quad (VII.45)$$

где N — никотинамид, R — остаток молекулы кофермента. Это указывает на следующий механизм гидролиза:

$$N\text{—}R + E = E\text{—}R + N, \quad (VII.46)$$

$$E\text{—}R + H_2O = E + R. \quad (VII.47)$$

Так как щелочная фосфатаза (3.1.3.1) наряду с гидролизом способна катализировать перенос фосфатных групп, то можно предполагать, что в ходе осуществления этого процесса образуется соединение фермент — фосфат. Если это действительно так, то, поскольку при гидролизе происходит разрыв связи P — O, этот фермент должен был бы катализировать включение O^{18} из H_2O^{18} в фосфат. Было показано, что такое включение действительно имеет место [2510], правда с весьма незначительной скоростью. Неорганическая пирофосфатаза (3.6.1.1) также катализирует подобное включение O^{18} [474].

Показано [473], что АТФ-аза (3.6.1.3) разрывает связь между атомом P концевой фосфатной группы и связующим атомом O. АТФ-аза как в форме миозина, так и в форме актомиозина катализирует включение O^{18} из H_2O^{18} в неорганический фосфат, причем в первом случае требуется присутствие АТФ или других нуклеозидтрифосфатов. Процесс довольно сложен, он зависит от природы нуклеозидтрифосфата и активирующего иона металла [591, 1570]. Возможно, это обусловливается структурными изменениями в белке (которые, как известно, имеют место в присутствии АТФ) или же реакцией обмена с промежуточным продуктом, образующимся в ходе гидролиза АТФ. Полной ясности в этом вопросе пока еще нет.

В опытах с O^{18} получены также доказательства образования промежуточного соединения фермент — субстрат для химотрипсина (3.4.4.5). Если в среде H_2O^{18} добавить к ферменту карбобензоксифенилаланин, то O^{18} будет быстро включаться в эту аминокислоту благодаря обратимому соединению карбоксильной группы с ферментом и выделению воды [2486].

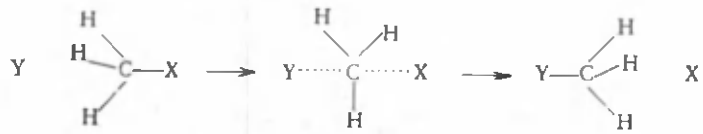
Такого включения не происходит с самим фенилаланином, что согласуется со специфичностью действия данного фермента на пептиды. Не происходит его также и при инкубации карбобензоксифенилаланина с сывороточным альбумином.

в) Метод оптической инверсии

Реакция прямого переноса групп может рассматриваться как частный случай хорошо известной *реакции замещения*. При этом одновременно с приближением к атому, *у* которого происходит реакция переноса, группы, *на* которую совершается перенос, от этого же атома с противоположной стороны удаляется группа, *от* которой совершается перенос. Например, реакция переноса метильной группы от X к Y

$$\text{Метил}-X + Y = \text{Метил}-Y + X$$

может рассматриваться как ряд последовательных этапов



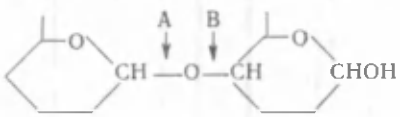
В данном случае замещение происходит у углеродного атома метильной группы, и Y приближается со стороны, противоположной X. Когда Y подходит ближе к атому C, X удаляется от этого атома и в то же время три C — H -связи также постепенно меняют свое расположение; в промежуточном состоянии системы эти связи располагаются в одной плоскости, образуя прямые углы с осью X — Y, как это показано на схеме (конфигурация в центре). Затем они продвигаются еще дальше и в конце процесса замещения оказываются на стороне, противоположной Y. Результатом этого процесса является обращение конфигурации при атоме C, как показано на схеме (конфигурация справа).

Если замещение произошло у оптически активного атома, другими словами, если три рассматриваемые связи относятся к трем различным группам, то легко установить, что перенос должен сопровождаться оптической инверсией, так как в результате его образуется соединение, представляющее собой по расположению групп зеркальное отражение исходного. Эта оптическая инверсия — характерная особенность реакции замещения.

Кошланд [1448] считает, что по наличию или отсутствию оптической инверсии при ферментативной реакции можно судить о механизме реакции. Если реакция включает только один перенос группы (или нечетное число последовательных переносов), то результатом ее будет оптическая инверсия; если же происходят два последовательных переноса (или четное их число), то влияние этих переносов будет погашаться и инверсии наблюдаться не будет. Следовательно, если реакция осуществляется путем прямого переноса группы от одного субстрата на другой в соответствии с уравнением (VII.24), то будет иметь место инверсия группы B. Если же происходит образование промежуточного соединения и группа B соединяется с ферментом, как показано в уравнениях (VII.25) и (VII.26), то, хотя перенос B от A на фермент также будет сопровождаться инверсией, эта первая инверсия будет погашаться второй, происходящей при переносе B от фермента к D, и первоначальная конфигурация B, таким образом, будет восстанавливаться.

Следует, однако, помнить, что инверсия может происходить только у определенного атома, а именно у того, у которого происходит замещение. Поэтому очень важно знать, какая именно связь вовлекается в реакцию (см. выше, раздел «а»). При действии фосфатазы не наблюдается, например, инверсии. На первый взгляд это можно принять за указание на двухстадийный механизм. Однако было показано, что при действии фосфатазы в группировке C — O — P разрывается связь P — O, т. е. что в данном случае вообще не происходит замещения у атома C. В этих условиях инверсия у углеродного атома невозможна, потому что связь между этим атомом и атомом кислорода сохраняется, а следовательно, и все другие связи атома C должны сохранять свое относительное расположение. Таким образом, отсутствие инверсии в рассматриваемом случае не дает указаний относительно природы механизма реакции; каков бы ни был этот механизм, инверсия здесь произойти не может.

По той же причине в случае, когда субстратом реакции служит дисахарид



одновременная инверсия *обеих* гексоз невозможна. Если разрывается связь A, то не может произойти инверсии в остатке гексозы, расположенном справа, хотя она может произойти у C-1 левой гексозы; если же разрывается связь B, то должна сохранить свою конфигурацию гексоза, расположенная слева, хотя в другом остатке гексозы может произойти инверсия у C-4.

Сравнив теперь действие сахарозо-глюкозилтрансферазы и мальтозо-фосфорилазы, мы найдем, что рассмотренный выше метод приводит к результатам, хорошо согласующимся с данными метода изотопного обмена. Мы видели, что в реакцию вовлекается связь, расположенная между углеродным атомом глюкозида и атомом кислорода. Это означает, что в другой части молекулы дисахарида не должно наблюдаться инверсии, и наблюдения подтверждают данный вывод. Мы видели также, что, по данным изотопных исследований, механизм действия названных двух ферментов различен. В случае сахарозо-глюкозилтрансферазы сначала на фермент переносится α-глюкоза, вероятно с инверсией в β-форму; затем последняя переносится

от фермента на фосфат (или какую-либо другую молекулу), что должно вызывать вторую инверсию с образованием α-глюкозо-1-фосфата; именно так оно и происходит в действительности. В случае мальтозофосфорилазы данные изотопных исследований указывают на прямой перенос α-глюкозы на фосфат, и происходящая при этом инверсия должна приводить к образованию β-глюкозо-1-фосфата; наблюдения подтверждают и этот вывод.

Другим примером может служить действие амидофосфорибозилтрансферазы (2.4.2.14); отсутствие включения меченого пирофосфата в фосфорибозилпирофосфат говорит о том, что в ходе реакции не происходит образования фосфорибозилфермента. Следовательно, процесс должен осуществляться путем прямого переноса и приводить к инверсии; действительно α-фосфорибозилпирофосфат превращается в β-фосфорибозиламин [1015].

Однако в случае α-глюканфосфорилазы имеется необъяснимое расхождение между данными, полученными с помощью двух упомянутых методов. Как мы видели, этот фермент сходен с мальтозофосфорилазой в том отношении, что он не способен катализировать соответствующую реакцию изотопного обмена (VII.30). Это свидетельствует как будто бы о прямом переносе. Такой перенос должен был бы сопровождаться инверсией, как в случае действия мальтозофосфорилазы, однако в действительности инверсии не происходит. Из полисахаридных цепей, которые содержат только α-связи, образуется α-глюкозо-1-фосфат. Следует надеяться, что дальнейшие исследования обнаружат причину этого расхождения. Система, вероятно, в действительности сложнее, чем это представляется в настоящее время. Активный центр фермента содержит пиридоксальфосфат [160], и действие фермента зависит от наличия фосфатсодержащей группы, фосфат которой может быть удален и вновь присоединен ферментативным путем. Если бы было известно, как функционирует эта группа, то, вероятно, стала бы ясной и причина отсутствия инверсии.

г) Изучение конкуренции и некоторых других явлений

В ряде случаев выводы в отношении механизма реакции могут быть сделаны на основании некоторых особенностей в поведении систем. Так, например, при действии фосфатаз (3.1.3.1—2), которые могут катализировать и гидролиз и перенос, Мортон [1879] обнаружил определенную конкуренцию между водой и акцептором фосфата за удаляемый из субстрата фосфат. Это легче всего объяснить, если допустить существование начальной (определяющей скорость) стадии, в ходе которой фосфат переносится от субстрата на фермент, а затем связанный с ферментом фосфат распределяется между водой и акцептором в соответствии с их концентрациями и константами скорости соответствующих реакций. Такое объяснение согласуется с уже упоминавшимися выше результатами изотопных исследований.

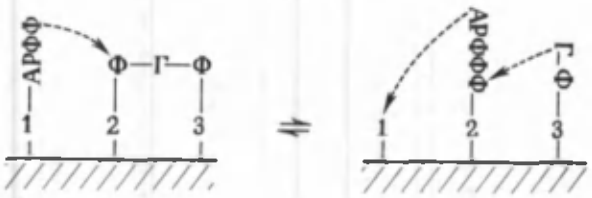
Указанные фосфатазы специфичны по отношению к фосфатной группе и сравнительно неспецифичны по отношению к остальной части молекулы. Имеются, однако, и другие фосфатазы, специфичные по отношению к молекуле субстрата в целом (например, ферменты 3.1.3.5 и 11). Для этих ферментов не было получено никаких указаний на перенос фосфата [1879].

Другой тип конкурентных отношений был использован Бюхером [354] для выяснения механизма действия фосфоглицераткиназы (2.7.2.3), которая катализирует обратимый перенос фосфата от карбоксильной группы дифосфоглицерата на АДФ. Эта реакция может быть представлена следующим образом:

$$\text{ФГФ} + \text{АРФФ} = \text{ФГ} + \text{АРФФФ}, \qquad \text{(VII.48)}$$

где ФГ — 3-фосфоглицерат; А, Р и Ф — аденин, рибоза и фосфатные группы АДФ и АТФ, так что АРФФФ обозначает АТФ.

Бюхер нашел, что в данной системе АТФ не конкурирует с АДФ; это указывает, что они соединяются с различными участками фермента. Однако и АТФ и АДФ конкурируют с дифосфоглицератом. Для объяснения этого Бюхер предлагает следующую схему процесса:



Здесь 1, 2 и 3 представляют три участка молекулы фермента: участок 1 может соединяться с адениновым концом молекулы АДФ, участок 2 — либо с АТФ (с его концевой фосфатной группой), либо с фосфатом дифосфоглицерата, находящимся у первого углеродного атома, и участок 3 — с фосфатом фосфоглицерата или дифосфоглицерата, находящимся у третьего углеродного атома. Следовательно, дифосфоглицерат может соединяться с участками 2 и 3 одновременно. Переносимая фосфатная группа соединяется с участком 2, и реакцию можно представить как взаимодействие концевого фосфата АДФ с этой фосфатной группой, приводящее к вытеснению глицерата из связи с этой группой. В итоге АТФ оказывается присоединенным к участку 2, а фосфоглицерат — к участку 3, как показано на приведенной выше схеме. Процесс можно рассматривать как прямое замещение того же типа, что и реакция (VII.24).

Подобный механизм представляется весьма вероятным, хотя доказательства, основанные на обнаружении конкуренции, нельзя считать окончательными. С помощью этого механизма можно объяснить конкуренцию между АТФ и дифосфоглицератом, но он лишь частично объясняет отсутствие конкуренции между АТФ и АДФ, ибо неясно, почему АТФ не может связываться с участком 1 так же, как и АДФ; кроме того, так как АДФ конкурирует с дифосфоглицератом столь же эффективно, как и АТФ, то естественно предположить, что и АДФ и АТФ должны соединяться с участком 2, а следовательно, должны конкурировать между собой. Быть может, объяснение заключается в различии величин сродства у разных реагентов к рассматриваемым трем участкам.

Механизм действия пируваткиназы (2.7.1.40) изучали Бойер и др. [1020, 2213]. Они получили следующие данные: АДФ не конкурирует с фосфоенолпируватом (ФЕП), АТФ конкурирует с АДФ и с ФЕП, пируват в слабой степени конкурирует с ФЕП, АМФ не вызывает торможения реакции. Это говорит о том, что один из участков активного центра фермента присоединяет либо АДФ, либо АТФ, а другой присоединяет либо пируват, либо ФЕП. Конкуренция между АТФ и ФЕП обусловлена наличием у обоих соединений фосфорильной группы, которая переносится в ходе реакции. Конкуренцию АТФ с АДФ и ФЕП удалось подтвердить прямым определением эффективности связывания; было показано, что величины K_m для АДФ и ФЕП приблизительно равны величинам K_s, полученным в опытах по торможению.

Кинетика действия аденилаткиназы (2.7.4.3) была изучена Каллаганом и Вебером [381]. Они установили, что когда реакция идет в одном направлении, то АТФ и АМФ конкурируют с АДФ, а когда она идет в обратном направлении, то АДФ конкурирует с АТФ и АМФ, но что ни в том, ни в другом случае АТФ не конкурирует с АМФ. По мнению авторов, эти данные свидетельствуют о том, что в активном центре фермента имеется один участок, который вначале присоединяет какой-либо из трех субстратов, так

что образуется комплекс, а затем уже этот комплекс реагирует с соответствующим вторым субстратом. Определенные для трех субстратов значения величин K_m оказались равными значениям величин K_i, полученным в опытах, в которых эти соединения выступали как конкурентные ингибиторы.

д) Идентификация промежуточных комплексов

В ряде случаев выяснению механизма реакции помогает выделение и идентификация промежуточного комплекса.

При изучении действия фосфоглюкомутазы (2.7.5.1) образование соединения фосфат — фермент было продемонстрировано непосредственно [1651, 2123]. Если добавить к глюкозо-1-фосфату достаточно большое количество кристаллического фермента, то немедленно образуется глюкозо-1,6-дифосфат и притом в количестве, которое зависит от количества добавленного фермента. Из этого следует, что при выделении фермента его получают частично или полностью в фосфорилированном состоянии и что фосфатная группа может переноситься с фермента на глюкозофосфат:

$$\text{Е}-\text{Ф}+\text{Глюкозо-1-фосфат}=\text{Е}+\text{Глюкозо-1,6-дифосфат}. \qquad \text{(VII.49)}$$

Образующийся свободный фермент может затем вновь фосфорилироваться глюкозодифосфатом с образованием эквивалентного количества глюкозо-6-фосфата (см. табл. 41). Аналогичные результаты были получены в опытах с кристаллической фосфоглицеромутазой из мышц (2.7.5.3) [2090].

Венкатараману и Рекеру [2731] удалось выделить методом хроматографии на колонке с карбоксиметилцеллюлозой комплекс диоксиацетон — трансальдолаза. Это говорит о том, что реакция осуществляется путем переноса диоксиацетоновой группы от субстрата на фермент, с которого, как это было показано, она затем переносится на соответствующий акцептор. Комплекс диоксиацетон — фермент представляет собой шиффово основание, образованное ε-аминогруппой лизинового остатка фермента [892].

В некоторых случаях соответствующая группа субстрата переносится не на белковую часть молекулы фермента, а на связанную с белком простетическую группу. Так, при изучении действия транскетолазы было установлено образование соединения гликольальдегид — тиаминпирофосфат (см. стр. 365). Другим примером может служить выделение соединения биотин — CO_2 при действии карбоксилаз подгруппы 6.4 (стр. 365). Пиридоксальфосфат функционирует как простетическая группа многих ферментов, действующих на аминокислоты и образующих с ними шиффовы основания (стр. 362).

Ряд гидролаз также катализирует перенос отщепляемых групп на другие акцепторы помимо воды, и это принято рассматривать как следствие предварительного переноса группы на фермент. Образующиеся промежуточные продукты обычно не удается выделить, так как они быстро гидролизуются водой. Однако в случае химотрипсина, воспользовавшись «необычным» субстратом, можно выделить стабильный аналог нормального промежуточного продукта. При нейтральном значении pH химотрипсин гидролизует *п*-нитрофенилацетат; в кислой области pH гидролиз осуществляется очень медленно, и при этих условиях можно выделить моноацетилхимотрипсин [149].

Механизм действия лиаз

Если не считать декарбоксилаз, действие которых часто зависит от наличия пиридоксальфосфата или тиаминпирофосфата и которые мы поэтому обсудим в главе о кофакторах (см. также стр. 171), то среди лиаз лучше всего изучена фумаратгидратаза (4.2.1.2). Ниже мы рассмотрим механизм действия этого фермента.

ФУМАРАТГИДРАТАЗА

Вопрос о механизме действия фумаратгидратазы тесно связан со стереохимией фумаратгидратазной реакции. Фумаратгидратаза обнаруживает оптическую специфичность при одном направлении реакции (действует только на L-малат) и геометрическую специфичность — при другом ее направлении (действует только на фумарат). Фермент специфически присоединяет гидроксильную группу к фумарату, образуя L-малат. Олберти и его коллеги [39, 715] показали, что фермент специфичен также в отношении присоединения водорода к другому атому углерода. Это было установлено в опытах, в которых фумарат инкубировали с ферментом в среде D_2O, а затем выделяли яблочную и фумаровую кислоты и инкубировали их в H_2O в отсутствие фермента. При этом было найдено, что яблочная кислота содержала один атом дейтерия, а фумаровая кислота совсем не содержала дейтерия. Отсюда следовало, что дейтерий, присоединяющийся в результате прямой реакции, удаляется в ходе обратной реакции.

На основании исследования выделенной яблочной кислоты методом ядерно-магнитного резонанса, вначале считали, что —H и —OH присоединяются по двойной связи фумарата в *цис*-положении. Однако Анет [71] и Гаврон и Фонди [818] синтезировали *транс*-монодейтероябло́чную кислоту и, сравнив ее с формой, образуемой в фумаратгидратазной реакции, убедительно показали, что фермент осуществляет присоединение в *транс*-положении. Подобные же результаты были получены и для других гидролиаз. Энглард [696] пришел к такому же заключению независимым путем, на основании довольно сложных рассуждений, основанных на результатах опытов по переносу дейтерия в системе, содержащей цитратсинтетазу, аконитатгидратазу и изоцитратдегидрогеназу.

Олберти также рассматривал вопрос о том, как присоединяется молекула воды — в результате одностадийного процесса или же в две стадии, в виде ионов OH^- и H^+. Исходя из того, что гидратация фумарата протекает с одинаковой скоростью в D_2O и в H_2O, он пришел к заключению, что присоединение в виде ионов OH^- и H^+ исключается. Однако вполне вероятно, что в опытах Олберти скорость процесса лимитировалась начальной стадией, т. е. стадией образования фермент-субстратного комплекса, так как Олберти работал в «условиях первого порядка» (first order conditions), при относительно низких концентрациях субстрата. Если это действительно было так, то и не следовало ожидать различий в скорости. Позже было показано [2491], что в «условиях нулевого порядка» (zero order conditions) изотопный состав воды влияет на скорость реакции, хотя и не в сильной степени. Вопрос пока по-прежнему остается открытым; однако аналогия с действием фермента, рассматриваемого в следующем разделе, говорит в пользу того, что молекула воды присоединяется в результате одностадийного процесса.

АСПАРТАТ—АММИАК-ЛИАЗА

Поведение этого фермента весьма сходно с поведением фумаратгидратазы; оба фермента присоединяют группы по двойной связи фумарата и оба специфичны по отношению к L-форме и *цис*-конфигурации своих субстратов. Более того, оба фермента присоединяют атом водорода в том же самом положении, т. е. в *транс*-положении по отношению к группам NH_2 или OH соответственно [2988]. Если фумарат превращается аспартат — аммиак-лиазой в аспартат в среде D_2O, то образующийся из дейтероаспартата под действием азотистой кислоты дейтеромалат идентичен тому, который непосредственно образуется из фумарата в среде D_2O при действии фумаратгидратазы.

Присоединение аммиака, катализируемое аспартат — *аммиак-лиазой*, вряд ли можно рассматривать как последовательное присоединение двух ионов; его следует считать одностадийным *транс*-присоединением молекулы NH_3 по двойной связи.

Механизм действия изомераз

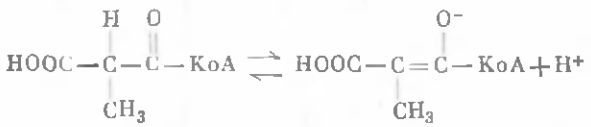
ЭПИМЕРАЗЫ

Эпимеразы катализируют D,L-превращения субстратов, имеющих более одного асимметрического центра. Диаминопимелат-эпимераза (5.1.1.7) действует на субстрат, у которого обе асимметрические группы относительно далеко отстоят друг от друга. Стереохимическую специфичность этого фермента исследовали Антиа, Хоаре и Ворк [80]. Фермент превращает L,L-форму в D,L-форму или *мезо*-форму, но он не катализирует взаимопревращения L,D- и D,D-форм. Это говорит о том, что фермент имеет два участка, взаимодействующих с молекулой субстрата; один из них соединяется с той частью субстрата, которая имеет L-конфигурацию, но не изменяет конфигурации этой части, а другой соединяется со второй частью субстрата независимо от ее конфигурации и вызывает D,L-превращение.

Асимметрический центр, на который действует альдозо-мутаротаза (5.1.3.3), представлен редуцирующей группой молекулы сахара. Механизм действия этого фермента изучили Бентли и Бете [207]. Они показали, что в ходе реакции не происходит обмена атома водорода при C-1 на дейтерий в среде D_2O или какой-либо потери $O^{18}H$ из 1-O^{18}-глюкозы. Замена атома водорода при C-1 на D не оказывает влияния на скорость эпимеризации. Эти данные, по-видимому, исключают механизм, предполагающий участие связанного с углеродом водорода в процессах дегидратации или дегидрогенирования, или механизм одиночного замещения с участием OH^-. Наиболее вероятным механизмом представляется перенос водорода, сопровождающийся промежуточным образованием альдегида с открытой цепью.

МЕТИЛМАЛОНИЛ-КоА—РАЦЕМАЗА

Этот фермент (5.1.99.a) отличается от остальных известных рацемаз в том отношении, что к углеродному атому в асимметрическом центре присоединены три других углеродных атома. Мазумдер и др. [1773] показали, что рацемизация не обусловлена прямым переносом кофермента А от одной карбоксильной группы к другой. Оверат и др. [2038] нашли, что при проведении реакции в T_2O атом водорода в асимметрическом центре обменивается на тритий; они считают, что эти данные говорят в пользу следующего механизма:

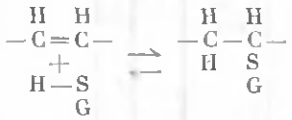


Образующаяся енольная форма имеет плоскую конфигурацию, и фермент может присоединять ион H^+ к любой стороне плоскости с образованием D- или L-формы.

ЦИС-ТРАНС-ИЗОМЕРАЗЫ

Под действием этих ферментов изменяется расположение групп в плоских молекулах. Некоторым из них в качестве кофактора необходим восстановленный глутатион. Присоединение глутатиона по двойной связи приводит

к образованию насыщенного соединения и позволяет осуществляться свободному вращению



Если затем глутатион удаляется, но не с тем атомом водорода, который первоначально присоединился, а с другим, то происходит рацемизация. Известно, что таким путем глутатион катализирует неферментативное взаимопревращение фумарата и малеата. Подобный механизм, однако, должен был бы приводить к включению дейтерия при проведении реакции в среде D_2O. Между тем в реакции, катализируемой малеилпируват-изомеразой (5.2.1.a) [1500], а также в соответствующей неферментативной реакции, катализируемой глутатионом, включения дейтерия не наблюдалось. Эти данные пока не получили удовлетворительного объяснения.

КЕТОЛ-ИЗОМЕРАЗЫ

Триозофосфат-изомераза (5.3.1.1) катализирует восстановление альдегидной или кетонной группы соседней CHOH-группой. Данные изотопных исследований [2220] показывают, что реакция не может протекать путем прямого внутримолекулярного переноса водорода, поскольку при проведении ее в среде T_2O наблюдается включение одного атома трития. Согласно предположению авторов, в ходе реакции образуется связанный с ферментом ион енолата. Опыты с триозофосфат-изомеразой и альдолазой (4.1.2. b) свидетельствуют о том, что эти ферменты удаляют различные водородные атомы CH_2OH-группы.

Аналогичные результаты получил Топпер [2671] в опытах с глюкозофосфат-изомеразой (5.3.1.9). Этот автор также постулирует образование в ходе реакции связанного с ферментом иона енолата. Топпер показал, что глюкозофосфат-изомераза и маннозофосфат-изомераза (5.3.1.8) удаляют различные водородные атомы CH_2OH-группы фруктозо-6-фосфата.

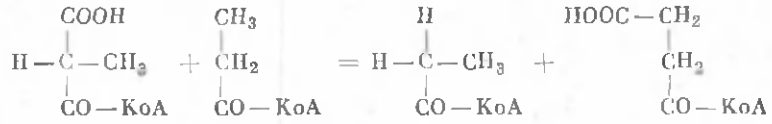
В более позднем исследовании Розе и О'Коннель [2247], подтвердив результаты Топпера, показали также, что фруктозо-6-фосфат, меченный тритием по С-1, превращается глюкозофосфат-изомеразой в глюкозо-6-фосфат, меченный тритием по С-2. Таким образом, наряду с включением трития из среды происходит также перенос трития от С-1 к С-2 в пределах одной молекулы. При низкой температуре внутримолекулярный перенос происходит значительно быстрее, чем включение из среды. Поэтому авторы предлагают несколько иной механизм реакции, предусматривающий перенос связанного с углеродом водорода (уходящего в среду при образовании иона енолата) к определенной группе фермента, которая относительно медленно обменивает его со средой. Этот же водород может затем быть перенесен с фермента к соседнему углеродному атому той же молекулы субстрата.

Δ-ИЗОМЕРАЗЫ

Стероид-Δ-изомераза (5.3.3.1) катализирует перемещение двойной связи из положения 4,5 в положение 5,6 (что предполагает миграцию атома водорода от С-6 к С-4). Механизм этой реакции исследовали Талалай и Ванг [2609], которые изучали также и неферментативный катализ соответствующего превращения (ионами H^+ и OH^-). В среде D_2O неферментативный процесс сопровождается включением дейтерия, тогда как ферментативная реакция (которая протекает в D_2O с такой же скоростью, как и в H_2O) не приводит к включению дейтерия. Это говорит о том, что фермент катализирует прямой внутримолекулярный перенос водородного атома от С-6 к С-4.

МЕТИЛМАЛОНИЛ-КоА—МУТАЗА

Раньше считали, что этот фермент катализирует превращение метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА путем межмолекулярного переноса карбоксильной группы с участием пропионил-КоА в качестве «кофактора»

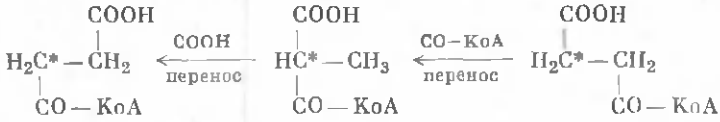


(VII.50)

В пользу этого говорило то обстоятельство, что меченый пропионил-КоА превращался в меченый сукцинил-КоА.

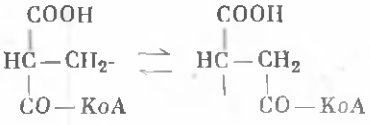
Однако Эггерер, Штадтман, Оверат и Линен [678] показали, что приведенное выше объяснение неправильно. Они установили, что включение пропионил-КоА в сукцинил-КоА в этих опытах было обусловлено присутствием в препарате фермента примеси пропионил-КоА—карбоксилазы (6.4.1.3) и что изомеризация осуществляется путем внутримолекулярного переноса.

Природа переноса была выяснена в опытах, в которых в качестве субстрата использовался метилмалонил-КоА, меченный по С-2; было показано, что при этом образуется сукцинил-КоА, меченный по С-3, так что процесс следует рассматривать как перенос CO — КоА-группы, а не COOH-группы:



(VII.51)

Данная изомераза нуждается в кобальтсодержащем кобамидном коферменте (производное витамина B_{12}, см. стр. 355). При изучении механизма некоторых неферментативных реакций изомеризации, катализируемых трехвалентным кобальтом, выяснилось, что при этих реакциях происходит образование свободных радикалов и миграция связанной с углеродом группы в пределах молекулы к свободной связи. По аналогии Эггерер и др. [678] предполагают, что и в ходе ферментативной реакции происходит образование свободных радикалов



Механизм действия лигаз

Метод изотопного обмена можно применить и для изучения более сложных по механизму синтетазных реакций, в которых образование связи между двумя молекулами сопряжено с разрывом связи в третьей молекуле. Это можно изобразить так:

$$A-B+X+Y=A+B+X-Y. \qquad (VII.52)$$

Механизм таких ферментативных реакций представляет большой интерес вследствие той важной роли, которая, вероятно, принадлежит этим реакциям в биосинтезе. Однако данный вопрос в то время, когда писалась эта книга, еще служил предметом оживленных дебатов, а потому мы не имеем возможности осветить его здесь исчерпывающим образом. Возможно, что не все сопряженные реакции такого типа осуществляются одним и тем же путем.

Постулировано несколько типов механизмов. Один из них предусматривает совместное действие киназы и фосфорилазы. Если, например, роль

соединения А — В в уравнении (VII.52) играет АТФ, то киназа может фосфорилировать X с образованием X — Ф и АДФ; X-трансфераза («фосфорилаза») будет тогда переносить X на Y с освобождением фосфата. В этом случае синтетазная реакция должна катализироваться двуферментной системой. Другие механизмы не включают последовательные реакции, осуществляемые разными ферментами. Один из них представляет собой трехстадийный перенос, происходящий у одного и того же активного центра, как будет объяснено ниже; другой механизм предполагает промежуточное образование смешанного ангидридациладенилата (см. стр. 270).

МЕХАНИЗМ ТРЕХСТАДИЙНОГО ПЕРЕНОСА

Трехстадийный перенос может быть представлен следующим образом:

$$A-B+E=A+B-E, \qquad \text{(VII.53)}$$

$$B-E+X=B+X-E, \qquad \text{(VII.54)}$$

$$X-E+Y=X-Y+E. \qquad \text{(VII.55)}$$

Первая стадия, как и прежде, представляет собой перенос группы В от первого субстрата А — В на фермент; вторая стадия состоит в переносе фермента от В на X, или, другими словами, в замещении присоединенного В на X; третья стадия представляет собой перенос X от фермента на Y. Суммарный процесс сводится к синтезу молекулы X — Y из X и Y за счет распада А — В на А и В. В синтетазных реакциях, приведенных в табл. 21, роль соединения А — В играет АТФ или (очень редко) другие нуклеозидтрифосфаты.

Таблица 21

МЕХАНИЗМЫ ТРЕХСТАДИЙНОГО ПЕРЕНОСА ДЛЯ СИНТЕТАЗНЫХ РЕАКЦИЙ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ РЕАКЦИИ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА

Случай а — промежуточным продуктом служит Е—Ф

(1) $АДФ-Ф+E=АДФ+E-Ф$

(2) $E-Ф+X=E-X+Ф$

(3) $E-X+Y=E+X-Y$

(4) $АДФ-Ф+АДФ^*=АДФ^*-Ф+АДФ$

Е катализирует, X тормозит

(5) $АДФ-Ф+Ф^*=АДФ-Ф^*+Ф$

Е + X катализирует, Y тормозит

(6) $X-Y+Y^*=X-Y^*+Y$

Е катализирует, Ф тормозит

(7) $X-Y+X^*=X^*-Y+X$

Е + Ф катализирует, АДФ тормозит

Случай б — промежуточным продуктом служит Е—АДФ

(8) $АДФ-Ф+E=Ф+E-АДФ$

(9) $E-АДФ+X=E-X+АДФ$

(10) $E-X+Y=E+X-Y$

(11) $АДФ-Ф+Ф^*=АДФ-Ф^*+Ф$

Е катализирует, X тормозит

(12) $АДФ-Ф+АДФ^*=АДФ^*-Ф+АДФ$

Е + X катализирует, Y тормозит

(13) $X-Y+Y^*=X-Y^*+Y$

Е катализирует, АДФ тормозит

(14) $X-Y+X^*=X^*-Y+X$

Е + АДФ катализирует, Ф тормозит

Продолжение табл. 21

Случай в — промежуточным продуктом служит Е—АМФ

(*15*) $АМФ—ФФ + Е = ФФ + Е—АМФ$

(*16*) $Е—АМФ + X = Е—X + АМФ$

(*17*) $Е—X + Y = Е + X—Y$

(*18*) $АМФ—ФФ + ФФ^* = АМФ—ФФ^* + ФФ$

Е катализирует, X тормозит

(*19*) $АМФ—ФФ + АМФ^* = АМФ^*—ФФ + АМФ$

Е + X катализирует, Y тормозит

(*20*) $X—Y + Y^* = X—Y^* + Y$

Е катализирует, АМФ тормозит

(*21*) $X—Y + X^* = X^*—Y + X$

Е + АМФ катализирует, ФФ тормозит

Этот механизм выведен на основании следующих наблюдений. Фермент способен катализировать реакцию изотопного обмена

$$A—B + A^* = A^*—B + A \qquad (VII.56)$$

в отсутствие X, Y и X — Y, но не способен катализировать реакцию

$$A—B + B^* = A—B^* + B. \qquad (VII.57)$$

Он будет также катализировать реакцию

$$X—Y + Y^* = X—Y^* + Y \qquad (VII.58)$$

в отсутствие A, B и A — B, но не будет катализировать реакцию

$$X—Y + X^* = X^*—Y + X. \qquad (VII.59)$$

Осуществления реакции (VII.56) следует ожидать в результате повторных обращений реакции (VII.53), а осуществления реакции (VII.58) — в результате повторных обращений реакции (VII.55). Неспособность фермента катализировать реакции (VII.57) и (VII.59) согласуется с правилом, которое гласит, что связанная с ферментом группа не обменивается, так как она не переходит в свободное состояние. Если, однако, наряду с A — B и B добавить X, то реакция (VII.57) *будет катализироваться*, так как она теперь может идти путем повторных обращений реакций (VII.53) и (VII.54). Подобно этому, добавление B к смеси фермента, X — Y и X* обеспечивает протекание реакции (VII.59), которая теперь идет через реакции (VII.54) и (VII.55).

Некоторые данные по торможению также могут быть использованы для подтверждения приведенного механизма. Так, добавление X способствует осуществлению реакции (VII.57), но наряду с этим тормозит реакцию (VII.56) вследствие уменьшения концентрации B — E. Сходным образом добавление A, B и Y тормозит реакции (VII.59), (VII.58) и (VII.57) вследствие уменьшения концентраций B — E, X — E и X — E соответственно.

Этот метод позволяет довольно точно идентифицировать связываемые с ферментом группы и определять последовательность переносов. С его помощью были получены интересные данные о механизме различных синтетазных реакций, в которых роль A — B играет АТФ. В различных случаях детали механизма могут быть совершенно различными. В частности, любая из двух пирофосфатных связей АТФ может быть использована как источник энергии для синтеза, так что АТФ может реагировать либо как АМФ — ФФ, либо как АДФ — Ф. Более того, любая часть молекулы может (по крайней мере теоретически) присоединяться к ферменту, т. е. играть роль B. Следовательно, теоретически возможны четыре различных случая, хотя образование E — ФФ в качестве промежуточного продукта не было постулировано

ни в одном реальном случае; три других случая представлены в табл. 21 с указанием соответствующих обменных реакций и ингибиторных эффектов. Следует отметить, что только немногие из этих эффектов были продемонстрированы для любой данной синтетазы.

γ-Глутамилцистеин-синтетаза (6.3.2.2) служит примером случая *а*. Было найдено [2812], что этот фермент катализирует обменные реакции

$$АДФ-Ф+АДФ^*=АДФ^*-Ф+АДФ \text{ (см. табл. 21, уравнение } 4),$$

$$\text{Глутамил-цистеин}+\text{Цистеин}^*=\text{Глутамил-цистеин}^*+\text{Цистеин}. \quad \text{(VII.60)}$$

Если глутамат также добавлен (только при этом условии!), то фермент катализирует обменную реакцию

$$АТФ+Ф^*=АТФ^*+Ф \text{ (см. табл. 21, уравнение } 5).$$

Добавление глутамата замедляет реакцию 4, а добавление цистеина замедляет реакцию 5 (табл. 21). Все это указывает, что механизм действия данного фермента относится к тому типу, который описывается случаем *а* в табл. 21 и может быть представлен в следующем виде:

$$АТФ+Е=АДФ+Е-Ф \text{ (табл. 21, уравнение } 1),$$

$$Е-Ф+\text{Глутамат}=Е-\text{Глутамат}+Ф, \quad \text{(VII.61)}$$

$$Е-\text{Глутамат}+\text{Цистеин}=Е+\text{Глутамил-цистеин}. \quad \text{(VII.62)}$$

Обменная реакция *4* (табл. 21) показывает, что фермент соединяется с фосфатной группой АТФ, а обменная реакция (VII.60) — что он соединяется с глутаматом (= X). Тот факт, что для обменной реакции *5* (табл. 21) необходим глутамат, показывает, что глутамат освобождает фосфатную группу из соединения с ферментом; это согласуется с уравнением (VII.61) и, между прочим, свидетельствует о том, что Е — Ф представляет собой весьма прочное соединение, которое спонтанно не гидролизуется. Тормозящее влияние, которое глутамат оказывает на реакцию *4* (табл. 21) и на включение АДФ * в АТФ, объясняется уменьшением концентрации Е — Ф и, следовательно, замедлением реакции, обратной реакции *1*; присутствие цистеина (=Y), уменьшая концентрацию комплекса Е — глутамат, замедляет реакцию, обратную (VII.61), и, следовательно, также реакцию *5*.

Эти данные представляют убедительный аргумент в пользу механизма трехстадийного переноса. Вначале концевая фосфатная группа АТФ переносится из соединения с АДФ на фермент, затем фермент переносится от фосфата на глутамат и, наконец, глутамат переносится от фермента на цистеин. Фермент-фосфатная связь, очевидно, сохраняет достаточно свободной энергии (имевшейся в исходной пирофосфатной связи) для осуществления синтеза глутамилцистеина. По тому же механизму *а* (табл. 21) функционирует, по-видимому, и глутатионсинтетаза (6.3.2.3) [2462].

Вполне вероятно, что и другие синтетазы функционируют по механизму трехстадийного переноса. Для ряда ферментов были опубликованы данные, которые говорят в пользу того или иного из механизмов, приведенных в табл. 21; однако некоторые из этих данных оказались впоследствии ошибочными. Присутствие загрязнений в препаратах фермента или в субстрате особенно сильно влияет на результаты изотопных исследований, так как в этих опытах заключения о механизме реакции часто строят на том, идет или нет изотопный обмен в отсутствие того или иного субстрата. Известны случаи, когда с недостаточно хорошо очищенными препаратами ферментов обнаруживался изотопный обмен, но эти результаты не удавалось воспроизвести после дальнейшей очистки фермента. В других случаях было установлено, что обмен фосфат — АТФ зависит от присутствия следов АДФ в АТФ или же обмен АТФ — АДФ зависит от примеси фосфата.

МЕХАНИЗМЫ С ОБРАЗОВАНИЕМ ТРОЙНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Иногда экспериментальные данные явно свидетельствуют о том, что механизмы реакций несколько сложнее тех, которые обсуждались в предыдущем разделе. В этих случаях необходимо постулировать образование комплекса фермента с *двумя* реагентами. Сукцинил-КоА — синтетаза из растений (6.2.1.5) [1316] катализирует реакцию изотопного обмена

$$\text{Сукцинил-КоА} + \text{Сукцинат}^* = \text{Сукцинил}^*\text{-КоА} + \text{Сукцинат} \qquad \text{(VII.63)}$$

только в присутствии фосфата, что предполагает механизм типа *а* (табл. 21) с сукцинатом в роли X. Найдено, однако, что для реакции изотопного обмена (табл. 21, уравнение *5*), которая должна была бы катализироваться ферментом в присутствии сукцината, необходимо также присутствие кофермента А. Для того чтобы объяснить это обстоятельство, отличающее данный случай от «нормальных», Кауфман [1316] предлагает следующий механизм:

$$\text{АДФ}-\Phi + \text{E} = \text{АДФ} + \text{E}-\Phi \text{ (табл. 21, уравнение 1)},$$

$$\text{E}-\Phi + \text{КоА} = \text{E(КоА}-\Phi), \qquad \text{(VII.64)}$$

$$\text{E(КоА}-\Phi) + \text{Сукцинат} = \text{E} + \text{Сукцинил-КоА} + \Phi. \qquad \text{(VII.65)}$$

Другие возможности — промежуточное образование сукцинилфосфата или КоА-фосфата — были исключены.

Подобный, но несколько более сложный случай обнаруживается при действии формилтетрагидрофолат-синтетазы (6.3.4.3). Для этого фермента была предложена [1229] следующая схема реакций:

$$\text{АДФ}-\Phi + \text{E} = \text{E}-\Phi + \text{АДФ}, \qquad \text{(VII.66)}$$

$$\text{E}-\Phi + \text{ТГФК} = \text{E(ТГФК}-\Phi), \qquad \text{(VII.67)}$$

$$\text{E(ТГФК}-\Phi) + \text{Формиат} = \text{E(формил}-\text{ТГФК}-\Phi), \qquad \text{(VII.68)}$$

$$\text{E (формил}-\text{ТГФК}-\Phi) = \text{E} + \text{Формил}-\text{ТГФК} + \Phi. \qquad \text{(VII.69)}$$

Иначе обстоит дело, когда фермент содержит простетическую группу, которая связывает один из реагентов (например, биотин при действии карбоксилаз подгруппы 6,4; см. также стр. 364). Действие двух таких ферментов было детально изучено Линеном и др. [1639] и группой Очоа [1325]. В этих работах в опровержение ранних гипотез было показано, что реакции обмена фосфат — АТФ и АДФ — АТФ зависят от присутствия всех компонентов систем, за исключением карбоксилсодержащего акцептора. Для действия пропионил-КоА — карбоксилазы (6.4.1.3) был предложен [1325] следующий механизм:

$$\text{АДФ}-\Phi + \text{E} + \text{CO}_2 = (\text{АДФ}-\Phi-\text{E}-\text{CO}_2), \qquad \text{(VII.70)}$$

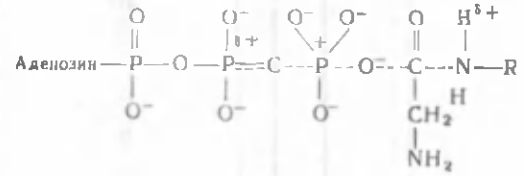
$$(\text{АДФ}-\Phi-\text{E}-\text{CO}_2) = \left(\begin{bmatrix}\text{АДФ}\\ \Phi\end{bmatrix}\text{E}\sim\text{CO}_2\right), \qquad \text{(VII.71)}$$

$$\left(\begin{bmatrix}\text{АДФ}\\ \Phi\end{bmatrix}\text{E}\sim\text{CO}_2\right) + \text{Пропионил-КоА} = \text{E} + \text{АДФ} + \Phi + \text{Метилмалонил-КоА}. \qquad \text{(VII.72)}$$

В этих уравнениях E обозначает биотинсодержащий фермент, а $\text{E}\sim\text{CO}_2$ — карбоксибиотин в составе фермента. На стадии (VII.71) происходит расщепление АТФ с одновременным обогащением энергией соединения фермент — CO_2, так что это наиболее важный этап синтетазной реакции.

Для объяснения действия фосфорибозилглицинамид-синтетазы Хартман и Буханан [1016] предложили схему, согласно которой собственно синтетазная стадия осуществляется в пределах четверного комплекса, содер-

жащего все субстраты и фермент. Реакция, рассматриваемая как сочетанная атака, может быть представлена следующим образом:



где R — фосфорибозильная группа. Электрофильная атака карбоксильной группы фосфатом АТФ облегчает нуклеофильную атаку, осуществляемую аминогруппой фосфорибозиламина, что приводит к линейному смещению электронов с образованием связи CO—NH и одновременным расщеплением связи АДФ—Ф. Хартман и Буханан предполагают, что этот механизм может быть весьма распространенным; Линен и др. [1639] рассмотрели под этим углом зрения действие метилкротонил-КоА — карбоксилазы (6.4.1.4). В этом случае роль RNH_2 в приведенной выше схеме может, очевидно, играть связанный с ферментом биотин.

Предполагается, что существует еще один механизм, свойственный некоторым важным синтетазам. Этот механизм, впервые постулированный Бергом [212, 213] для ацетил-КоА — синтетазы (6.2.1.1), предусматривает образование промежуточного продукта ацил-АМФ:

$$\text{АМФ} - \text{ФФ} + \text{Ацетат} = \text{Ацетил-АМФ} + \text{ФФ}, \qquad \text{(VII.73)}$$

$$\text{Ацетил-АМФ} + \text{КоА} = \text{Ацетил-КоА} + \text{АМФ}. \qquad \text{(VII.74)}$$

Такой механизм согласуется, во-первых, с тем, что и ацетат и кофермент А необходимы для осуществления обмена АМФ — АТФ, и, во-вторых, с тем, что для реакции обмена ацетат — ацетил-КоА необходимы АМФ и пирофосфат. Ни одним из механизмов, приведенных в табл. 21, эти факты объяснить нельзя.

Ацетил-АМФ был получен химическим путем и было показано, что ацетил-КоА — синтетаза катализирует реакцию

$$\text{Ацетил-АМФ} + \text{ФФ} \longrightarrow \text{АТФ} + \text{Ацетат} \qquad \text{(VII.75)}$$

приблизительно с той же скоростью, как и обмен ФФ — АТФ в присутствии ацетата. Фермент катализирует также образование ацетил-КоА из ацетил-АМФ.

Бойер и др. [306] установили, что при протекании реакции

$$\text{АТФ} + \text{Ацетат} + \text{КоА} \longrightarrow \text{АМФ} + \text{ФФ} + \text{Ацетил-КоА} \qquad \text{(VII.76)}$$

с ацетатом, содержащим O^{18} в карбоксильной группе, O^{18} включается в фосфатную группу образующегося АМФ. Аналогичные результаты были позднее получены и в опытах с рядом других синтетаз. Эти данные рассматривались как доказательство в пользу механизма Берга. Нам кажется, однако, что их можно согласовать и с механизмом трехстадийного переноса. Так как связь Е—КоА должна быть богата энергией, для того чтобы мог осуществиться синтез, то естественно предположить, что SH-группа КоА соединяется с карбоксильной группой фермента. Два кислородных атома карбоксильной группы ацетата в химическом отношении эквивалентны вследствие ионизации, и, следовательно, оба эти атома можно считать мечеными.

Мы можем представить себе весь процесс следующим образом. Если в исходном состоянии имеются АТФ, фермент и КоА, то в результате реакций *15* и *16* (табл. 21) вначале будет образовываться немеченый Е—КоА, который мы в соответствии со сделанным выше допущением обозначим через

E — CO — S — KoA. Далее будут следовать перечисленные ниже стадии:

$$\begin{array}{l} E-CO-S-KoA \\ HO^*-CO^*-CH_3 \end{array} = \begin{array}{l} E-CO \quad S-KoA \\ \quad | \qquad\quad | \\ HO^* \quad CO^*-CH_3 \end{array} \qquad \text{(VII.77)}$$

$$E-CO-O^*H = E-CO^*-O^*H \qquad \text{(VII.78)}$$

$$\begin{array}{l} E-CO^* \\ \quad | \\ AMP \quad O^* \\ \quad | \quad\ | \\ FF-O \quad H \end{array} = \begin{array}{l} E-CO^* \\ \quad | \\ AMP-O^* \\ \quad | \\ FF-O-H \end{array} \qquad \text{(VII.79)}$$

$$\begin{array}{l} E-CO^* \quad HS-KoA \\ \quad | \\ AMP-O^* \end{array} = \begin{array}{l} E-CO^*-S-KoA \\ \quad | \\ AMP-O^*-H \end{array} \qquad \text{(VII.80)}$$

Если этот механизм правилен, то O^{18} должен включаться в АМФ. Следует отметить, что в реакциях (VII.79) и (VII.80) образование и разрыв связей происходят с разных сторон по отношению к связующему атому кислорода. Однако это же обстоятельство характерно и для механизма Берга; действительно, только таким путем можно объяснить появление O^{18} в АМФ.

Принцип Берга был широко использован при рассмотрении действия «ферментов, активирующих аминокислоты» (лигазы, образующие аминоацил-РНК; подгруппа 6.1.1.). Для этой цели синтетическим путем были получены пятнадцать различных аминоацил-АМФ [1845]. В водном растворе эти кислотные ангидриды быстро превращаются в 2′- или 3′-аминоацил-АМФ-эфиры. Ангидриды отличаются чрезвычайно высокой реакционной способностью; все они в присутствии пирофосфата и триптофанил-*s*-РНК — синтетазы или метионил-*s*-РНК — синтетазы образуют АТФ; следует отметить, что когда реакция идет в прямом направлении, оба упомянутых фермента абсолютно специфичны по отношению к одной определенной L-аминокислоте. Интересно также, что первый фермент более быстро катализирует образование АТФ за счет D-триптофанил-АМФ, чем за счет L-формы, хотя сродство фермента к L-триптофанил-АМФ существенно выше, чем к любому другому аминоацил-АМФ [1469]. Аминоацил-АМФ-ангидриды могут неферментативно переносить остаток аминокислоты на различные акцепторы, включая аммиак, гидроксиламин, аминокислоты, белки и РНК. Эфирные формы менее реакционноспособны; хотя эти формы и реагируют с гидроксиламином, они не образуют АТФ за счет пирофосфата в присутствии активирующих ферментов.

Донором аминокислоты при ферментативном синтезе аминоацил-*s*-РНК не может служить аминоацил-АМФ в свободном состоянии. В качестве промежуточного продукта образуется, по-видимому, аминоацил-АМФ-ангидрид, связанный с ферментом; Уонг и Молдейв [2907] продемонстрировали включение в комплекс с триптофанил-*s*-РНК — синтетазой как АМФ, так и остатка аминокислоты. В этих опытах они исходили из L-триптофана и АТФ либо *из синтетического продукта L-триптофанил-АМФ. Перенос* аминокислотного остатка от связанного с ферментом промежуточного продукта высокоспецифичен; в каждом случае этот остаток переносится только на определенную *s*-РНК, причем образуется аминоацил-*s*-РНК, у которой аминокислота присоединена эфирной связью к 2′- или 3′-гидроксилу рибозы *концевого аденилатного остатка.*

Механизм действия металлоферментов

Ферментативная активность часто зависит от присутствия атома металла. В истинных металлоферментах этот атом, являясь составной частью собственно фермента, прочно связан либо с некоторыми группами в белке,

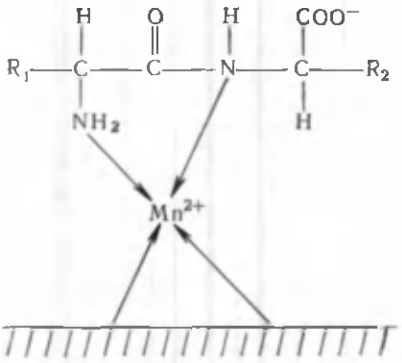
либо с какой-то простетической группой, например порфирином. В других случаях необходимо добавлять ионы некоторых металлов, для того чтобы «активировать» фермент. Различие может состоять лишь в прочности соединения; в тех случаях, когда к ферменту необходимо добавлять металл, последний обычно легко удаляется либо путем диализа, либо при осаждении белка, и, чтобы сохранить фермент в форме активного «металлофермента», необходимо бывает поддерживать определенную концентрацию свободного активирующего иона.

Иногда металл-активатор может соединяться не с ферментом, а с субстратом; в этом случае истинным субстратом фермента будет продукт соединения металла с субстратом, а не само добавленное к системе вещество.

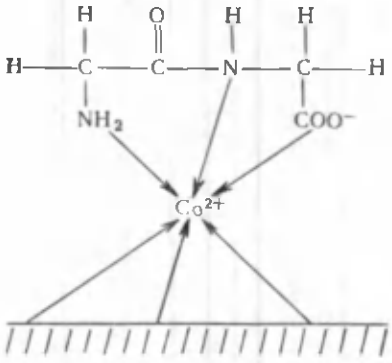
Активация ферментов металлами и другими ионами детально обсуждается в гл. IX. Здесь мы рассмотрим четыре группы металлоферментов, относительно механизма действия которых уже имеются некоторые данные.

ПЕПТИДАЗЫ, АКТИВИРУЕМЫЕ МЕТАЛЛАМИ

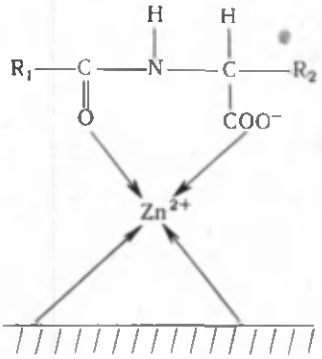
Ряд пептидаз содержит атомы металла или же нуждается в их присутствии; в отсутствие металла эти ферменты неактивны. Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) содержит цинк [2710], глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1) нуждается в кобальте, лейцинаминопептидаза (3.4.1.1) — в марганце или магнии. Смит предположил (воспользовавшись ранее высказанным предположением Хеллермана относительно аргиназы [1057, 1058]), что эти металлы действуют, образуя хелатные соединения с двумя или более группами фермента (см., например, [2443, 2447]). Учитывая данные по специфичности ферментов, он смог предложить определенные структуры фермент-субстратных комплексов, например для действия лейцинаминопептидазы на дипептид



или для действия глицилглицин-дипептидазы



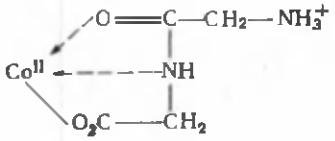
или для действия карбоксипептидазы А



Эти схемы показывают только связи субстрата с металлом; для того чтобы объяснить специфичность ферментов, необходимо постулировать наличие других связей, непосредственно между R-группами субстрата и ферментным белком.

Следует отметить, что при действии лейцинаминопептидазы металл соединяется с концевой аминогруппой субстрата, а при действии карбоксипептидазы — с концевой карбоксильной группой; иными словами, он соединяется с теми самыми группами, с которыми взаимодействуют названные ферменты, как это известно из данных по их специфичности. Для действия дипептидазы необходимы обе концевые группы. Лейцинаминопептидаза и глицилглицин-дипептидаза действуют только на пептиды и не действуют на эфиры аминокислот; поэтому на схеме показано, что во взаимодействии участвует NH-группа пептидной связи. Карбоксипептидаза действует на некоторые сложные эфиры со свободной концевой карбоксильной группой, и, следовательно, для ее действия NH-группа не является необходимой; для этого случая на схеме показано образование хелатной связи с кислородом карбонила.

Механизм, предложенный Смитом для действия глицилглицин-дипептидазы, основывается частично на явном параллелизме между способностью фермента гидролизовать субстрат и способностью иона двухвалентного кобальта образовывать координационное соединение с субстратом, о чем можно судить по изменению спектра поглощения. Было, однако, показано [836], что спектр, наблюдавшийся в опытах Смита, принадлежал не комплексу двухвалентного кобальта, а комплексу трехвалентного кобальта, т. е. соединению, не гидролизуемому ферментом. Уильямс [2869] критически рассмотрел ряд формулировок Смита и в некоторых случаях предложил альтернативные объяснения. Одно из его возражений сводится к тому, что комплекс, образуемый координационными связями между атомом кобальта и атомами азота (см. приведенную выше схему), легко подвергается окислению. Уильямс считает, что следует предпочесть вариант, предусматривающий образование комплекса кобальта с атомами кислорода и азота. Он предлагает следующую схему комплекса для глицилглицин-дипептидазы:



Остается неясным, в чем состоит та особенность постулируемого Смитом комплекса, которая приводит к разрыву чувствительной связи в субстрате. Клотц [1400] высказал мнение, что образование комплекса по типу, ука-

занному Смитом, может скорее стабилизировать субстрат, нежели облегчить его распад. Он считает, что истинная функция металла, возможно, заключается в том, чтобы соединяться не с нормальной, а с активированной формой субстрата, облегчать активацию путем притяжения гидроксильного иона и таким образом катализировать реакцию.

ЦИНКСОДЕРЖАЩИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Валлей [2708] показал, что ряд нефлавопротеидных дегидрогеназ, и в частности алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) и глутаматдегидрогеназа (1.4.1.3), содержат цинк [2708]. Цинк входит как составная часть в структуру молекулы фермента. В каждом активном центре имеется один атом цинка. Вследствие этого число атомов цинка равно числу молекул НАД, связываемых молекулой фермента.

Дрожжевая алкогольдегидрогеназа (молекулярный вес 151 000) содержит 4 атома цинка на молекулу и связывает 4 молекулы НАД, тогда как фермент из печени (молекулярный вес 84 000) содержит 2 атома цинка и связывает 2 молекулы НАД. Удаление цинка (в результате обработки агентами, образующими комплекс с этим металлом) вызывает как у алкогольдегидрогеназы, так и у глутаматдегидрогеназы не только инактивацию, но также и диссоциацию белковой части фермента на субъединицы; так, например, дрожжевая алкогольдегидрогеназа (содержащая 4 атома цинка на молекулу) при удалении цинка диссоциирует на 4 неактивные субъединицы с молекулярным весом 36 000 [1281].

Высказывались различные предположения для объяснения действия цинка. Известно, что цинк может связываться с НАД, с тиоловыми группами в белках и с рядом соединений, которые служат субстратами ферментов. Роль цинка в составе рассмотренных дегидрогеназ, несомненно, имеет отношение к связыванию либо субстратов с активным центром, либо белковых субъединиц друг с другом.

МЕТАЛЛФЛАВОПРОТЕИДЫ

В 1950 г. Альберт [30] (см. также [31]) показал, что рибофлавин, содержащий группировку, похожую на хорошо известный хелатообразующий агент 8-оксихинолин, обладает способностью связывать двухвалентные ионы тяжелых металлов. От обычных хелатообразующих агентов рибофлавин отличается очень высоким сродством к Fe^{2+}; о его соединении с Fe^{3+} данных не имеется. Фойе и Ланге [767] выделили ряд металлрибофлавиновых хелатов. Эти соединения содержат два атома металла на молекулу флавина; каким образом эти атомы присоединены, пока не ясно.

Альберт первым высказал предположение, что активность некоторых рибофлавиновых ферментов может быть связана с содержащимися в них ионами металлов, и это было позднее подтверждено в ряде случаев. Некоторые, но отнюдь не все, флавопротеидные ферменты содержат атомы тяжелых металлов: железо, молибден, медь или марганец. Обычно оказывается, что на каждую флавиновую группу приходится один атом тяжелого металла. но иногда, помимо присутствующих атомов других металлов, находят также железо (в количестве до нескольких эквивалентов на один эквивалент флавина), и оно, очевидно, не может присутствовать в форме комплекса с флавином.

Все металлфловопротеидные ферменты относятся к дегидрогеназам; некоторые из них могут действовать с различными акцепторами, однако среди них имеются и такие, для которых необходимо присутствие фосфата. Показано, что, в то время как для восстановления одних акцепторов необходим металл, восстановление других может происходить в отсутствие металла.

Часто оказывается возможным удалить металл, например путем диализа против цианида, слабой щелочи, тиоцианата или 8-оксихолина. В результате получается свободный от металла фермент, который утратил способность реагировать с некоторыми акцепторами, например с цитохромом *c*, феррицианидом или нитратом, но еще сохранил свою первоначальную способность восстанавливать такие акцепторы, как O_2, красители, хиноны и коферменты. Действие металла, следовательно, не связано с активацией донора водорода. Можно восстановить всю первоначальную активность, инкубируя свободный от металла фермент с соединением соответствующего металла; другие металлы при этом обычно неэффективны.

Ксантиноксидаза молока (1.2.3.2) и альдегидоксидаза печени (1.2.3.1), представляющие собой молибденфлавопротеиды, обычно восстанавливают все упомянутые выше акцепторы. Грин и его сотрудники утверждают, что после удаления молибдена в результате диализа против щелочного раствора эти ферменты теряют способность восстанавливать цитохром *c*, нитрат и феррицианид, хотя они еще нормально реагируют с другими акцепторами [1665, 1686]. Утраченная активность восстанавливается после инкубации с соответствующим соединением молибдена; активность может быть также частично восстановлена в результате инкубации ксантиноксидазы с соединениями урана, а альдегидоксидазы — с соединениями вольфрама. Химия соединений молибдена сложна, и неясно, что является истинным активатором; такие простые соединения, как MoO_3 или MoO_4^{2-}, сами по себе неэффективны, и для проявления их активирующего действия необходимо присутствие фосфата или силиката. Это указывает на то, что в действительности активация вызывается фосфомолибдатом или силикомолибдатом [853]. Нитратредуктаза из *Neurospora* нуждается в фосфате; последний можно полностью заменить селенатом, теллуратом или арсенатом и в меньшей степени сульфатом или силикатом [1966].

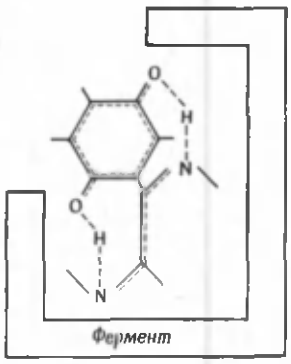
Брай и др. [320] с помощью методов электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и определения магнитной восприимчивости исследовали ксантиноксидазу (1.2.3.2), молибден- и железосодержащий флавопротеид.

При исследовании фермента методом электронного парамагнитного резонанса были получены сигналы, обусловленные семихиноном флавина, Mo^{V} и Fe^{II}. Как и в липоамиддегидрогеназной реакции (см. стр. 249), субстрат в этом случае восстанавливает флавин не прямо, а в две одноэквивалентные стадии — вначале до семихинона, а затем до ФАД·H_2. Молибден, вероятно, также восстанавливается в две одноэквивалентные стадии — от Mo^{VI} до Mo^{V}, а затем до Mo^{IV}, так как сигнал Mo^{V} при полном восстановлении исчезает. Имеется ряд данных о том, что и железо подвергается восстановлению из Fe^{III} в Fe^{II} [317]. Однако Брай и его сотрудники нашли, что наиболее сильные сигналы получаются в случае неактивного фермента; поэтому они указывают на необходимость соблюдения большой осторожности при интерпретации такого рода данных.

Что касается участия железа в функционировании металлфлавопротеидов, то имеющиеся на этот счет сведения невозможно интерпретировать однозначно. В случае НАД·H_2 : цитохром-*c*-редуктазы (1.6.2.1) для реакции с красителями не требуется железа; оно необходимо только для реакции с цитохромом. Железо можно удалить диализом против 8-оксихинолина, а затем фермент можно частично реактивировать, добавив к нему Fe^{3+} (Fe^{2+} не только не вызывает такого эффекта, но, напротив, ведет себя как сильный ингибитор [1682]). Сингер и Массей [2414] привели данные о том, что связанное с ферментом железо находится полностью в окисной форме и не претерпевает изменения валентности в результате окисления — восстановления. Массей [1747] показал, что железо, связанное с сукцинатдегидрогеназой, обычно находится в окисной форме; никаких веских данных в пользу того, что его валентность при действии фермента меняется, в сущ-

ности, нет. Более того, половину железа можно удалить без потери активности. Из ацил-КоА-дегидрогеназы (1.3.2.2) можно удалить почти все железо без того, чтобы это как-либо повлияло на ее активность.

Мэлер [1683, 1684] высказал предположение, что металл необходим для реакции с теми акцепторами, для восстановления которых требуется только один эквивалент водорода, между тем как акцепторы, для восстановления которых требуется два эквивалента, могут восстанавливаться и в отсутствие металла. Легко представить себе, почему это может быть именно так. В системе, в которой участвуют только двухэквивалентные реагенты, восстановление может легко протекать путем одновременного переноса двух атомов водорода по механизму, представленному в уравнении (VII.17) для восстановления кофермента. Интересно отметить, что при восстановлении флавинов восстановленным коферментом расстояние между переносимыми водородными атомами существенно не изменяется в процессе переноса от одной молекулы к другой, так что при этом возможно образование стабилизированного резонансом промежуточного продукта, принадлежащего к тому типу, который мы рассмотрели ранее. Те же рассуждения приложимы к дальнейшему переносу на двухэквивалентные акцепторы, которые взаимодействуют с флавопротеидами. Мэлер и Глен [1683] схематично представляют переходное состояние при восстановлении хинона флавопротеидным ферментом, как показано на фиг. 73.



Фиг. 73. Схематическое изображение переходного состояния при восстановлении хинона флавопротеидным ферментом [1683].

В то же время восстановление одноэквивалентного акцептора двухэквивалентным донором объяснить значительно труднее, так как если только при этом не происходит тримолекулярной реакции, то донор может быть окислен лишь в результате двух последовательных реакций; первая из них — это его окисление до свободного радикала, а вторая — окисление образовавшегося свободного радикала за счет второй молекулы акцептора. Следовательно, если донор не способен образовывать свободный радикал, то единственный возможный путь состоит в образовании тримолекулярного комплекса. Флавины отличаются от большинства окислительно-восстановительных красителей тем, что они легко образуют полувосстановленные свободные радикалы (*семихиноны*) [196, 197, 1483, 1813]. Поэтому можно ожидать, что они должны играть роль посредников между одно- и двухэквивалентными системами. Например, можно представить себе, что флавиновая группа цитохромредуктазы одновременно присоединяет два атома водорода от дегидрогеназной системы, а затем передает их по одному на цитохром.

Однако способность флавопротеидов образовывать семихиноны сама по себе, вероятно, недостаточна для осуществления такого рода связи между системами, хотя свободные флавины и могут выполнять эту роль [2412]. Как уже упоминалось, некоторые флавопротеиды восстанавливают одноэквивалентные акцепторы только после присоединения металла. Это может облегчить осуществление реакции в силу трех причин:

1. Таким способом может облегчаться образование семихинона; другими словами, связанная с металлом координационными связями флавиновая группа может образовывать семихинон даже легче, чем это делает свободный флавин.

2. Металл может действовать как переносчик между флавином и одноэквивалентным акцептором.

3. Металл может стабилизировать тримолекулярный комплекс флавина с двумя молекулами акцептора, и весь процесс окисления — восстановления будет осуществляться внутри этого комплекса; в этом случае образование семихинона флавина не представляется необходимым [1683].

Все эти предположения выдвигались в различное время как возможные объяснения потребности в металле, но до сих пор еще не имеется достаточных данных, чтобы можно было решить, какое из них соответствует действительности.

Разделение акцепторов на две группы — одну, содержащую одноэквивалентные акцепторы, для восстановления которых требуется металл, и другую, содержащую двухвалентные акцепторы, для восстановления которых металла не требуется,— в действительности не является достаточно четким. Восстановление нитрата до нитрита требует не одного, а двух эквивалентов, и все же для этого процесса необходим молибден. Это пытались объяснить либо тем, что восстановление может фактически осуществляться в ходе двух одноэквивалентных стадий (хотя такое предположение ничем не доказано), либо тем, что нитрат, представляющий собой слабый окислитель, может нуждаться в активации для того, чтобы функционировать как акцептор, а эта активация осуществляется в результате комплексирования с металлом. В то же время многие из акцепторов, описанные здесь как двухвалентные, несомненно, могут образовывать такие промежуточные формы, как семихиноны, и, следовательно, могут восстанавливаться в ходе двух одноэквивалентных стадий; тем не менее они не требуют для своего восстановления присутствия металла. Ряд таких веществ может свободно реагировать с одноэквивалентными системами в отсутствие ферментов; гидрохинон, например, легко окисляется до хинона цитохромом *с*.

Наличие металла в металлфлавопротеидах не всегда связано с восстановлением одноэквивалентных акцепторов. Высокоочищенная ксантиноксидаза из печени едва ли может реагировать с цитохромом *с* или феррицианидом, хотя она содержит один атом молибдена и четыре атома железа на флавиновую группу; дополнительное введение в систему железа, молибдена и флавина в данном случае не оказывает влияния [1373]. Подобные же результаты были получены с кристаллической ксантиноксидазой молока [106].

Ряд молибденфлавопротеидов и других ферментов содержит различное количество железа — от 40 атомов на флавиновую группу в сукцинатдегидрогеназе из *Micrococcus* до $^1/_8$ атома или меньше в ацил-КоА-дегидрогеназе. Железо, конечно, легко связывается белками, особенно по SH-группам, так что не ясно, имеет ли оно в этих ферментах какое-либо функциональное значение.

Очевидно, что в настоящее время положение отнюдь еще нельзя считать удовлетворительным, и необходимо получить дополнительные данные, прежде чем нам удастся составить себе ясное представление относительно функции металла в металлфлавопротеидах.

ГЕМОПРОТЕИДНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Некоторые ферменты, специфически действующие на перекись водорода или ее производные, а именно каталазы и пероксидазы, содержат феррипротопорфириновые (гематиновые) простетические группы. Действие этих ферментов отличается от действия дегидрогеназ или ферментов системы цитохромов тем, что их простетическая группа непосредственно участвует в активации субстрата. Эти ферменты катализируют окисление различных веществ перекисью водорода; пероксидазы окисляют большое число веществ, включая фенолы, цитохром *с*, нитрит и лейкоформу малахитового зеленого, но не окисляют саму H_2O_2 или спирты; каталазы окисляют саму H_2O_2 (кото-

рая, следовательно, действует двояким образом), а также этиловый спирт, но не действуют на большую часть веществ, окисляемых пероксидазами. Каталазы могут рассматриваться как пероксидазы с иной специфичностью; механизм же действия обеих групп ферментов, по-видимому, в общих чертах одинаков. Приводимые ниже данные относятся главным образом к пероксидазе из хрена (1.11.1.7).

В гл. IV мы упоминали, что пероксидаза образует комплексы с H_2O_2, которые могут быть обнаружены спектроскопически, и что кинетика образования и распада этих комплексов служит источником данных по количественной характеристике ферментативного катализа. Различают четыре типа комплексов. Комплекс I образуется сразу при добавлении H_2O_2; это — нестойкое соединение зеленого цвета, которое обычно быстро превращается в красный комплекс II. В ранних работах Чанса [418] по кинетике действия пероксидазы (см. гл. IV, стр. 96) изучался, в сущности, только комплекс II; однако в более поздних его работах [421] измерения давали возможность проследить образование и распад обоих комплексов, а также их взаимопревращения. Комплексы III и IV представляют собой соединения красного цвета, образующиеся при избытке H_2O_2. Эти комплексы не обладают каталитической активностью, и их образование ведет к торможению реакции. При рассмотрении механизма ферментативного катализа мы можем ограничить наше внимание комплексами I и II.

Превращение комплекса I в комплекс II протекает быстрее в присутствии донора водорода (полифенол, нитрит и т. п.), и можно, следовательно, предположить, что донор участвует в образовании продукта реакции. Суммарный процесс можно в таком случае представить следующими уравнениями, которые выведены на основании изучения кинетики ферментативного катализа [421]:

$$E + H_2O_2 \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES_I, \qquad \text{(VII.81)}$$

$$ES_I + AH_2 \xrightarrow{k_{+2}} ES_{II} + \text{-}AH, \qquad \text{(VII.82)}$$

$$ES_{II} + AH_2 \xrightarrow{k_{+3}} E + \text{-}AH, \qquad \text{(VII.83)}$$

$$2\text{-}AH \longrightarrow A + AH_2. \qquad \text{(VII.84)}$$

Эти реакции написаны для двухвалентного донора AH_2, и так как оба перехода (от ES_I к ES_{II} и от ES_{II} к E) представляют собой одноэквивалентные процессы, то необходимо постулировать образование свободного радикала (-AH); имеющиеся данные подтверждают, что такие радикалы действительно образуются [2938]. Приведенные выше уравнения не предусматривают характеристики химической природы ES_I и ES_{II}. Можно только отметить, что ES_I обладает двумя дополнительными окисляющими эквивалентами по сравнению с ферментом, а ES_{II} — только одним. Это было установлено путем титрования ферроцианидом [821].

Для изучавшихся доноров водорода k_{+2} значительно больше k_{+3}, так что V определяется реакцией (VII.83). Это объясняет переходную природу комплекса ES_I и те неудачи при попытках обнаружить его, с которыми сталкивались в более ранних работах. Фермент-субстратным комплексом, существование которого могло бы быть предсказано по данным кинетики катализируемой ферментом реакции, является в действительности комплекс ES_{II}.

Что касается химической природы обоих комплексов, то следует отметить, что существуют две школы, придерживающиеся разных взглядов. Чанс считает, что комплекс I представляет собой $Fe_p^{3+}(H_2O_2)$, т. е. продукт присоединения фермента к H_2O_2; индекс p означает, что железо является

частью гемопротеидного фермента. Комплекс II рассматривается как Fe_p^{3+} (OH·), *где группа* (OH·) *служит просто символом для обозначения* полувосстановленной H_2O_2, так как спектры ЭПР показывают, что в действительности комплекс II не содержит свободного радикала. Следовательно, в формулировке Чанса *природа комплекса II является неопределенной.*

В то же время Георг [821, 822] считает, что H_2O_2 окисляет железо в ферменте до более высокого валентного состояния, чем то, которое находят обычно, и предполагает, что комплекс I *содержит пятивалентное, а комплекс* II четырехвалентное железо: «Существует несколько возможных структур для таких соединений: 1) простое четырехвалентное железо Fe^{4+}... 2) феррил-ион $(FeO)^{2+}$ ... 3) бирадикальная структура, в которой трехвалентное железо образует «один конец» радикала, тогда как другой представлен нормальной радикальной группировкой у углеродного атома метинового мостика... или какого-либо другого атома... в пределах цепи сопряженных связей... 4) более высокая степень окисления гематиновой группы, у которой электрон удален с π-орбиты, общей для кольца в целом». По различным причинам Георг предпочитает вариант 2; в этом случае механизм реакции может быть представлен следующим образом:

$$Fe_p^{3+} + H_2O_2 \longrightarrow (Fe_pO)^{3+} + H_2O, \qquad \text{(VII.85)}$$

$$(Fe_pO)^{3+} + AH_2 \longrightarrow (Fe_pO)^{2+} + \cdot AH + H^+, \qquad \text{(VII.86)}$$

$$(Fe_pO)^{2+} + AH_2 + H^+ \longrightarrow Fe_p^{3+} + \cdot AH + H_2O, \qquad \text{(VII.87)}$$

$$2\text{-}AH \longrightarrow A + AH_2. \qquad \text{(VII.88)}$$

В отличие от предыдущего этот механизм предусматривает окисление и восстановление фермента. Это подтверждается наблюдениями Георга, показавшими, что в определенных условиях одна молекула H_2O_2 обеспечивает образование более чем одной молекулы комплекса II. Георг объясняет это окислением свободного фермента за счет комплекса I:

$$Fe_p^{3+} + (Fe_pO)^{3+} + H_2O \longrightarrow 2(Fe_pO)^{2+} + 2H^+. \qquad \text{(VII.89)}$$

Брилл и Вильямс [329] исследовали природу комплекса I, образуемого с гидроперекисью этила как каталазой, так и пероксидазой. Они *пришли к заключению, что комплекс* I представляет собой смесь двух комплексов, которые они назвали формами A и B. Форма A является простым ферри-порфириновым комплексом, тогда как в соединении B один из метиновых *мостиков в порфириновом кольце подвергся окислению.*

Исследования Брилла и Вильямса подтверждают предположение Георга о структуре комплекса II.

Действие других гемопротеидных ферментов *связано с восстановлением* и окислением цитохрома *c*. Дрожжевая лактатдегидрогеназа (1.1.2.3) (цитохром b_2) содержит одну геминовую группу на каждую флавинмононуклеотидную группу [82]. Кристаллический фермент катализирует *окисление* лактата цитохромом *c*; при добавлении лактата как флавиновая, так и геминовая группа быстро восстанавливаются. Флавин спонтанно диссоциирует из комплекса с ферментом в присутствии O_2, после чего геминовая группа уже не восстанавливается лактатом; это говорит в пользу того, что ее восстановление осуществляется при участии флавиновой группы.

В молекуле цитохромоксидазы (1.9.3.1) имеется особый гем (гем *a*), вероятная структура которого приведена на фиг. 99. Фермент из мышцы сердца содержит один атом прочно связанной меди на одну геминовую группу, и было показано, что медь претерпевает окисление и восстановление одновременно с геминовой группой [933]. Цианид препятствует окислению геминовой группы молекулярным кислородом, так как он соединяется с медью. Следовательно, функция меди состоит, по всей вероятности, в осуществлении аэробного окисления гема *a*.

ГЛАВА VIII

ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Отравление какого-либо фермента, участвующего в важном метаболическом процессе, приостановит весь процесс и окажет глубокое, а иногда и летальное действие на организм. Подобную инактивацию какого-нибудь определенного ключевого фермента Петерс [817] назвал *биохимическим повреждением*. В качестве наиболее наглядного примера фатальных последствий, к которым может привести специфическое отравление определенного фермента, сошлемся на токсическое действие цианида, проявляющееся в подавлении активности цитохромоксидазы; это влечет за собой остановку аэробных окислительных процессов, в результате чего через несколько минут наступает смерть организма.

Более глубокое изучение таких явлений способствовало тому, что учение об ингибиторах ферментов из второстепенного раздела кинетики ферментов превратилось в важную отрасль знания, имеющую фундаментальное значение для фармакологии и токсикологии. Оно находит непосредственное практическое применение, в том числе и в военном деле; «нервные газы», например, представляют собой по существу специфические ингибиторы ферментов. В последнее время в качестве инсектицидов все чаще используются соединения, родственные ингибиторам ферментов, и это послужило основой для создания крупной, усиленно развивающейся отрасли промышленности. Изучение действия токсических веществ in vitro с целью выяснить, не являются ли эти вещества ингибиторами ферментов, оказывается полезным при разработке противоядий к определенным ядовитым веществам. И хотя вся эта область исследования является сравнительно молодой и до сих пор лишь для относительно небольшого числа ядов удалось показать, что они действуют путем подавления активности определенных ферментов, тем не менее имеющиеся сведения дают основания надеяться, что со временем на этом пути будут получены интересные результаты.

Однако даже в тех случаях, когда действие лекарственного препарата или токсического вещества можно с уверенностью связать с его влиянием на определенный фермент, не всегда легко выяснить, как именно возникают те или иные физиологические изменения; неизвестно, например, почему вещества, отравляющие тиоловые ферменты, вызывают возникновение серии электрических импульсов в нервных волокнах роговицы, приводящее к слезотечению. Подобный пробел в наших знаниях там, где речь идет о связи между первичным биохимическим механизмом и конечным физиологическим эффектом, не представляет собой чего-либо исключительного; так же обстоит, например, дело и с учением об авитаминозах, хотя биохимическая роль витаминов известна.

В чисто академическом плане специфические ингибиторы ферментов часто находят «практическое» применение как орудие исследования. Например, многие из промежуточных продуктов гликолиза и дрожжевого брожения были открыты главным образом благодаря использованию ингибиторов, блокирующих различные последовательные стадии процесса, так как

в результате такого блокирования соответствующие промежуточные продукты накапливаются в количествах, достаточных для их выделения и идентификации. Использование малоната — конкурентного ингибитора сукцинатдегидрогеназы — позволило обнаружить существование цикла лимонной кислоты.

Типы ингибиторов

Простое необратимое разрушение фермента, как, например, денатурация под влиянием тепла, сильной кислоты или какого-либо иного воздействия, обычно не рассматривается как торможение. Ингибиторы в обычном смысле, т. е. вещества, действующие определенным химическим путем, могут по характеру своего действия (обратимое или необратимое торможение) подразделяться на так называемые обратимые и необратимые. Слово «обратимые» употреблялось, однако, в литературе в двух различных значениях. Мы будем подразумевать под ним, что активность фермента восстанавливается при простом удалении свободного ингибитора диализом или каким-либо иным способом. Такое восстановление активности указывает на существование равновесия между свободным ингибитором и ферментом. В противоположность этому при действии необратимых ингибиторов равновесие не устанавливается и активность фермента не удается восстановить диализом. Термин «обратимые» применяется, однако, также и в другом смысле — для обозначения тех случаев, когда ингибирующую группу, присоединившуюся к ферменту и не диссоциирующую спонтанно, можно удалить путем какой-либо химической реакции. «Необратимость» в этом смысле означает, что все попытки удалить ингибирующую группу химическими средствами остались безуспешными, хотя этим и не исключается возможность того, что торможение окажется «обратимым», когда соответствующее средство будет, наконец, найдено. Для подобных случаев, т. е. для удаления ингибирующей группы в результате химической реакции, мы будем употреблять термин «реактивация», а не «обращение».

Обратимое торможение характеризуется равновесием между ферментом и ингибитором, причем константа равновесия служит мерой их сродства. Эффективность действия ингибитора обычно выражают этой константой K_i, которая есть величина, обратная величине сродства фермента и ингибитора. В системе подобного типа степень торможения зависит от концентрации ингибитора. Эта характерная для данной системы степень торможения обычно достигается довольно быстро, после чего она уже не зависит от времени, при условии, что ингибитор стабилен.

Необратимое торможение, напротив, непрерывно усиливается со временем, так что в конце концов наступает полное торможение даже при очень низкой концентрации ингибитора, если только ингибитор присутствует в избытке по сравнению с ферментом. Эффективность действия ингибитора в этом случае выражается не константой равновесия, а константой скорости, которая определяет долю фермента, подвергшегося торможению за данный период времени при определенной концентрации ингибитора [41].

Примером необратимого торможения может служить действие цианида на ксантиноксидазу (1.2.3.2) и действие «нервных газов» на холинэстеразы (3.1.1.7—8). Что касается обратимого торможения, то примеры его весьма многочисленны; среди прочих можно назвать действие цианида на цитохромоксидазу (1.9.3.1) и малоната на сукцинатдегидрогеназу (1.3.99.1). Мы будем рассматривать главным образом случаи обратимого торможения.

Подобно другим факторам, влияющим на скорость ферментативных реакций, ингибиторы, вызывающие обратимое торможение, могут действовать либо на «кажущуюся» величину K_m, либо на величину V. Инги-

биторы, которые действуют посредством увеличения эффективной K_m, принято называть «конкурентными», так как ингибитор и субстрат, стремясь вытеснить один другого из комплекса с ферментом, конкурируют между собой; ингибиторы, которые не оказывают влияния на K_m, а действуют, просто уменьшая величину V, принято называть «неконкурентными» (noncompetitive). Действие конкурентных ингибиторов снимается при высоких концентрациях субстрата (и, следовательно, такие ингибиторы не влияют на V), тогда как действие неконкурентных ингибиторов в этих условиях сохраняется.

«Конкурентный» тип торможения может наблюдаться иногда также и при действии необратимых ингибиторов, если субстрат оказывается способным частично предохранять фермент от действия ингибитора путем уменьшения константы скорости торможения. Однако обратимо связывающийся субстрат никогда не сможет предотвратить полного торможения, наступающего в конце концов при действии необратимого ингибитора, так как всегда в обратимом равновесии с субстратом должно оставаться небольшое количество *свободного* фермента и этот свободный фермент будет доступен для необратимой атаки со стороны ингибитора. Кроме того, после того как такое торможение произошло, оно уже не может быть обращено в результате добавления субстрата. Подобный «конкурентный» эффект наблюдается в том случае, когда ингибитор соединяется с субстратсвязывающим участком в активном центре, и, следовательно, этот эффект обусловлен в основном той же причиной, что и обратимое конкурентное торможение.

Вещества, соединяющиеся с тем же самым участком фермента, что и субстрат, вызывают торможение конкурентного типа (тип I); такое действие особенно характерно для веществ, имеющих структуру, сходную со структурой субстрата. Вещества, которые соединяются с ферментом в участке, достаточно удаленном от места связывания субстрата, вызывают торможение неконкурентного типа (тип II).

При неконкурентном торможении фермент может связываться одновременно как с ингибитором, так и с субстратом; при конкурентном торможении одновременное связывание субстрата и ингибитора возможно лишь в некоторых, особых случаях. Если ингибитор и субстрат соединяются с одним и тем же участком фермента (типа I, *а*), то фермент может находиться в соединении либо с субстратом, либо с ингибитором, но не с обоими одновременно. Однако возможен и такой случай, когда ингибитор присоединяется к ферменту не в том участке, с которым связан субстрат, но настолько близко к этому участку, что сродство фермента к субстрату уменьшается (тип I, *б*). В этом случае торможение оказывается конкурентным, хотя фермент находится в соединении одновременно и с субстратом и с ингибитором. Если в системе такого типа образуется комплекс EIS, то он распадается с такой же скоростью, как и комплекс ES.

При торможении типа I, *а* соединение с ингибитором полностью лишает фермент возможности соединяться с субстратом; при торможении типа I, *б* действие ингибитора проявляется лишь в уменьшении сродства фермента к субстрату. Подобное же разделение на случаи с полным и частичным эффектом торможения можно провести и для ингибиторов типа II, которые действуют на V; при торможении типа II, *а* комплекс EIS совсем не распадается, тогда как при торможении типа II, *б* этот комплекс распадается, но с меньшей скоростью. Таким образом, имеется четыре типичных случая обратимого торможения. Другой возможный вариант торможения, довольно неудачно названный «бесконкурентным» (uncompetitive) торможением [667],— это тот случай, когда ингибитор может соединяться только с комплексом ES. Этот случай, по-видимому, чрезвычайно редок, если только он вообще когда-нибудь встречается. Следует, конечно, отдать себе отчет, что ингибитор, возможно, действует не только каким-либо одним путем: уве-

личение K_m не исключает действия ингибитора на V, и наоборот. Такого рода действие должно давать смешанные типы торможения.

Теперь мы рассмотрим кинетику отдельных типичных случаев действия ингибиторов.

КОНКУРЕНТНЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Тип I, а. В этом случае эффект торможения бывает полным и ингибитор соединяется с тем же участком фермента, с которым связывается субстрат. Систему можно представить следующими реакциями [1815]:

$$E + S \rightleftharpoons ES, \tag{VIII.1}$$

$$E + I \rightleftharpoons EI, \tag{VIII.2}$$

$$ES \xrightarrow{k} E + P. \tag{VIII.3}$$

Предполагается, что EI не подвергается дальнейшим превращениям и комплекс EIS не может образоваться. Реакция (VIII.2) представляет собой равновесную реакцию с константой диссоциации K_i («ингибиторная константа»); реакция (VIII.1) будет равновесной в случае применимости теории Михаэлиса (при этом она будет характеризоваться константой диссоциации K_s), но она не будет достигать равновесия в случае применимости теории Бриггса — Холдейна. Рассматривая вначале систему Михаэлиса, получаем следующие уравнения:

$$(e - p - q)\, s = K_s p, \tag{VIII.4}$$

$$(e - p - q)\, i = K_i q, \tag{VIII.5}$$

$$v = kp, \tag{VIII.6}$$

где p — концентрация ES; q — концентрация EI.

Решая эти уравнения относительно v, получаем

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s}{s}\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}. \tag{VIII.7}$$

Подставляя относительные концентрации и скорости (см. стр. 64) и обозначая i/K_i через ι, находим

$$\varphi = \frac{\sigma}{1 + \sigma + \iota} \tag{VIII.8}$$

(ср. уравнение IV.15).

Рассмотрим ту же систему, не делая допущения, что реакция (VIII.1) достигает равновесия (общий случай Бриггса — Холдейна), и введем одновременно константы скорости в реакции (VIII.1 — VIII.3)

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES, \tag{VIII.9}$$

$$E + I \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} EI, \tag{VIII.10}$$

$$ES \xrightarrow{k_{+3}} E + P. \tag{VIII.11}$$

Воспользовавшись соотношениями кинетики стационарного состояния, получаем уравнения

$$k_{+1} s\,(e - p - q) = (k_{-1} + k_{+3})\, p, \tag{VIII.12}$$

$$k_{+2} i\,(e - p - q) = k_{-2} q, \tag{VIII.13}$$

$$v = k_{+3} p. \tag{VIII.14}$$

Решая эти уравнения относительно v, имеем

$$v = \frac{k_{+3}e}{1 + \frac{k_{-1}+k_{+3}}{k_{+1}s}\left(1 + \frac{k_{+2}i}{k_{-2}}\right)}. \qquad \text{(VIII.15)}$$

Подставив K_m вместо $(k_{-1}+k_{+3})/k_{+1}$ и K_i вместо k_{-2}/k_{+2}, находим

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{s}\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}. \qquad \text{(VIII.16)}$$

Следует отметить, что это уравнение совпадает с уравнением (VIII.7), где K_s заменено на K_m (см. уравнение IV.87), но осталась истинная константа равновесия K_i. Последнее обстоятельство вытекает из того факта, что, согласно определению действия конкурентного ингибитора, реакция (VIII.10) всегда представляет собой истинную равновесную реакцию.

Влияние конкурентного ингибитора состоит, таким образом, в кажущемся увеличении K_m в $(1 + i/K_i)$ раз; это означает, что при возрастании i «кажущееся» K_m увеличивается неограниченно. При какой-либо конечной концентрации ингибитора предельная скорость в условиях избытка субстрата всегда равна V, т. е. она равна максимальной скорости реакции в отсутствие ингибитора.

Тип I, б. В системе конкурентного типа с частичным эффектом торможения ингибитор влияет на сродство фермента к субстрату, хотя ингибитор и субстрат соединяются с различными группами фермента. Для этого случая мы можем написать следующую систему уравнений, которая отличается от приведенной выше тем, что здесь сделано допущение о существовании комплекса EIS:

$$E + S \rightleftarrows ES, \qquad \text{(VIII.17)}$$

$$E + I \rightleftarrows EI, \qquad \text{(VIII.18)}$$

$$EI + S \rightleftarrows EIS, \qquad \text{(VIII.19)}$$

$$ES + I \rightleftarrows EIS, \qquad \text{(VIII.20)}$$

$$ES \xrightarrow{k} E + P, \qquad \text{(VIII.21)}$$

$$EIS \xrightarrow{k} EI + P. \qquad \text{(VIII.22)}$$

В данном случае мы исходим из допущения, что торможение влияет только на сродство фермента к субстрату, так что комплексы ES и EIS распадаются с одинаковой скоростью; следовательно, одна и та же константа скорости k характеризует распад обоих комплексов и общая скорость равна сумме скоростей этих двух реакций. Если бы это было не так, то следовало бы признать, что ингибитор действует двумя путями, т. е. влияет как на V, так и на K_m.

Обозначив константы равновесия реакций (VIII.17 — VIII.20) через K_s, K_i, K_s' и K_i' соответственно, а концентрации ES, EI и EIS соответственно через p, q и p', получаем уравнения

$$(e - p - p' - q)\, s = K_s p. \qquad \text{(VIII.23)}$$

$$(e - p - p' - q)\, i = K_i q. \qquad \text{(VIII.24)}$$

$$qs = K_s' p'. \qquad \text{(VIII.25)}$$

$$pi = K_i' p', \qquad \text{(VIII.26)}$$

$$v = k(p + p'). \qquad \text{(VIII.27)}$$

Решая эти уравнения относительно v, имеем

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s}{s} \cdot \frac{\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{i}{K_i} \cdot \frac{K_s}{K_s'}\right)}}. \qquad \text{(VIII.28)}$$

Это выражение можно представить в более простом виде, подставляя соответствующие относительные величины и обозначая K_s'/K_s через r, как и в уравнении (IV.49):

$$\varphi = \frac{\sigma}{\sigma + (1 + \iota)\frac{r}{r + \iota}}. \qquad \text{(VIII.29)}$$

Если $i = 0$, то эти уравнения упрощаются до обычных уравнений Михаэлиса (IV.11 и IV.15). Если же i очень велико, то уравнение (VIII.28) упрощается до

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s'}{s}}. \qquad \text{(VIII.30)}$$

Другими словами, в результате действия ингибитора образуется новый фермент EI, характеризующийся иным сродством к субстрату, а именно $1/K_s'$. *Эта система совершенно неотличима от системы конкурентного типа* с полным эффектом торможения (типа I, *a*) при графическом изображении по методу Лайнуивера и Бэрка (см. стр. 66), если изменять концентрацию субстрата, сохраняя концентрацию ингибитора постоянной.

Ее можно, однако, отличить от типа I, *a*, если изменять концентрацию ингибитора и сохранять неизменной концентрацию субстрата, ибо в этом случае торможение не увеличивается неограниченно с увеличением концентрации ингибитора (как это характерно для типа I, *a*), а возрастает лишь до определенного предела — до того момента, как весь фермент окажется связанным с ингибитором. Те же соображения применимы к «кажущейся» константе Михаэлиса.

Следует отметить, что в данном случае с помощью простых графических методов невозможно определить K_i. Это объясняется отчасти тем, что *при изменении концентрации субстрата эффективное сродство фермента* к ингибитору изменяется от $1/K_i$ до $1/K_i'$. Соединение фермента с субстратом должно влиять на сродство фермента к ингибитору в такой же мере, *как соединение фермента с ингибитором влияет на сродство фермента к субстрату*, так как из определений констант равновесия следует, что

$$\frac{K_i}{K_i'} = \frac{K_s}{K_s'}. \qquad \text{(VIII.31)}$$

Кроме того, зависимость $1/v$ от i для данного случая не является линейной в отличие от того, что имеет место при торможении по типу I, *a* или по типу II (см. стр. 291).

Отметим, что r в уравнении (VIII.29) не обязательно больше 1, т. е. анализ не ограничивается случаями торможения; он может быть распространен *также и на случаи активации. Это — общее уравнение, характеризующее* взаимозависимость между величинами сродства фермента к субстрату и к другим веществам. Если $r < 1$, то данное вещество действует как активатор, увеличивающий сродство к субстрату, хотя оно и не влияет на V. Если $r = 1$, то это вещество не оказывает влияния на скорость реакции. Если $r > 1$, то мы имеем только что обсуждавшийся тип конкурентного торможения с частичным эффектом торможения. Если $r \to \infty$, так что EI не обладает сродством к субстрату, то мы имеем случай конкурентного торможения с полным эффектом торможения.

НЕКОНКУРЕНТНЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Тип II. При неконкурентном торможении ингибитор не влияет на соединение субстрата с ферментом, а влияет только на V. В таком случае имеются две возможности: либо комплекс EIS совсем не распадается (тип II, *а*), и скорость реакции целиком определяется распадом ES (влияние ингибитора эквивалентно влиянию уменьшения количества активного фермента), либо комплекс EIS распадается со скоростью, отличной от скорости распада комплекса ES (тип II, *б*), и общая скорость равна сумме скоростей обеих этих реакций.

Тип II,а. Этот тип торможения может быть представлен следующими уравнениями:

$$E + S \rightleftarrows ES, \qquad \text{(VIII.32)}$$

$$E + I \rightleftarrows EI, \qquad \text{(VIII.33)}$$

$$EI + S \rightleftarrows EIS, \qquad \text{(VIII.34)}$$

$$ES + I \rightleftarrows EIS, \qquad \text{(VIII.35)}$$

$$ES \xrightarrow{k} E + P. \qquad \text{(VIII.36)}$$

Так как в этом случае соединение фермента с одним из веществ (с субстратом или ингибитором) не влияет на его сродство к другому, то можно обозначить константы равновесия реакций (VIII.32) и (VIII.34) через K_s, а константы равновесия реакций (VIII.33) и (VIII.35) — через K_i, так что

$$(e - p - p' - q)\, s = K_s p, \qquad \text{(VIII.37)}$$

$$(e - p - p' - q)\, i = K_i q, \qquad \text{(VIII.38)}$$

$$qs = K_s p', \qquad \text{(VIII.39)}$$

$$pi = K_i p', \qquad \text{(VIII.40)}$$

$$v = kp. \qquad \text{(VIII.41)}$$

Из этих уравнений находим

$$v = \frac{\dfrac{ke}{1 + \dfrac{i}{K_i}}}{1 + \dfrac{K_s}{s}} \qquad \text{(VIII.42)}$$

или, подставляя относительные величины,

$$\varphi = \frac{\sigma}{(1 + \sigma)(1 + \iota)}. \qquad \text{(VIII.43)}$$

Влияние ингибитора сказывается, таким образом, в изменении величины V, которая уменьшается в $(1 + i/K_i)$ раз; при этом K_s остается неизменным. Если i становится бесконечно большим, то v будет равно 0 при всех условиях.

Тип II, б. Для этого типа торможения уравнение (VIII.41) принимает вид

$$v = kp + k'p', \qquad \text{(VIII.44)}$$

а уравнение (VIII.42)

$$v = \frac{\dfrac{ke + k'\dfrac{i}{K_i}e}{1 + \dfrac{i}{K_i}}}{1 + \dfrac{K_s}{s}}. \qquad \text{(VIII.45)}$$

Подставляя относительные величины, находим

$$\varphi = \frac{\sigma + R\iota\sigma}{(1+\sigma)(1+\iota)}, \qquad \text{(VIII.46)}$$

где $R = k'/k$. При избытке субстрата скорость реакции будет равна ke в отсутствие ингибитора и $k'e$ при наличии избытка ингибитора; поэтому скорость падает только до определенного предела, а не до нуля. Если $k' = 0$, то уравнение (VIII.45) сокращается до (VIII.42); если $k' > k$, то I действует как активатор фермента.

Уравнение (VIII.45) может быть написано в форме

$$v = \frac{ke}{\left(1+\frac{K_s}{s}\right)\frac{\left(1+\frac{i}{K_i}\right)}{\left(1+\frac{i}{K_i}\cdot\frac{k'}{k}\right)}}. \qquad \text{(VIII.47)}$$

При сравнении этого уравнения с уравнением (VIII.28) видно, что оно содержит ту же функцию I, но отношение величин сродства субстрата к E и EI заменено в нем отношением активностей [1] E и EI, так что ингибитор оказывает влияние не на величину K_s, а на величину V. Как и прежде, определение K_i обычными методами представляет трудности; в особенности малоподходящими оказываются методы, связанные с построением графиков зависимости скорости реакции от концентрации ингибитора i (см. стр. 292). Однако K_i можно найти по методу, приведенному на стр. 291, если K_s' или k' определены путем измерения «кажущегося» сродства или максимальной скорости V в условиях избытка ингибитора.

ИНГИБИТОРЫ СМЕШАННОГО ТИПА

Как уже говорилось выше, ингибитор может действовать одновременно на V и на K_m, что дает смешанный тип, т. е. торможение одновременно конкурентное и неконкурентное. Это означает, что могут существовать формы торможения, объединяющие типы I, *б* и II, *а* или I, *б* и II, *б*. Невозможно, однако, допустить существование форм, объединяющих тип I, *а* с типом II, *а* или II, *б*, так как при действии конкурентного ингибитора с полным эффектом торможения комплекс EIS образоваться не может и, следовательно, рассмотрение влияния ингибитора на распад такого комплекса вообще теряет смысл.

Следует отметить, что ингибиторы могут влиять как на V, так и на K_m, т. е. могут принадлежать к смешанному типу, даже в том случае, когда механизм их действия весьма прост. Так, в случае фермента, действие которого подчиняется кинетике Бриггса — Холдейна, т. е. в случае, когда k_{+2} оказывает существенное влияние на K_m, любой ингибитор, влияющий на k_{+2}, должен влиять как на K_m, так и на V; иными словами, для такого фермента не может быть ингибиторов чисто неконкурентного типа. В предельном случае, когда k_{+2} очень велико по сравнению с k_{-1}, так что K_m приближенно равно k_{+2}/k_{+1}, ингибитор, влияющий на распад ES, будет вызывать пропорциональные изменения V и K_m. Следовательно, графики обратных величин скорости и концентрации в присутствии различных постоянных концентраций ингибитора будут прямыми, параллельными прямой, получаемой в отсутствие ингибитора. Этот случай можно было бы рассматривать как один из случаев так называемого бесконкурентного торможения (однако не в первоначальном смысле, т. е. не в том смысле, что ингибитор может соединяться только с комплексом ES).

[1] В смысле скоростей распада комплексов ES и EIS.— *Прим. перев.*

В опытах с ингибиторами при построении графиков обратных величин скорости и концентрации нередко получают параллельные прямые. Наиболее вероятная причина этого — прямое влияние ингибитора на k_{+2}. Конечно, если величина k_{+2} столь мала, что ею можно пренебречь по сравнению с k_{-1}, то влияние ингибитора на K_m не обнаруживается. Следовательно, при значительном увеличении концентрации ингибитора графики обратных величин в пределе станут типичными для случаев неконкурентного торможения.

Различные виды торможения «смешанного типа» могут возникать и в других случаях, например если ингибитор соединяется не с исходным фермент-субстратным комплексом, а с какими-либо промежуточными продуктами, образующимися позднее. Крупка и Лейдлер [1470] рассмотрели действие одного из ингибиторов ацетилхолинэстеразы, который замедляет дальнейшее превращение ацетилированного фермента, и показали, что в этом случае наблюдается торможение смешанного типа.

Общее уравнение для смешанных типов торможения было выведено путем применения кинетики стационарного состояния Боттсом и Моралесом [298]; однако это уравнение слишком сложно для того, чтобы им пользоваться на практике.

Более частный случай торможения, в котором сочетаются неконкурентный тип с полным эффектом торможения и конкурентный тип с частичным эффектом торможения, рассмотрели теоретически Фриденвальд и Мэнгвин-Дэвис [783]. Названные авторы квалифицируют рассматриваемый случай как общий случай торможения смешанного типа, хотя в действительности их допущения подразумевают, что ингибитор не только влияет на соединение фермента с субстратом, но также полностью препятствует распаду комплекса EIS. Допущения эти те же, что и для типа I, *б* (см. уравнения VIII.17 — VIII.21), с тем исключением, что k для реакции (VIII.22) принято равным нулю, а это означает, что комплекс EIS не распадается вообще (выше для типа I, *б* мы исходили из допущения о равных скоростях распада комплексов ES и EIS). Уравнения (VIII.23 — VIII.26) остаются, таким образом, неизменными, но уравнение (VIII.27) принимает вид

$$v = kp. \tag{VIII.48}$$

Решая эти уравнения, получаем

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s}{s} + \frac{i}{K_i}\left(\frac{K_s}{s} + \frac{K_s}{K_s'}\right)} \tag{VIII.49}$$

или, подставляя относительные величины,

$$\varphi = \frac{\sigma}{1 + \sigma + \iota + \frac{\iota\sigma}{r}}. \tag{VIII.50}$$

Уравнение (VIII.49) может быть написано в другой форме:

$$v = \frac{\dfrac{ke}{\left(1 + \dfrac{i}{K_i} \cdot \dfrac{K_s}{K_s'}\right)}}{1 + \dfrac{K_s}{s} \cdot \dfrac{\left(1 + \dfrac{i}{K_i}\right)}{\left(1 + \dfrac{i}{K_i} \cdot \dfrac{K_s}{K_s'}\right)}}. \tag{VIII.51}$$

Легко заметить, что уравнение (VIII.51) мало отличается от уравнения (VIII.28), но содержит дополнительный член, отражающий «неконкурентную часть» влияния ингибитора, т. е. его влияние на V. График, построен-

ный по Лайнуиверу и Бэрку для действия такого ингибитора, отличается от графиков для чисто конкурентного или чисто неконкурентного типа торможения тем, что оба отрезка, отсекаемые на осях координат, изменяются при добавлении в систему ингибитора.

СВОДКА, ИЛЛЮСТРИРУЮЩАЯ РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ

Влияние ингибиторов различных типов при пяти разных способах графического изображения уравнения Михаэлиса представлено на фиг. 74. В каждом случае стрелка показывает направление, в котором график смещается в присутствии ингибитора. Типы *а* представлены теми же графиками, что и типы *б*, потому что направление смещения в обоих случаях одинаково, хотя для типов *б* с увеличением концентрации ингибитора это смещение достигает определенного предела, а для типов *а* нет.

Пять рядов графиков, приведенных на фиг. 74, соответствуют пяти методам графического изображения уравнения Михаэлиса, приведенным на фиг. 18. Метод построения по Лайнуиверу — Бэрку (третий ряд сверху) применяется особенно широко для определения типов торможения. При чисто конкурентном типе торможения прямые пересекаются на оси ординат, а при чисто неконкурентном типе — на оси абсцисс. В случае торможения смешанного типа точка пересечения прямых располагается между осями.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРНЫХ КОНСТАНТ

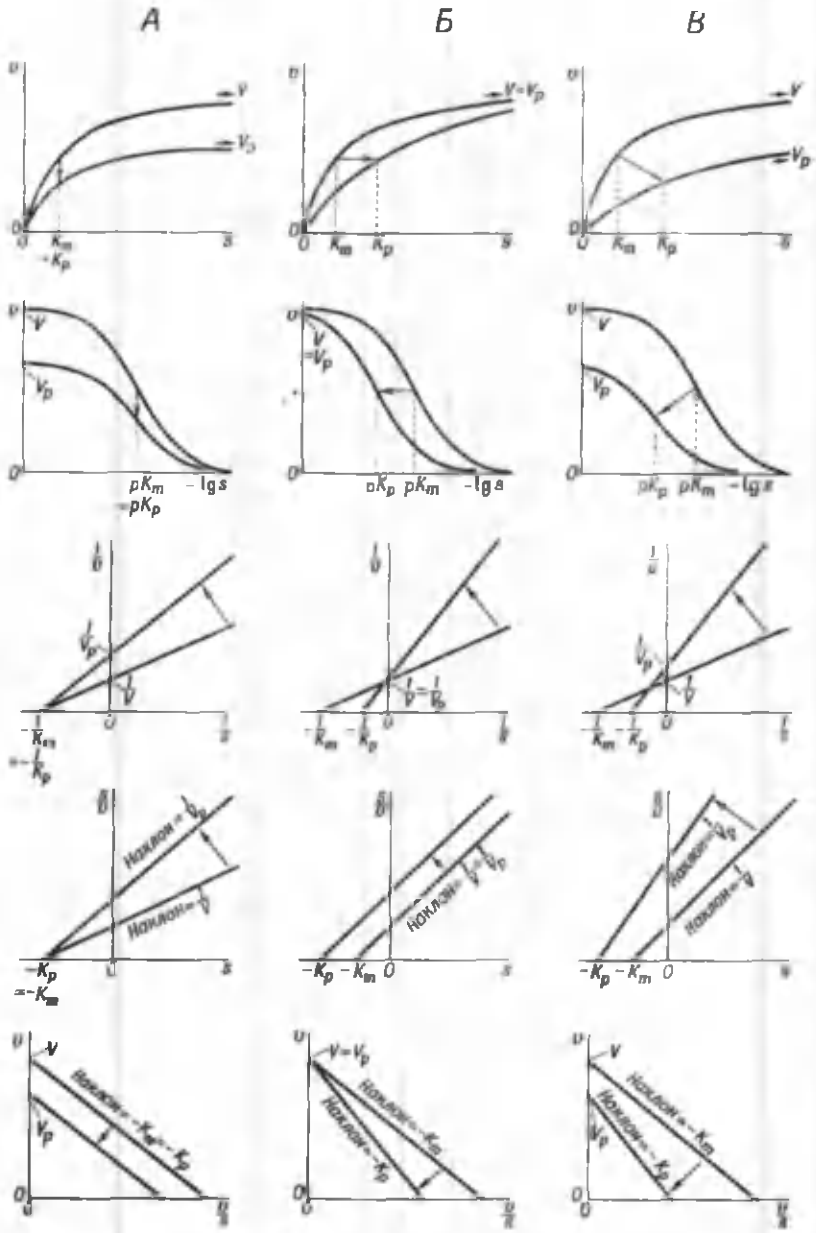
1. Величины K_i можно определить методом Лайнуивера и Бэрка по величине отрезков, отсекаемых на осях координат в присутствии и в отсутствие ингибитора. Выражения, определяющие величину отрезков, отсекаемых на обеих осях при различных типах торможения, могут быть получены из приведенных выше уравнений; для удобства эти выражения суммированы в табл. 22.

Таблица 22

ВЫРАЖЕНИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВЕЛИЧИНУ ОТРЕЗКОВ, ОТСЕКАЕМЫХ НА ОСЯХ КООРДИНАТ ПРИ ПОСТРОЕНИИ ГРАФИКОВ ПО МЕТОДУ ОБРАТНЫХ ВЕЛИЧИН

Тип торможения	Величина отрезка, отсекаемого на оси ординат	Величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс
I, *а* — конкурентный с полным эффектом торможения	$\frac{1}{V}$	$\frac{1}{K_m(1+i/K_i)}$
I, *б* — конкурентный с частичным эффектом торможения	$\frac{1}{V}$	$\frac{1+iK_m/K_iK'_m}{K_m(1+i/K_i)}$
II, *а* — неконкурентный с полным эффектом торможения	$\frac{1+i/K_i}{V}$	$\frac{1}{K_m}$
II, *б* — неконкурентный с частичным эффектом торможения	$\frac{1+i/K_i}{V+V_i/K_i}$	$\frac{1}{K_m}$
(I, *б* + II, *а*) смешанный	$\frac{1+iK_m/K_iK'_m}{V}$	$\frac{1+iK_m/K_iK'_m}{K_m(1+i/K_i)}$

При конкурентном торможении в отсутствие и в присутствии ингибитора точки пересечения графиков с осью абсцисс дают $1/K_m$ и $1/K_p$ соответственно, где $K_p = K_m(1 + i/K_i)$ — эффективная константа Михаэлиса



Фиг. 74. Влияние ингибиторов различных типов на пять форм графиков, описывающих зависимость между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции.

А. Неконкурентное торможение. *Б*. Конкурентное. *В*. Смешанное.

в присутствии ингибитора (концентрация i). Таким образом, K_i может быть определено из выражения

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_m} - 1}. \qquad \text{(VIII.52)}$$

При неконкурентном торможении точки пересечения графиков с осью абсцисс дают $1/V$ и $1/V_p$ соответственно, где $V_p = V/(1 + i/K_i)$. Тогда

$$K_i = \frac{i}{\frac{V}{V_p} - 1}. \qquad \text{(VIII.53)}$$

В случаях с частичным эффектом торможения выражения для K_i имеют следующий вид:

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_m} - 1}\left(1 - \frac{K_p}{K'_m}\right) \quad \text{(случай I, } б\text{)}, \qquad \text{(VIII.54)}$$

$$K_i = \frac{i}{\frac{V}{V_p} - 1}\left(1 - \frac{V'}{V_p}\right) \quad \text{(случай II. } б\text{)}, \qquad \text{(VIII.55)}$$

где V' — скорость в присутствии избытка ингибитора и субстрата; K'_m — константа Михаэлиса в присутствии избытка ингибитора. Обе эти величины должны быть получены независимо друг от друга путем экстраполирования V_p и K_p к $i \to \infty$.

2. Диксон [622] предложил простой графический метод, который позволяет определять K_i непосредственно. Если определять скорость реакции в условиях постоянной концентрации субстрата и различных концентраций ингибитора, то график зависимости $1/v$ от i будет представлять собой прямую, как показано на фиг. 75. В этом можно убедиться при рассмотрении уравнений (VIII.16) и (VIII.42), решенных относительно $1/v$. Из уравнения (VIII.16) находим для конкурентного торможения

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{Vs} + \frac{1}{V} + \frac{K_m}{Vs} \cdot \frac{i}{K_i}. \qquad \text{(VIII.56)}$$

Если получить второй ряд экспериментальных точек при другой концентрации субстрата (s_2), то вторая прямая пересечет первую в точке $-K_i$, как показано на фиг. 75, *А*.

Проверка может быть произведена следующим образом. В точке пересечения величины $1/v$ и i должны быть одними и теми же для обоих графиков; так как торможение является конкурентным, то одинаковой должна быть также и величина V. Поэтому

$$\frac{K_m}{s_1} + 1 + \frac{K_m}{s_1} \cdot \frac{i}{K_i} = \frac{K_m}{s_2} + 1 + \frac{K_m}{s_2} \cdot \frac{i}{K_i}$$

или

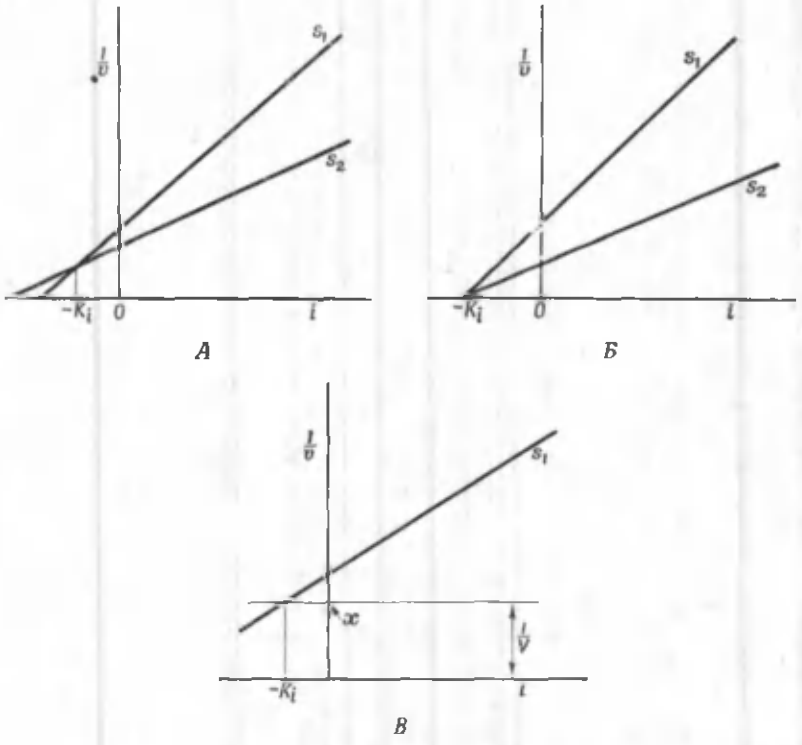
$$\frac{1}{s_1}\left(1 + \frac{i}{K_i}\right) = \frac{1}{s_2}\left(1 + \frac{i}{K_i}\right). \qquad \text{(VIII.57)}$$

Уравнение (VIII.57) может быть справедливым только в том случае, если либо $s_1 = s_2$ (что не имеет места в рассматриваемом случае), либо $i = -K_i$.

Если K_m уже было определено в отсутствие ингибитора, то в этом случае опыты в присутствии ингибитора достаточно провести только при одной концентрации субстрата, так как точка, определяющая K_i, имеет ординату, равную $1/V$, в чем можно убедиться, подставив $i = -K_i$ в уравнение (VIII.56) (это значение ординаты указано точкой X на фиг. 75, *В*).

Таким образом, необходимо только провести через точку на оси $1/v$ прямую, параллельную оси абсцисс, как показано на фиг. 75, *В*, и она пересечет прямую, описывающую процесс в присутствии ингибитора, в точке $-K_i$. Применимость этого метода, однако, ограничивается случаями конкурентного торможения.

Наряду с K_i по графику, изображенному на фиг. 75, *А*, можно определить и K_m, так как каждый график пересекает ось абсцисс в точке $-K_i\left(\frac{s}{K_m}+1\right)$.



Фиг. 75. Графическое определение ингибиторных констант (метод Диксона).
А. Конкурентное торможение. *Б*. Неконкурентное. *В*. Смешанное.

Рассматриваемый метод можно применить также и к случаям неконкурентного торможения, как это иллюстрирует фиг. 75, *Б*. Прямые по-прежнему пересекаются в точке $-K_i$, но теперь эта точка лежит на оси абсцисс. В этом можно убедиться, если в уравнение для случая неконкурентного торможения (VIII.42) подставить $1/v = 0$:

$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V}\left(1+\frac{K_m}{s}\right)\left(1+\frac{i}{K_i}\right). \qquad \text{(VIII.58)}$$

График, описывающий эту зависимость, представляет собой прямую.

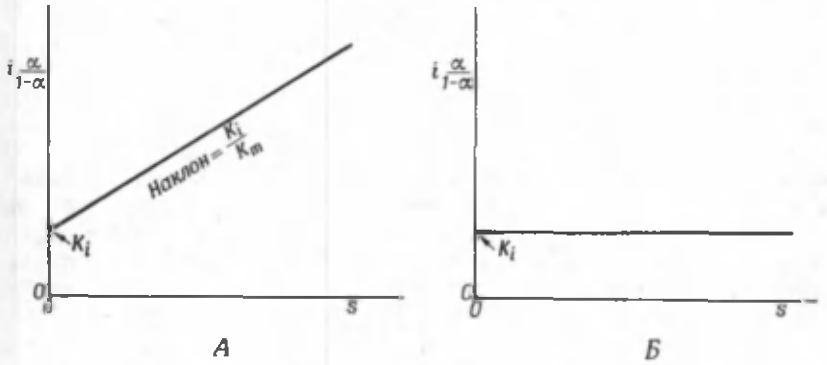
3. Описанные выше методы определения K_i требуют проведения серии измерений либо при постоянной концентрации субстрата и изменяющейся концентрации ингибитора, либо при постоянной концентрации ингибитора и изменяющейся концентрации субстрата. Может, однако, понадобиться определить K_i на основании ряда уже имеющихся данных, полученных в опытах с различными меняющимися концентрациями и субстрата и ингибитора. Это можно осуществить с помощью метода Хантера и Даунса [119],1

который позволяет пересчитать все данные таким образом, чтобы новые полученные значения укладывались на одну прямую.

Если для каждого наблюдения вычислить величину α, т. е. отношение скоростей, определяемое выражением

$$\alpha = \frac{v_i}{v}, \qquad \text{(VIII.59)}$$

где v_i — скорость в присутствии ингибитора и v — скорость в отсутствие ингибитора, но при той же самой концентрации субстрата, то для случаев



А *Б*

Фиг. 76. Графическое определение ингибиторных констант (метод Хантера и Даунса).
А. Конкурентное торможение. *Б*. Неконкурентное.

конкурентного торможения из уравнений (IV.11) и (VIII.7) легко показать, что

$$i\frac{\alpha}{1-\alpha} = K_i + \frac{K_i}{K_m}s. \qquad \text{(VIII.60)}$$

Если затем построить график зависимости $i\frac{\alpha}{1-\alpha}$ от s, как показано на фиг. 76, *А*, то получается прямая, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный K_i, и имеет наклон K_i/K_m.

В действительности вместо $i\frac{\alpha}{1-\alpha}$ легче рассчитать равную этому выражению величину $i\frac{v_i}{v-v_i}$.

Для случая неконкурентного торможения из уравнений (IV.11) и (VIII.42) находим

$$i\frac{\alpha}{1-\alpha} = K_i. \qquad \text{(VIII.61)}$$

K_i не зависит от концентрации субстрата, как это видно из фиг. 76, *Б*.

ДРУГИЕ ТИПЫ ТОРМОЖЕНИЯ

Все типы торможения, которые мы обсуждали до сих пор, предусматривают прямое соединение ингибитора с ферментом; однако торможение будет вызываться также веществами, которые соединяются с субстратом, коферментом или металлом-активатором, блокируя их, т. е. делая их недоступными для фермента. Такое торможение оказывается возможным лишь в том случае, если концентрация блокирующего вещества есть величина того же порядка, что и концентрация блокируемого субстрата или кофактора; добавление большего количества субстрата или кофактора снимает это торможение.

Существует еще два типа конкурентного торможения. Мы имеем в виду те случаи, когда ингибитор конкурирует не с субстратом, а с коферментом или металлом-активатором. Несколько примеров такого рода приведено на фиг. 119 и в табл. 28. Хотя в основе явления, несомненно, лежит конкуренция, коль скоро речь идет о кофакторе, так как торможение может быть снято путем увеличения концентрации этого последнего, однако в обычном смысле это торможение нельзя назвать конкурентным, поскольку оно не зависит от концентрации субстрата.

ИНГИБИТОРЫ С ОЧЕНЬ ВЫСОКИМ СРОДСТВОМ

Для получения заметного эффекта торможения количество ингибитора в большинстве случаев должно быть очень большим по сравнению с количеством взятого фермента. Следовательно, количество ингибитора, связанного ферментом, всегда будет составлять лишь незначительную долю всего количества ингибитора, и в этих условиях концентрацию свободного ингибитора можно считать равной его общей концентрации. Из этого же допущения (аналогичного допущению, которое обычно делают для концентрации субстрата при изучении кинетики действия ферментов) мы исходили и при выводе уравнений торможения.

У некоторых ингибиторов, особенно у сильнодействующих антихолинэстераз (фиг. 87), K_i равно примерно 10^{-9} M, так что молярные концентрации взятых в опыт ингибитора и фермента могут быть величинами одного и того же порядка. В этом случае связывание ингибитора ферментом может значительно уменьшить концентрацию свободного ингибитора, так что в уравнения, при выводе которых концентрация свободного ингибитора принималась равной его общей концентрации, придется ввести поправку. Уравнения, учитывающие различия между общей концентрацией ингибитора и его свободной концентрацией, были предложены Исоном и Стедменом [665], Штраусом и Гольдштейном [2548] и Гольдштейном [862].

Рассматривая случай торможения неконкурентного типа с полным эффектом торможения, представленный уравнениями (VIII.32 — VIII.36) (тип II, *a*), мы должны теперь вместо уравнений (VIII.38) и (VIII.40) написать

$$(e - p - p' - q)(i_t - p' - q) = K_i q, \qquad \text{(VIII.62)}$$

$$p(i_t - p' - q) = K_i p', \qquad \text{(VIII.63)}$$

где e и i_t — суммарные молярные концентрации фермента и ингибитора, p, p' и q — концентрация ES, EIS и EI соответственно. Так как система относится к неконкурентному типу, то величины сродства E и ES к ингибитору будут равны и, следовательно, K_i, как и прежде, будет константой диссоциации либо EI на E и I, либо EIS на ES и I.

Обозначим через α долю общего количества фермента, не находящуюся в соединении с ингибитором; тогда

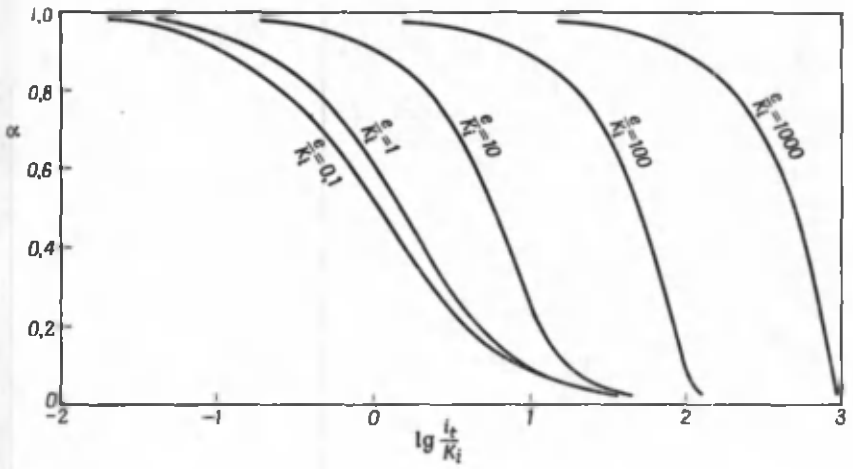
$$\alpha = \frac{e - p' - q}{e}. \qquad \text{(VIII.64)}$$

Так как соединение с ингибитором не влияет на равновесие между ферментом и субстратом, α будет выражать также «парциальную» активность фермента v_i/v, где v_i — скорость реакции в присутствии ингибитора и v — скорость реакции в отсутствие ингибитора, но при той же самой концентрации субстрата. Таким образом, мы получили для α то же выражение, которое приведено в уравнении (VIII.59). Исключая p, p' и q из уравнений (VIII.62 — VIII.64), получаем

$$i_t \frac{\alpha}{1-\alpha} = K_i + \alpha e. \qquad \text{(VIII.65)}$$

Если количество фермента e очень мало по сравнению с K_i, то последним членом можно пренебречь; i_t при этом условии практически равно i, и уравнение становится идентичным уравнению Хантера и Даунса (см. уравнение VIII.61).

Влияние, оказываемое последним членом уравнения, иллюстрирует фиг. 77, изображающая зависимость активности фермента от $\lg i_t/K_i$. При низкой концентрации фермента получается обычная симметричная кривая со средней точкой при $i_t = K_i$. С увеличением концентрации фермента форма кривой изменяется и вся кривая смещается вправо. В случае, представленном правой кривой, практически весь ингибитор связан с ферментом. При



Фиг. 77. Влияние связывания ингибитора, обладающего высоким сродством к ферменту, на кривую торможения [2548]
Теоретические кривые, построенные по уравнению (VIII. 65).

концентрации ингибитора I_{50}, при которой активность фермента соответствует 50% максимальной, $\alpha = 0{,}5$, и, как было отмечено Майерсом [1907], из уравнения (VIII.65) получаем

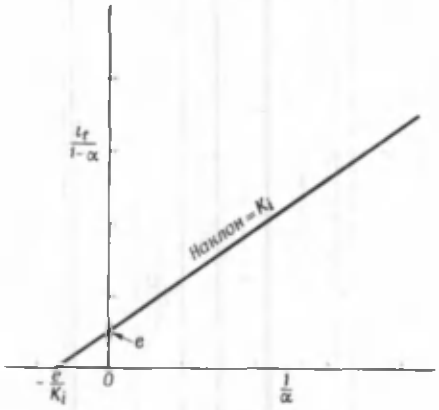
$$I_{50} = K_i + 0{,}5e. \qquad \text{(VIII.66)}$$

Точки, соответствующие 50%-ному торможению, на кривых фиг. 77 смещены, следовательно, вправо от величины pK на величину, зависящую от концентрации фермента.

Эти изменения в положении кривых могут быть использованы для определения e, точнее — абсолютной концентрации связывающих ингибитор участков, или активных центров фермента (если, как это обычно бывает, каждый центр соединяется с одной молекулой ингибитора). Данный метод использовался для определения числа активных центров холинэстераз в известном объеме раствора и, следовательно, для определения активности каталитического центра этих ферментов [665, 1907, 2548]. Такое определение может быть осуществлено путем изменения концентрации ингибитора при постоянной концентрации фермента и построения графика зависимости $i_t/(1-\alpha)$ от $1/\alpha$, как показано на фиг. 78. Отрезки, отсекаемые этим графиком на оси абсцисс и оси ординат, равны $-e/K_i$ и e соответственно.

Майерс [1907] нашел возможным использовать этот принцип при изучении действия ингибитора Nu-683 (фиг. 88) на холинэстеразу. Хотя этот ингибитор, вообще говоря, принадлежит к числу конкурентных, однако вытеснение его из соединения с ферментом протекает очень медленно; поэтому если активность определяется в пределах нескольких минут после добавления субстрата к ферменту, активность которого подавлена, то система ведет

себя так же, как и в случае торможения неконкурентного типа. Метод, использованный Майерсом, заключается в определении величины I_{50} при различных количествах фермента в системе и построении графика зависимости I_{50} от количества фермента, которое выражается в величинах активности, наблюдаемой в отсутствие ингибитора. Если активность выражена

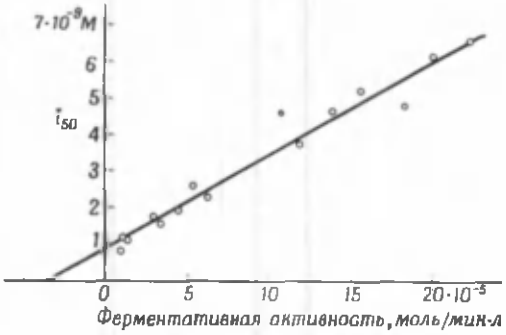


Фиг. 78. Определение молярной концентрации фермента по данным опытов с ингибитором, обладающим высоким сродством к ферменту [2548].
График построен по уравнению (VIII. 65).

в микромолях субстрата, подвергшегося превращению за 1 *мин*, то она будет равна Ae, где A — активность каталитического центра (гл. II). Тогда из уравнения (VIII.66) имеем

$$I_{50} = K_i + \frac{0{,}5}{A} \cdot Ae. \qquad \text{(VIII.67)}$$

График, описываемый этим уравнением, будет представлять собой, следовательно, прямую с наклоном $0{,}5/A$, и по величинам отрезков, отсекаемых



Фиг. 79. Определение активности каталитического центра холинэстеразы [1907].
Применение уравнения (VIII. 66) к случаю торможения активности холинэстеразы из сыворотки человека ингибитором Nu-683. Значения I_{50} были определены с помощью графиков того типа, который приведен на фиг. 77.

графиком на осях координат (K_i и $-\frac{A}{0{,}5} K_i$), можно легко определить активность каталитического центра (а следовательно, и абсолютное значение молярной концентрации фермента). На фиг. 79 приведены данные Майерса по торможению холинэстеразы (из сыворотки человека), действующей на бен-

зоилхолин. В данном случае величины отрезков, отсекаемых графиком на осях координат, соответствуют $0{,}88 \cdot 10^{-2}$ M и $-3{,}45 \cdot 10^{-5}$ *моль/мин·л*, что дает величину $A = 1{,}96 \cdot 10^{3}$ при действии на бензоилхолин.

Влияние pH *на торможение*

Характер торможения ферментов может заметно изменяться в зависимости от pH; в случае необратимого торможения эти изменения бывают иногда выражены не менее сильно, чем в случае обратимого торможения. При необратимом торможении скорость взаимодействия ингибитора с ферментом может зависеть от pH либо потому, что различные ионные формы фермента реагируют с ингибитором с различными скоростями, либо потому, что сам ингибитор подвергается ионизации. Количественный анализ в этом случае может быть проведен таким же путем, как и при выяснении влияния pH на k_{+2} (уравнение IV.157). В разделе, посвященном фосфорорганическим ингибиторам (см. стр. 307), будет приведен пример анализа такого рода.

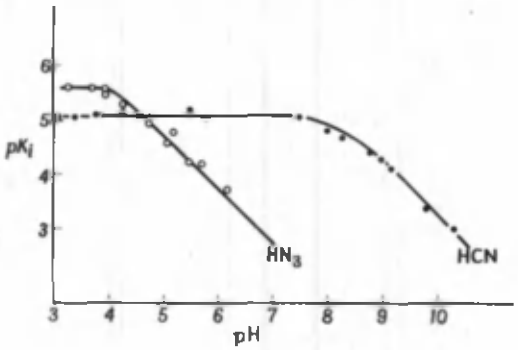
В случае обратимого торможения влияние pH может проявляться поразному в зависимости от механизма действия самого ингибитора. Если ингибитор действует путем уменьшения V, то pH может влиять на торможение либо через уменьшение $\bar{k}_{+2}$, либо через изменение K_{es1} или K_{es2} (уравнение IV.159). Влияние только на $\bar{k}_{+2}$ будет иметь место, если скорость распада активных ионных форм EIS окажется меньшей, чем скорость распада активных ионных форм ES; эффективная величина $\bar{k}_{+2}$ будет тогда занимать промежуточное положение между $\bar{k}_{+2}$(ES) и $\bar{k}_{+2}$(EIS). Обе эти величины не зависят от pH, но эффективная величина $\bar{k}_{+2}$ будет изменяться с pH, если под влиянием pH K_i изменяется. Следовательно, при изменении pH эффективная величина $\bar{k}_{+2}$ может изменяться в пределах $\bar{k}_{+2}$(ES) и $\bar{k}_{+2}$(EIS).

На K_{es1} и K_{es2} ингибитор может влиять либо в результате прямого соединения с кислотной или основной группой в активном центре, что вызывает «кажущееся» изменение этих констант, либо в результате соединения с группой, расположенной по соседству, что вызывает их истинное изменение. И в этом случае эффективные значения этих констант будут лежать между соответствующими величинами для ES и EIS, а характер изменения кривой pH — активность будет таким же, как при неспецифическом действии анионов (см. стр. 388; ср. фиг. 125). Влияние pH на торможение будет в этом случае весьма заметным; сдвиг кривой pH — активность может даже указывать, что данное вещество, действующее как ингибитор при одном pH, при другом значении pH будет действовать как активатор.

При торможении конкурентного типа комплекс EIS не образуется, но эффективная константа Михаэлиса K_p может изменяться с pH, если изменяется либо K_m, либо K_i, потому что если при изменении pH изменяется сродство фермента к субстрату или к ингибитору, то и степень торможения должна измениться. Интерпретация влияния pH на K_m с учетом величин pK для групп, у которых при соединении фермента с субстратом изменяется степень ионизации, уже обсуждалась в гл. IV (см. раздел В). Там же было отмечено, что подобный анализ приложим и к интерпретации влияния pH на K_i на основе величин pK для групп, у которых степень ионизации изменяется при соединении фермента с ингибитором (уравнения IV.172 и IV.173). На графике зависимости pK_i от pH величины pK этих групп определяются по положению перегибов; правила, изложенные на стр. 124 и 125, приложимы также и к этому графику. В качестве иллюстрации на фиг. 80 приведены кривые зависимости pK_i от pH, заимствованные из работы Чан-

са [422], для случая торможения каталазы азотоводородной и синильной кислотами. Точка перегиба на каждой кривой приблизительно соответствует pK ингибитора. Форма кривых указывает на то, что соединение со свободной кислотой происходит без какого-либо изменения заряда, тогда как соединение с анионом ингибитора приводит к образованию нейтрального соединения и исчезновению отрицательного заряда.

Массей [1746, фиг. 2 и 3] опубликовал ряд кривых зависимости pK_i от pH для случаев торможения фумаратгидратазы различными двуосновными кислотами. Эти данные наглядно иллюстрируют большое значение pH при торможении ферментов и характер влияний, которые могут при этом



Фиг. 80. Влияние pH на торможение каталазы под действием HN_3 и HCN [422].

иметь место; следует только учесть, что действие фумаратгидратазы осложняется наличием анионных эффектов (подробнее об этом см. ниже). К сожалению, очень мало других ингибиторов изучалось под таким углом зрения. Между тем подобное изучение могло бы пролить свет на природу активного центра ферментов и на механизм действия конкурентных ингибиторов. В связи с этим следует отметить, что определение K_i имеет преимущество перед определением K_m, ибо первая из этих величин всегда представляет собой истинную константу равновесия, характеризующую сродство фермента и ингибитора, и не содержит кинетического элемента, который может оказывать влияние на K_m.

Некоторые важные ингибиторы

В литературе упоминается большое число ингибиторов ферментов, в особенности конкурентных ингибиторов, родственных субстратам. При этом, однако, авторы нередко ограничиваются простой констатацией самого факта торможения, не сообщая никаких дополнительных данных. Собрать вместе весь накопленный материал и изложить его в достаточно сжатой форме было бы невозможно, и мы не пытались сделать это. Мы ограничимся рассмотрением только наиболее важных классов ингибиторов.

ИНГИБИТОРЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ НА ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Некоторые вещества, например цианид или H_2S, вследствие своей способности образовывать очень стабильные комплексы с металлами инактивируют катализаторы, действие которых зависит от присутствия тяжелых металлов. Так как в цитохромоксидазной системе катализ осуществляется с участием железа и меди, то упомянутые вещества резко подавляют дыхание многих тканей, и их часто называют «дыхательными ядами». Эти вещества тормозят действие многих (хотя и не всех) ферментов из числа

тех, у которых существенную часть каталитического механизма составляют атомы железа или меди. К той же группе относятся азид и окись углерода. Торможение дыхания этими ингибиторами служит главным доказательством важной роли цитохромной системы в процессах биологического окисления (критический обзор соответствующих данных читатель найдет в следующей главе).

Цианид уже давно рассматривается как стандартный ингибитор, с помощью которого можно обнаруживать металлокатализаторы. Теперь, однако, стало ясно, что это весьма неспецифический ингибитор и что он подавляет также и многие другие ферменты, активность которых не зависит от присутствия металлов. Цианид широко использовался для оценки той части клеточного дыхания, которая зависит от цитохромоксидазы; однако, поскольку он может действовать и иным путем, а не только через отравление оксидазы, следует считать, что опыты такого рода дают лишь максимальную величину для «цитохромоксидазной» части дыхания. В табл. 23 приведен список ферментов, чувствительных к цианиду, а также некоторые количественные данные, характеризующие действие цианида и других членов той же группы. Этот список содержит ряд гемопротеидов, медьсодержащие ферменты и ферменты, содержащие цинк или другие металлы; но, кроме того, он включает многие ферменты, действие которых связано с пиридоксальфосфатом или дисульфидными группами.

Цианид, следовательно, может тормозить действие ферментов различным путем. Он может соединяться с металлом, который необходим для действия фермента; он может удалять металл из фермента в форме неактивного комплекса; он может соединяться с карбонильной группой в самом ферменте, в кофакторе, в простетической группе (например, в пиридоксале) или даже в субстрате; он может действовать как восстанавливающий агент, разрывая дисульфидные связи, от которых зависит активность фермента, и, наконец, он может действовать так, как при медленно прогрессирующем цианидном торможении. По специфичности тормозящего действия азид и сульфид в общем сходны с цианидом, хотя из таблицы видны и некоторые различия между ними; у окиси углерода круг действия значительно уже: она подавляет активность только тех ферментов, которые содержат железо или медь, и притом не во всех случаях. Особенно сильно действует она на те ферменты из этой группы, которые непосредственно реагируют с кислородом; окись углерода конкурирует с кислородом, соединяясь с восстановленными формами соответствующих ферментов в противоположность цианиду, который более прочно соединяется с окисленными формами и не конкурирует с кислородом. Вследствие конкуренции с кислородом степень торможения окисью углерода определяется отношением парциальных давлений окиси углерода и кислорода в рассматриваемой системе. Соединения окиси углерода с гемопротеидными ферментами в отличие от соединений с медьпротеидными ферментами диссоциируют под влиянием света, и это явление широко используется для идентификации цитохромоксидаз (см. следующую главу). Цианид, хотя и относительно слабо, также соединяется с восстановленными формами гемопротеидов, и эти соединения сходны с соединениями, образованными окисью углерода, в том отношении, что они диссоциируют на свету [1346].

В большинстве случаев инактивация металлоферментов ингибиторами тяжелых металлов бывает быстрой и обратимой, но иногда наблюдается относительно медленное, прогрессирующее и необратимое торможение под действием цианида; эти случаи отмечены в конце табл. 23. Первый пример такого рода наблюдали при изучении очищенных растворимых препаратов ксантиноксидазы [626]. Сукцинатдегидрогеназа в растворимом состоянии не подавляется цианидом, но препарат в форме нерастворимых частиц ведет себя так же, как ксантиноксидаза [943]. В данном случае характер влияния

Таблица 23

ТОРМОЖЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ДЫХАТЕЛЬНЫМИ ЯДАМИ

Фермент	Цианид		Азид		Сульфид		CO	
	концентрация, *M*	торможение, %	концентрация, *M*	торможение, %	концентрация, *M*	торможение, %	отношение CO/O_2	торможение, %
Цитохромоксидаза (1.9.3.1)	10^{-6}	50	10^{-3} (pH 7,5)	80		++	6 (Снимается на свету)	50
Цитохромпероксидаза (1.11.1.5)	10^{-4}	50	10^{-2} (pH 5,5)	95				Отсутствует
			10^{-2} (pH 7,5)	0				
Каталаза (1.11.1.6)	$5 \cdot 10^{-6}$	50	$2 \cdot 10^{-5}$	50				То же
Пероксидаза (1.11.1.7)	10^{-5}—10^{-6}	++	10^{-3}	++	10^{-5}—10^{-6}	++		» »
Гемогентизат-оксигеназа (1.99.2.5)		++		++				» »
Аскорбатоксидаза (1.10.3.3)		++						» »
Катехолоксидаза (1.10.3.1)	$2 \cdot 10^{-3}$	++		++	$5 \cdot 10^{-4}$	++	4	40
Уратоксидаза (1.7.3.3)	$3 \cdot 10^{-5}$	83	$2 \cdot 10^{-3}$ (pH 8,0)	28	$4 \cdot 10^{-3}$	0		Отсутствует
			$2 \cdot 10^{-3}$ (pH 6,8)	40				
Карбоангидраза (4.2.1.1) (кровь)	10^{-4}—10^{-5}	50	10^{-4}—10^{-5}	50	10^{-4}—10^{-5}	50		?
Карбоангидраза (4.2.1.1) (растения)	10^{-3}	50—75	10^{-3}	70—90				
Карнозиназа (3.4.3.3)	10^{-2}	80			10^{-3}	80		
Изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42)	10^{-2}	50	10^{-2}	50				
Аконитатгидратаза (4.2.1.3)		+++				++		
Гидроксиламинредуктаза (1.7.99.1)	$5 \cdot 10^{-6}$	50		++				
НАДФ-H_2-нитратредуктаза (1.6.6.3)		++		++				
Триптофаноксигеназа (1.99.2.c)		+		+		+		+
Моноаминоксидаза (1.4.3.4)	10^{-3}	100						

Продолжение табл. 23

Фермент	Цианид		Азид		Сульфид		CO	
	концентрация, *M*	торможение, %	концентрация, *M*	торможение, %	концентрация, *M*	торможение, %	отношение CO/O_2	торможение, %
Диаминоксидаза (1.4.3.6)		+						
Аргининдекарбоксилаза (4.1.1.19)	10^{-3}	98	10^{-3}	21				
Глутаматдекарбоксилаза (4.1.1.15)	10^{-4}	93	10^{-2}	27				
Гистидиндекарбоксилаза (4.1.1.22)	10^{-2}	97	10^{-1}	38	10^{-1}	42		
Лизиндекарбоксилаза (4.1.1.18)	10^{-4}	81	10^{-4}	61	10^{-2}	32		Отсутствует
Орнитиндекарбоксилаза (4.1.1.17)	10^{-4}	40	10^{-4}	36				
Тирозиндекарбоксилаза (4.1.1.25)	10^{-3}	64	10^{-1}	15	10^{-2}	0		
L-сериндегидратаза (4.2.1.13)		+++						
Триптофансинтаза (4.2.1.20)	10^{-3}	95						
Гистидин—аммиак-лиаза (4.3.1.3)		+						
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)	$3 \cdot 10^{-3}$	50				++		
Альдолаза (4.1.2.b) (дрожжи)	+(pH 8,5)							
Ацетоацетат-декарбоксилаза (4.1.1.4)	10^{-4}	82	10^{-2}	53				
Формиатдегидрогеназа (1.2.1.2)	10^{-4}	80	$5 \cdot 10^{-7}$	65				
Алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) (печень)	10^{-4} (pH 10)	67						
L-идитолдегидрогеназа (1.1.1.14)	10^{-2}	53						
Маннитол-1-фосфат-дегидрогеназа (1.1.1.17)	$1,5 \cdot 10^{-2}$	50						
Фосфолипаза B (3.1.1.5)	10^{-3}	87						

Продолжение табл. 23

Фермент	Цианид		Азид		Сульфид		CO	
	концентрация, *M*	торможение, %	концентрация, *M*	торможение, %	концентрация, *M*	торможение, %	отношение CO/O_2	торможение, %
Прогрессирующее инактивирование								
Тиолсульфатсульфидтрансфераза (2.8.1.1)		+++						
Ксантиноксидаза (1.2.3.2)		+	10^{-3}	0				
Альдегидоксидаза (1.2.3.1)		+++		++				
Сукцинатдегидрогеназа (1.3.99.1) (из нерастворимых частиц)		+						
Гидрогеназа (1.98.1.1)		++				(Снимается, но не светом)		++

ингибитора зависит еще и от природы акцептора; это обстоятельство пока не получило объяснения, но было высказано предположение, что оно обусловлено связыванием цианида с атомами железа в ферменте.

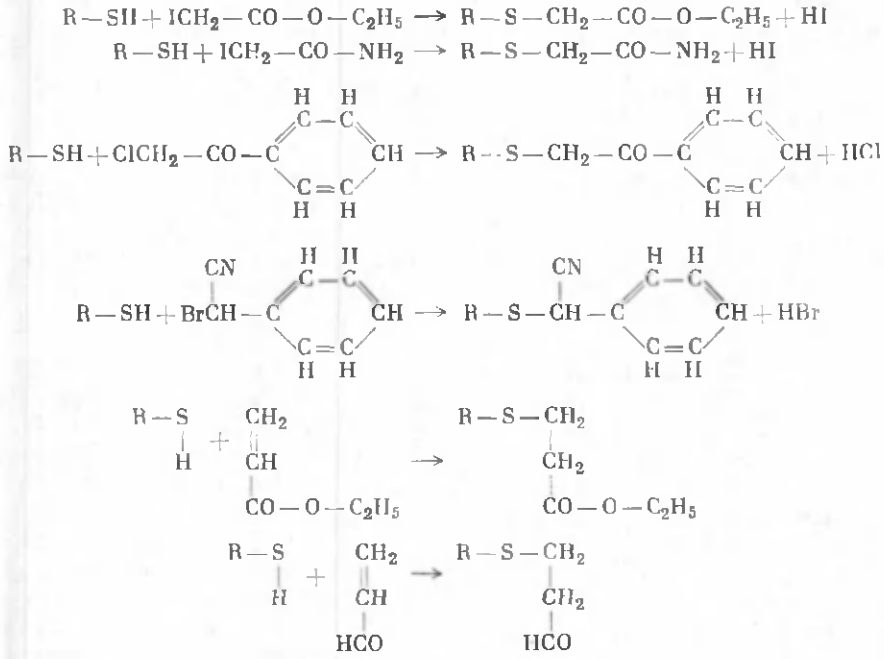
В качестве агента, образующего комплекс с металлами, в последнее время все шире применяется 1,10-фенантролин. Используя этот агент, Массей [1747] показал, что по крайней мере половину железа сукцинатдегидрогеназы можно удалить без потери активности. 1,10-фенантролин использовали также при работе с цинксодержащими ферментами (см. стр. 274). Валлей и др. [2713] детально изучили действие 1,10-фенантролина на алкогольдегидрогеназу дрожжей и печени. С ферментом из печени наблюдается только мгновенное обратимое торможение, тогда как с ферментом из дрожжей наряду с этим имеет место также и медленная необратимая инактивация.

РЕАГЕНТЫ НА ТИОЛОВЫЕ ГРУППЫ

В 1925 г. Шварц и Ошман [2348] показали, что гликолиз в мышечной ткани тормозится иодацетатом; несколько лет спустя это было подтверждено Лундгардом, который показал, что тот же реагент тормозит и спиртовое брожение в дрожжах. Еще через несколько лет выяснилось, что иодацетат является специфическим ингибитором некоторых ферментов, особенно дрожжевой алкогольдегидрогеназы [614, 2747] и глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы [614]. В 1931—1935 гг. было показано, что иодацетат реагирует с тиоловыми группами тиогликолата [1060], α-тиолактата [238], цистеина и глутатиона [606, 2131, 2172] и белков [1833]; в результате этой реакции образуются алкилированные производные и освобождается HI.

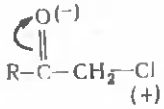
Не все реагенты на тиоловые группы действуют путем алкилирования. По характеру своего действия они могут быть разделены на три типа: а) алкилирующие реагенты; б) реагенты, образующие меркаптиды; в) окислители, превращающие тиоловые группы в дисульфидные (см. обзоры [173, 2129]).

Реагенты, алкилирующие тиоловые группы. Из реагентов этого класса первыми были описаны галоидпроизводные уксусной кислоты. Однако свободный иодацетат не реагирует со многими из тиоловых ферментов, хотя он и сильно тормозит действие некоторых других. Следовательно, это соединение в противоположность его эфирам и иодацетамиду не является ядом, общим для всех тиоловых ферментов. К числу наиболее эффективных реагентов этого класса принадлежат следующие галоидсодержащие соединения: этилиодацетат, иодацетамид, хлорацетофенон и бромбензилцианид. Менее эффективные, хотя все же достаточно активные соединения содержат вместо галоида этиленовую группу; таковы, например, этилакрилат или акролеин. Все эти соединения обладают лакриматорными свойствами, т. е. способностью вызывать слезотечение [617]. Различные реакции, которые могут иметь место при действии таких веществ, показаны на фиг. 81.



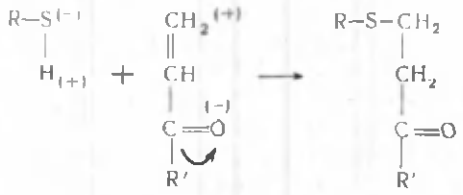
Фиг. 81. Реакции с участием реагентов, алкилирующих тиоловые группы.

Соединения первого типа содержат «положительный галоидный атом». Форд-Мур [760] обнаружил корреляцию между лакриматорными свойствами и степенью электроположительности галоида, возникающей в результате смещения электронов под влиянием соседних групп, например карбонильной группы



Те же самые группы, которые в соединениях первого типа вызывают смещение электронов, в соединениях второго типа вызывают поляризацию этиленовой двойной связи. Показано, что у соединений обоих типов лакриматорные свойства зависят от их реакционной способности по отношению к SH-группам [127, 617, 1666]. Реакция между поляризованной этиленовой

и тиоловой группами может быть изображена следующим образом:



В отличие от карбонильных групп эфиров, кетонов, альдегидов и амидов карбоксильные группы не делают галоидный атом или этиленовую группу реакционноспособными; поэтому акрилат и иодацетат не относятся к числу лакриматоров, тогда как их эфиры вызывают слезотечение. В соответствии с этим акрилат и иодацетат по сравнению с эфирами слабо реагируют с большинством SH-групп.

Мортон и Фридман [1857, 1858] показали, что даже малеиновая кислота может реагировать с SH-группами, если ее концентрация достаточно высока и если инкубация длится несколько часов. Так как в форме свободной кислоты и динатриевой соли молекула симметрична и двойная связь не должна быть поляризована, то в соответствии с приведенным выше механизмом взаимодействия этого не следовало бы ожидать. Однако у мононатриевой соли наличие заряда только на одной из карбоксильных групп, вероятно, может вызвать некоторую поляризацию. Тот факт, что фумарат неэффективен, поддерживает это предположение, так как первая и вторая константы ионизации фумаровой кислоты различаются незначительно, тогда как константы ионизации малеиновой кислоты различаются более чем в 5000 раз. Следовательно, концентрация однозарядного аниона в случае малеата может быть достаточно большой, но в случае фумарата она всегда будет незначительной.

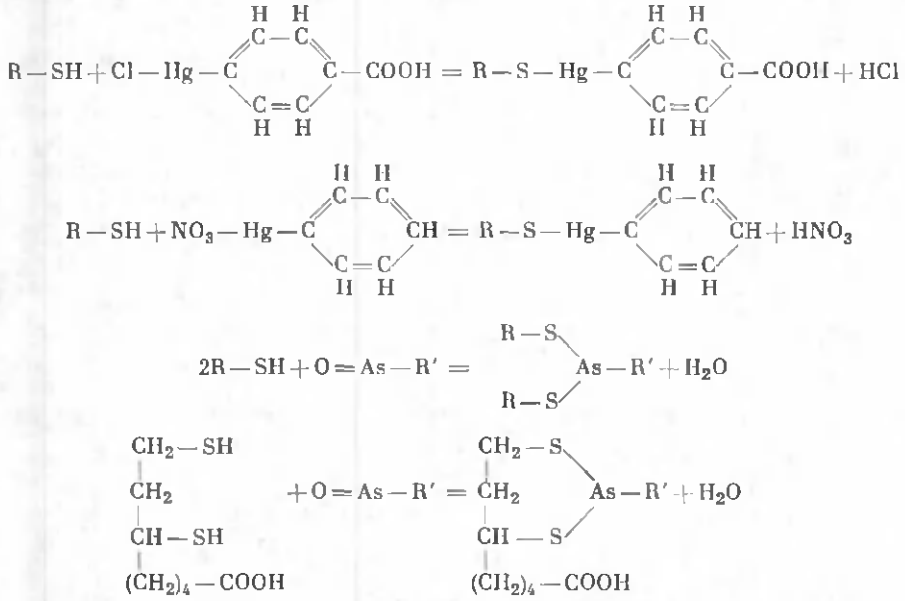
Все соединения, представленные на фиг. 81, ведут себя как общие необратимо действующие яды SH-ферментов. Для идентификации тиоловых групп, от которых зависит активность ферментов, чаще всего используют иодацетамид и хлорацетофенон. Иприт $S(C_2H_4HCl)_2$ иногда ошибочно причисляли к реагентам на тиоловые группы; однако он реагирует с тиоловыми группами значительно медленнее, чем рассмотренные выше соединения, и значительно быстрее их реагирует с другими группами в белках [300].

Иодацетамид не строго специфичен в отношении тиоловых групп. При определенном значении pH он реагирует с остатком гистидина в нативной рибонуклеазе; он может также реагировать с остатком метионина [2507].

Реагенты, образующие меркаптиды. Органические соединения ртути или мышьяка, реагируя с тиоловыми группами, обратимо образуют меркаптиды. Из соединений ртути наиболее широко применяется *п*-хлормеркурибензоат. Следует отметить, что при достаточно высоких концентрациях соединения ртути тормозят действие ферментов не только за счет реакций взаимодействия с SH-группами [2996]. Трехвалентные соединения мышьяка также легко реагируют с SH-группами, хотя их и не используют для определения этих групп. Соответствующие реакции показаны на фиг. 82.

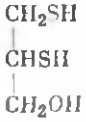
Реагенты, образующие меркаптиды, в отличие от алкилирующих реагентов вызывают торможение, которое легко снимается, особенно при добавлении избытка какого-либо тиолового соединения, например цистеина. В системе устанавливается равновесие и реагент распределяется между тиоловыми группами фермента и тиоловыми группами добавленного тиолового соединения пропорционально их концентрациям и соответствующим величинам сродства. С дитиоловыми соединениями типа восстановленной липоевой кислоты мышьяксодержащие реагенты образуют стабильные кольцевые

структуры, как показано в нижней части фиг. 82. В этом случае при добавлении избытка монотиолового соединения исходное вещество не освобо-



Фиг. 82. Реакции с участием реагентов, образующих меркаптиды.

ждается. Поэтому торможение пируватоксидазной системы препаратами мышьяка, обусловленное атакой на липоатный кофактор, не может быть снято цистеином (см. [2645]). Оно может, однако, быть снято другими *дитиоловыми* соединениями. Исходя из этого, Петерс и его сотрудники [2537] создали лекарственный препарат, известный под названием «британский антилюизит» (БАЛ). БАЛ имеет следующую структуру:



Примечательно, что это соединение, столь близкое липоату, было получено в то время, когда липоат еще не был известен, и что получить его удалось просто на основе анализа химических данных при изучении торможения ферментов. Мышьяксодержащее соединение люизит было одним из наиболее опасных боевых отравляющих веществ, и создание эффективного антидота к нему демонстрирует, сколь важные практические результаты могут быть достигнуты на основе анализа действия ингибиторов ферментов.

Хейнинген (см. [617]) своими изящными опытами доказал, что реагенты, образующие меркаптиды, и алкилирующие реагенты, реагируют с одними и теми же группами ферментов. Он показал также, что с помощью препарата мышьяка (люизита) SH-группы гексокиназы можно защитить от атаки алкилирующего реагента (этилиодацетата) и что активность фермента полностью восстанавливается, если затем удалить препарат мышьяка.

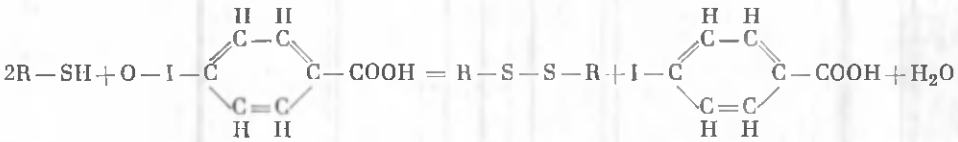
Реагенты, окисляющие тиоловые группы. Тиоловые группы относительно легко окисляются целым рядом окислителей, и тем не менее эти окислители по большей части не рассматриваются как специфичные реагенты для тиоловых ферментов. В ферментах наряду с тиоловыми группами содержатся также и другие окисляемые группы; тиоловые же группы не обязательно

дают при окислении именно дисульфидные группы. Наиболее специфичными реагентами, окисляющими тиоловые группы ферментов до дисульфидных групп, являются, вероятно, сами дисульфиды, например окисленный глутатион, который тормозит действие SH-ферментов и который по этой причине использовался Гопкинсом [1158] в качестве своеобразного индикатора.

В настоящее время в качестве такого реагента чаще всего используется иодозобензоат; однако его следует применять в строго контролируемых условиях, иначе он может атаковать другие группы, например остатки метионина. Реакции, в результате которых некоторые реагенты, окисляющие тиоловые группы, тормозят действие ферментов, представлены на фиг. 83.

$$2R-SH+G-S-S-G = R-S-S-R+2G-SH$$

$$2R-SH+I_2 = R-S-S-R+2HI$$



Фиг. 83. Реакции с участием реагентов, окисляющих тиоловые группы.

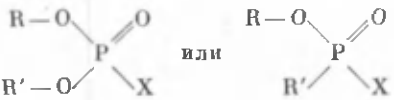
ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Соли тяжелых металлов, таких, как серебро, медь, ртуть и свинец, в высоких концентрациях инактивируют большинство ферментов и служат вообще осадителями белков. Некоторые ферменты чрезвычайно чувствительны даже к низким концентрациям этих металлов. Хорошо известный пример такого явления — торможение β-фруктофуранозидазы солями серебра. Амилаза инактивируется даже насыщенным раствором AgCl [2024]! Механизм торможения в подобных случаях по большей части неизвестен. Некоторые исследователи предполагают, что ионы металла соединяются с тиоловыми группами; другие считают, что в соединение вступают карбоксильные группы. Для β-фруктофуранозидазы Мирбек [1914] показал, что торможение обусловлено соединением Ag^+ с остатком гистидина. Какое-либо общее объяснение для случаев торможения такого рода, по-видимому, сформулировать невозможно.

В большинстве случаев торможение тяжелыми металлами оказывается обратимым при добавлении веществ, образующих комплексы с металлами, например цианида или версена (этилендиаминтетраацетат). Это представляет определенный практический интерес при определении активности ферментов. Увеличение суммарной активности в ходе выделения фермента часто может быть результатом удаления металл-ингибитора в результате добавления некоторых веществ, например цистеина, АТФ, многих буферных веществ (таких, как пирофосфат) или глицилглицина. Денатурированные белки образуют комплексы с металлами значительно легче, чем большинство нативных белков, так что денатурация части белка в процессе работы может вызывать увеличение суммарной активности. Многие реактивы, особенно сульфат аммония и даже обычная дистиллированная вода, часто содержат такое количество ионов тяжелых металлов, которого достаточно, чтобы вызвать заметное торможение чувствительных ферментов. В таких случаях, чтобы избежать необходимости применять высокоочищенные реагенты и дистиллированную воду, перегнанную из стекла, можно рекомендовать проводить все определения активности в присутствии эффективного комплексообразующего агента, например такого, как версен.

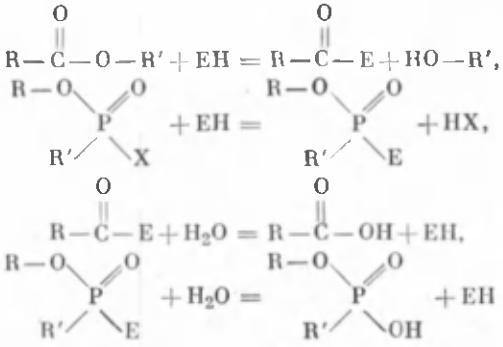
НЕОБРАТИМЫЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ

Вещества с общей формулой

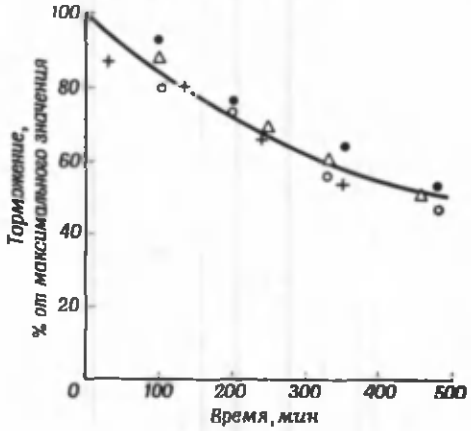


(где R и R′ — алкильные группы, а X радикал — F, — CN или — $OC_6H_4NO_2$) ведут себя как высокоспецифичные ингибиторы ферментов, обладающих эстеразной активностью; особенно эффективно они тормозят действие холинэстеразы и ацетилхолинэстеразы, как это впервые показали в 1941 г. независимо друг от друга Адриан и др. (см. [20]) и Макворт [1667]. Эти ингибиторы подавляют также активность химотрипсина, трипсина, тромбина, плазмина, ацетилэстеразы, карбоксилэстеразы и некоторых липаз [146, 1820, 1887, 2804, 2805]. Все перечисленные ферменты обладают эстеразным действием; следует отметить, однако, что подавляется не только эстеразная, но также и протеолитическая активность (например, в случае химотрипсина). Вся эта группа веществ известна под названием «нервных газов», так как особая чувствительность к ним холинэстераз делает их высокотоксичными для центральной нервной системы. Многие из них нашли практическое применение в клинической медицине, а также в качестве инсектицидов [2309].

Эти вещества — ингибиторы уникального и чрезвычайно интересного типа. Действие их ограничивается ферментами, способными гидролизовать *сложные эфиры*, так как ингибирующая группа образуется при воздействии самого фермента в процессе, аналогичном первой стадии гидролиза субстрата. Как было отмечено в двух предыдущих главах, реакции, катализируемые такими ферментами, осуществляются в две стадии, а именно: а) перенос ацильной группы на фермент с образованием ацилированного фермента и освобождением свободного спирта; б) гидролиз ацилированного фермента (реакции VIII.68 и VIII.70). При действии фосфорорганических *ингибиторов на фермент переносится замещенная фосфорильная* группа (реакция VIII.69) с образованием фосфорилированного фермента и освобождением вещества HX. Фосфорилированный фермент представляет собой, однако, сравнительно стабильное соединение, гидролизующееся лишь с ничтожной скоростью (в тех случаях, когда речь идет о наиболее эффективных ингибиторах данной группы). Правда, в опытах с менее эффективными членами этой группы гидролиз замещенного фермента происходит с измеримой *скоростью* (*реакция* VIII.71); *следовательно, в этих случаях* фермент медленно гидролизует связь P — X фосфорорганического соединения и в конце концов полностью восстанавливает свою активность. При действии же более эффективных ингибиторов активность фермента остается практически все время подавленной. Ниже приводятся реакции, которые помогут уяснить сказанное.

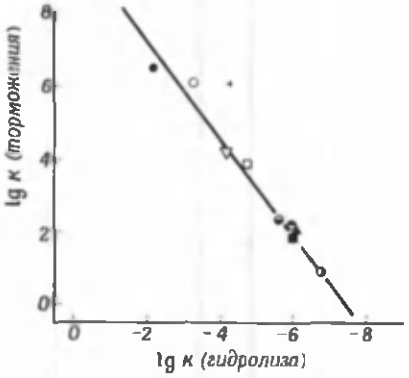


Так как группа X удаляется на первой стадии процесса, то ее природа не может влиять на скорость регенерации фермента в результате реакции (VIII.71). Это было показано Олдриджем и Дэвисоном [46] для серии ингибиторов, имеющих общую формулу $(C_2H_5O)_2{=}PO{-}X$ (фиг. 84).



Фиг. 84. Восстановление холинэстеразной активности после отравления фосфорорганическими ингибиторами, содержащими две этоксигруппы [46].
Инкубация с ингибитором — 30 *мин* с последующим удалением свободного ингибитора путем гидролиза ДФФ-азой (3. 8. 2. 1). Обозначения те же, что и на фиг. 85.

В то же время скорость взаимодействия ингибитора с ферментом в значительной степени зависит от природы группы X. По-видимому, от природы этой группы сходным образом зависит и скорость взаимодействия ингибитора с водой. Другими словами, ингибиторы, наиболее быстро взаимо-



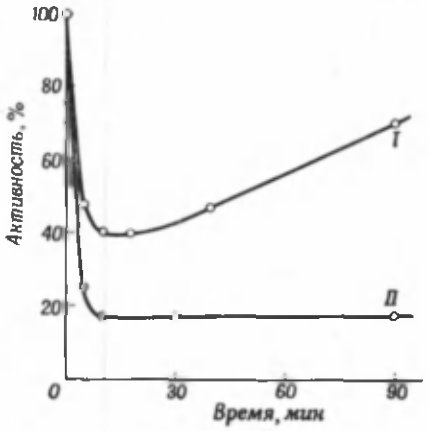
Фиг. 85. Зависимость между устойчивостью к гидролизу и ингибиторной силой некоторых фосфорорганических ингибиторов [45].
По оси абсцисс — логарифм константы скорости гидролиза ингибитора при 37° и pH 7,6; по оси ординат — логарифм константы скорости для бимолекулярной реакции между ацетилхолинэстеразой и ингибитором

△ $(C_2H_5O)_2$ POF
● $(C_2H_5O)_2$ POOPO$(OC_2H_5)_2$
◑ $(C_2H_5O)_2$ $POOC_6H_5$
+ $(C_2H_5O)_2POOC_6H_4NO_2$ (*para*-соединение)
□ $(C_2H_5O)_2$ $POOC_6H_4NO_2$ (*meta*-соединение)
▽ $(C_2H_5O)_2POOC_6H_4NO_2$ (*orto*-соединение)
○ $(C_2H_5O)_2POSC_6H_4NO_2$ (*para*-соединение)
▲ $(C_2H_5O)_2POOC_6H_4Cl$ (*para*-соединение)
◐ $(C_2H_5O)_2POOC_6H_4Cl$ (*orto*-соединение)
◒ $(C_2H_5O)_2$ $PSOC_6H_4NO_2$ (*para*-соединение)
■ $(C_2H_5O)_2$ PSO-8-хинолил

действующие с ферментом, наиболее быстро подвергаются и неферментативному гидролизу [45] (фиг. 85). Другой характер носит влияние групп R, которые остаются в фосфорилированном ферменте и влияют как на скорость соединения ингибитора с ферментом, так и на скорость регенерации фермента. В ряду ингибиторов, в котором X остается неизменным, а изме-

няются группы R, соединения, наиболее быстро подвергающиеся спонтанному гидролизу, могут оказаться наиболее слабыми ингибиторами.

При рассмотрении фосфорорганических ингибиторов необходимо проводить различие между силой торможения, мерой которой служит константа скорости соединения фермента с ингибитором, и «емкостью» ингибитора, которая определяется числом молекул фермента, блокированных одной молекулой ингибитора. Если фосфорилированный фермент гидролизуется с измеримой скоростью, то достигаемое максимальное торможение может оказаться незначительным даже в том случае, когда скорость соединения



Фиг. 86. Торможение ацетилхолинэстеразы в крови кролика диалкилнитрофенилфосфатами [44].

I — $(CH_3O)_2POOC_6H_4NO_2$ (*пара*-соединение; $4{,}7 \cdot 10^{-7}$ *М*);
II — $(C_2H_5O)_2POOC_6H_4NO_2$ (*пара*-соединение; $4{,}1 \cdot 10^{-7}$ *М*).

ингибитора с ферментом высока, так как наблюдаемое торможение представляет собой результат двух процессов, оказывающих противоположное действие; кроме того, в этом случае торможение зависит от времени — оно достигает максимума и затем в конце концов падает до нуля. Если же скорость распада фосфорилированного фермента достаточно мала, то каждая молекула ингибитора сможет в конечном итоге блокировать одну молекулу фермента (или по крайней мере один активный центр) даже в том случае, когда скорость соединения фермента с ингибитором невелика. На фиг. 86 показано различие между влиянием диметил-*п*-нитрофенилфосфата и диэтил-*п*-нитрофенилфосфата; первое из этих соединений образует с ферментом комплекс, распадающийся с большой скоростью, а второе — медленно распадающийся комплекс [44].

Ингибирующая способность сильно зависит также от степени специфичности ингибитора по отношению к активному центру и от чистоты фермента. Если ингибитор будет соединяться с другими группами либо в ферменте, либо в сопутствующих белках, то его «емкость» упадет значительно ниже единицы. Очень высокая токсичность наиболее эффективных ингибиторов рассматриваемой группы связана с их большой специфичностью, а также с высокой стабильностью замещенного фермента.

В то время как по рассмотренным выше причинам диметилсоединения представляют собой сравнительно слабые ингибиторы, диэтилсоединения значительно более эффективны, а такие соединения, как диизопропилфторфосфат (ДФФ) [1], оказываются чрезвычайно сильно действующими ингибиторами, способными тормозить действие холинэстеразы даже в концен-

[1] Для наименования соединений этого типа было предложено несколько систем. Синонимические названия из различных систем можно найти у Ларссона и Холмстедта [1523].

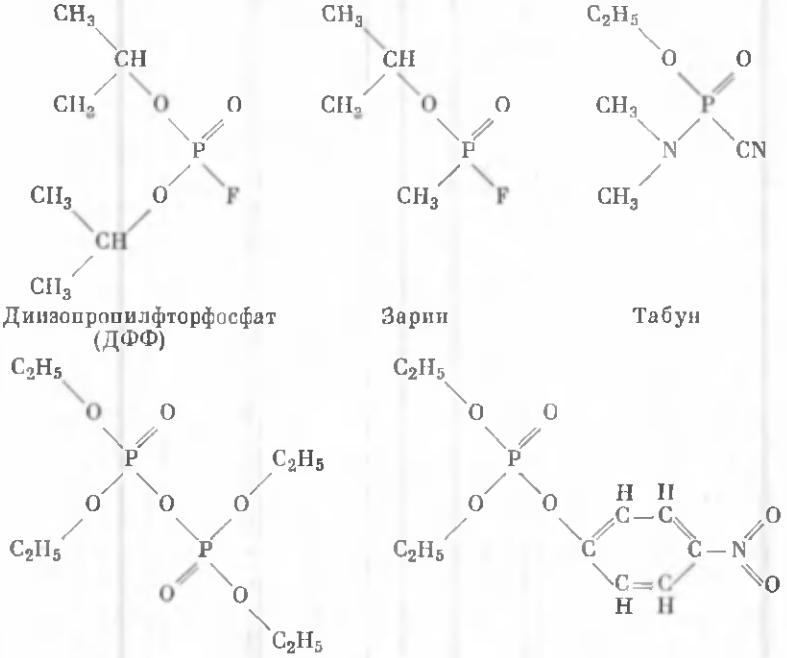
трации 10^{-10} M. ДФФ гидролизуется весьма медленно, образует с ферментом чрезвычайно стабильное соединение (комплекс ДФФ с химотрипсином может быть получен в кристаллическом виде [146]) и ведет себя как высокоспецифичный ингибитор. Было показано, что полное торможение химотрипсина и трипсина достигается даже в том случае, когда на одну молекулу фермента приходится только одна молекула ингибитора (см. гл. X). ДФФ используется также для получения меченых соединений при изучении строения активного центра (см. стр. 416).

Скорость взаимодействия ферментов с ингибиторами этого типа зависит от состояния ионизации определенных групп в активном центре и, следовательно, от pH. Вильсон и Бергман [2883] показали, что торможение холинэстеразы тетраэтилпирофосфатом достигает максимальной скорости при pH 8,0; тот же оптимум pH наблюдается и при гидролизе субстрата (ацетилхолина). Хартли [2982] показал, что скорость реакции диэтил-*п*-нитрофенилфосфата с химотрипсином в кислых растворах уменьшается и в зоне pH 6—8 подчиняется уравнению

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{\bar{k}_i}\left(1 + \frac{H}{K_e}\right) = 0{,}3 + 1{,}27 \cdot 10^6 \cdot H, \qquad \text{(VIII.72)}$$

где k_i — константа скорости бимолекулярной реакции между ферментом и ингибитором (измеряемая в $M^{-1} \cdot мин^{-1}$); $\bar{k}_i$ — соответствующая константа для реагирующей формы фермента. Отсюда $pK_e = 6{,}62$, что достаточно хорошо согласуется с величиной pK_e, определенной по данным реакции с субстратом (см. табл. 32). Следовательно, фосфорорганический ингибитор реагирует, по-видимому, с той же самой ионизирующейся группой в активном центре, что и субстрат. Полученное значение величины pK_e служит дополнительным аргументом в пользу предположения об участии в реакции остатка гистидина.

Формулы некоторых наиболее активных и часто используемых ингибиторов этой группы приведены на фиг. 87; остальные можно найти в обзоре



Фиг. 87. Строение некоторых фосфорорганических ингибиторов.

Сартори [2306]. Наиболее эффективные члены этой группы — по сути и наиболее активные среди всех известных ингибиторов ферментов. Вызываемое ими торможение стабильно, и активность фермента спонтанно не восстанавливается. Реактивация, однако, оказывается возможной при обработке определенными оксимами или гидроксамовыми кислотами [449, 558, 895, 2881]; такая обработка приводит к удалению фосфорильной группы. В процессе инкубации ацетилхолинэстераза, активность которой подавлена ДФФ или зарином, превращается в форму, способную к реактивации. Это превращение обусловливается тем, что диизопропилфосфорилфермент утрачивает одну изопропильную группу, а моноизопропилфосфорилфермент оказывается более стабильным по отношению к нуклеофильной атаке [211].

Хотя рассматриваемые ингибиторы и являются столь сильными, присутствие субстрата, а также конкурентных ингибиторов защищает фермент от их действия [1417]. Это можно объяснить, исходя из допущения, что эти ингибиторы реагируют только со *свободным* активным центром.

ИНГИБИТОРЫ ДЫХАНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

В разделе об ингибиторах, действующих на тяжелые металлы, мы уже упоминали ряд ингибиторов цитохромоксидазы (например, цианид), которые блокируют конечное звено дыхательной цепи. Имеется, однако, ряд других ингибиторов, действующих на определенные промежуточные стадии. Некоторые из них, например уретан, антимицин и БАЛ + O_2 (которые действуют между цитохромами *b* и c_1 или между убихиноном и цитохромом c_1), а также амитал и хлорпромазин (которые тормозят восстановление убихинона при помощи НАД·H_2), широко использовались для выяснения последовательности расположения переносчиков в дыхательной цепи. Эти соединения отличаются от обычных ингибиторов ферментов тем, что они действуют только на ферменты, находящиеся в определенной фракции митохондрий, а именно в нерастворимых частицах; на изолированные ферменты, катализирующие соответствующие реакции, такие соединения не действуют. Таким образом, их действие может быть по крайней мере частично связано с их влиянием на физические свойства системы; известно, что рассматриваемые системы чувствительны ко многим поверхностно-активным веществам, а также к таким ферментам, как лецитиназа.

Соединения, нарушающие связь между окислением и фосфорилированием, иными словами — освобождающие дыхание от тормозящего влияния, которое оказывает на него сопряженное с ним фосфорилирование, известны под названием «разобщающих агентов». К их числу относятся динитрофенол, грамицидин и дикумарин. Обсуждение вопроса о действии разобщающих агентов можно найти у Рекера [2155]. Механизм действия этих ингибиторов в большинстве случаев неясен; вполне возможно, что существует несколько разных механизмов. Было показано, что разобщающий агент дикумарин является исключительно мощным ингибитором менадионредуктазы (1.6.5.2); в концентрации 10^{-8} *M* он очень сильно тормозит действие этого фермента.

КОНКУРЕНТНЫЕ ИНГИБИТОРЫ

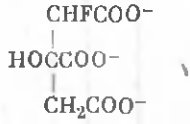
В литературе упоминается много веществ, сходных по строению с субстратами ферментов и действующих как конкурентные ингибиторы. Насколько известно, действие большинства из них ограничивается каким-либо одним ферментом. Имеющиеся наблюдения слишком многочисленны и слишком отрывочны, а потому их весьма трудно обобщить. Высокая специфичность, которую ферменты проявляют по отношению к своим субстратам, распространяется также и на конкурентные ингибиторы, о чем мы уже говорили в гл. VI. Систематическое изучение конкурентных ингибиторов

представляет плодотворный путь для углубления наших знаний о процессе взаимодействия фермента с субстратом и о природе групп фермента и субстрата, участвующих в этом взаимодействии.

Классическим примером конкурентного ингибитора может служить малонат, который действует как мощный ингибитор сукцинатдегидрогеназы [2134]. Своей ингибиторной силой он обязан тому обстоятельству, что он обладает двумя карбоксильными группами, расположенными приблизительно на таком же расстоянии, как и в молекуле сукцината, но без окисляемой CH_2 — CH_2-группы между ними. Малонат широко использовался при выяснении важной роли сукцинатдегидрогеназы в метаболизме, а также для доказательства существования цикла лимонной кислоты. Кинетика малонатного торможения была изучена Торном [2647]. Пирофосфат, в молекуле которого имеются две кислотные группы, расположенные в пространстве примерно таким же образом, тоже тормозит действие сукцинатдегидрогеназы, но не подавляет активности других дегидрогеназ [1542].

Ферменты цикла лимонной кислоты катализируют превращения ди- и трикарбоновых кислот, и было показано, что для некоторых из них эти кислоты служат ингибиторами. Массей [1746], например, нашел, что действие фумаратгидратазы тормозится солями всех изученных им ди- и трикарбоновых кислот (в общей сложности около десятка, включая и малонат), но не тормозится солями монокарбоновых кислот. Почти во всех случаях было показано, что ингибиторы конкурируют с субстратом.

Петерс [2077, 2078] показал, что фторцитрат



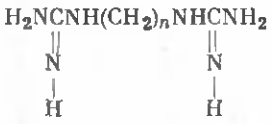
специфически тормозит действие аконитатгидратазы. Этот случай мог бы, казалось, служить примером только что упомянутого типа торможения; однако ряд обстоятельств делает его уникальным. Торможение, по-видимому, ограничивается аконитатгидратазой, развивается медленно (для достижения максимального торможения продолжительность инкубации должна составлять не менее 15 *мин*) и в опытах с синтетическим фторцитратом (в отличие от фторцитрата, полученного ферментативным путем) не является истинно конкурентным.

Фторцитрат был открыт в результате работы с высокотоксичным веществом — фторацетатом (FCH_2COO^-). Токсичность фторацетата связана с явлением, которое Петерс [2076] назвал «летальным синтезом» в организме, а именно с его превращением во фторцитрат под действием нитратсинтезирующих ферментов. Именно этот последний продукт и представляет собой подлинный токсичный агент, блокирующий цикл лимонной кислоты на стадии аконитатгидратазы. Синтезируемый в организме фторцитрат был выделен и сравнен с синтетическим фторцитратом. Оказалось, что в опытах с очищенной аконитатгидратазой синтетический фторцитрат в 10—15 раз более эффективен, чем естественно образующийся фторцитрат, причем торможение синтетическим фторцитратом при достаточно продолжительной инкубации становится неконкурентным. Правда, в опытах с некоторыми ферментными препаратами фторцитрат, образующийся ферментативным путем, оказался в 2 раза эффективнее синтетического. Эти различия не получили объяснения, но, несомненно, они связаны с присутствием различных стереоизомеров фторцитрата.

Стереохимия фторцитрата, который имеет два центра асимметрии, характеризуется рядом особенностей, анализ которых может пролить свет на процесс торможения ферментов; эти особенности обсудил в своей работе Кэксер [1280].

Сильным ингибитором глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы (1.2.1.12) является D-треозо-2,4-дифосфат [755, 2158]. Окисление D-глицеральдегид-3-фосфата при помощи НАД сильно и неконкурентно тормозится 10^{-6} *М* тетрозодифосфатом (в то время как окисление НАД·H_2 1,3-дифосфоглицериновой кислотой тормозится лишь в незначительной степени). Торможение, по-видимому, обусловлено окислением тетрозодифосфата при помощи НАД с образованием стабильного дифосфотетроноилфермента. Этот процесс аналогичен образованию 3-фосфоглицероилфермента в нормальной реакции. Однако, в то время как фосфоглицероильная группа переносится от промежуточного соединения на молекулу неорганического фосфата, расположенную на соседнем участке фермента, в «заторможенном» ферменте этот участок занят не свободным фосфатом, а вторым фосфатным остатком дифосфотетроноильной группы, так что перенос с освобождением фермента оказывается невозможным и дифосфотетроноильная группа не вытесняется конкурентно глицеральдегидфосфатом. Незначительное торможение обратной реакции под действием того же тетрозодифосфата не является неожиданным, так как для окисления тетрозы до ингибирующей тетроноильной группы необходим НАД, а он может образоваться только при окислении добавленного НАД·H_2 в ходе обратной реакции.

Подобно тому как дикарбоновые кислоты оказываются конкурентными ингибиторами ферментов, катализирующих превращения дикарбоновых кислот, точно так же и многие замещенные диамины конкурентно подавляют активность диаминоксидаз. Блашко и др. [271] изучили действие ряда соединений, имеющих общую формулу

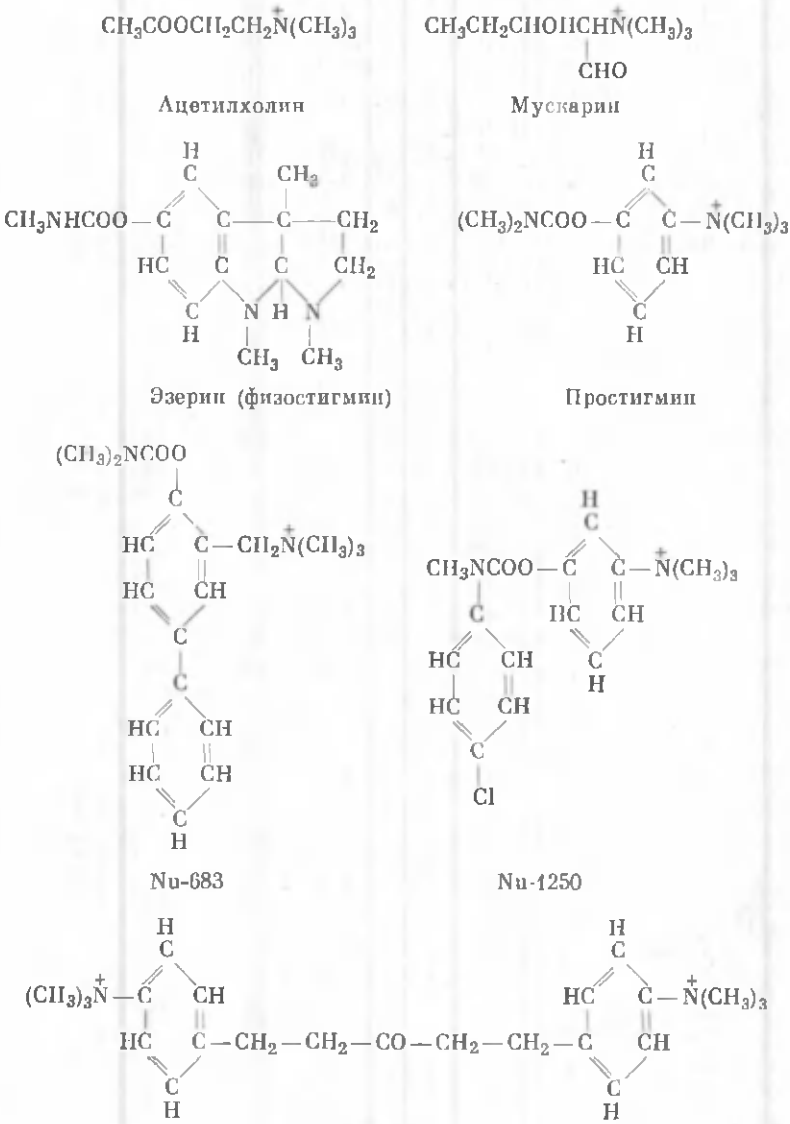


а также других соединений, близких субстрату $H_2N(CH_2)_n\ NH_2$. Эти вещества оказались мощными ингибиторами диаминоксидазы. Тормозящее действие их зависит от величины *n* почти таким же образом, как и сродство субстратов к ферменту; при малых значениях *n* оно проявляется очень сильно, а при увеличении *n* постепенно ослабевает и при $n = 18$ падает до нуля. Моногуанидиновые производные вызывают только незначительное торможение. В то же время в опытах с моноаминоксидазой [269] торможение дигуанидинами становится заметным только тогда, когда *n* очень велико и каждый из концов молекулы может фактически рассматриваться как моногуанидиновое соединение. Для моноаминоксидазы, действующей на субстрат $CH_3(CH_2)_nNH_2$, моногуанидины, моноамидины и даже соединения типа $CH_3(CH_2)_nNHCH_3$ являются мощными ингибиторами [2968].

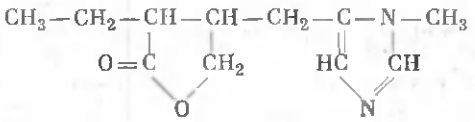
Многие соединения, содержащие основные атомы азота (особенно в том случае, когда последние находятся в гетероциклических кольцах), используются в качестве лекарственных препаратов. Таковы, например, *алкалоиды* — большая и важная группа веществ растительного происхождения. Эффекты, которые они вызывают, объясняются, вероятно, тем, что эти вещества действуют как ингибиторы ферментов; однако только в немногих случаях анализ их действия позволил идентифицировать те ферменты, активность которых оказывается подавленной. В качестве одного из примеров можно указать эзерин (физостигмин) — эффективный парасимпатомиметический препарат, получаемый из калабарских бобов. Его фармакологическая активность и его токсичность связаны с тем, что он является чрезвычайно мощным ингибитором холинэстеразы и ацетилхолинэстеразы, т. е. препятствует удалению ацетилхолина, образующегося в результате нервного импульса. Многие другие алкалоиды также в той или иной степени тормозят действие холинэстераз; к числу их относятся никотин, мускарин, мор-

фин и его производные, кокаин и родственные ему соединения (но не атропин), стрихнин и алкалоиды группы хинина. Наиболее сильно действующим среди природных ингибиторов холинэстеразы следует считать эзерин, для которого $K_i = 5 \cdot 10^{-8}$.

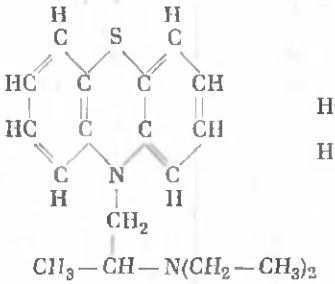
Активность холинэстераз подавляется бо́льшим числом природных и синтетических веществ, чем активность любой другой группы ферментов. Наиболее мощные ингибиторы имеют четвертичный или основной атом азота; они часто содержат некоторые эфироподобные группировки, например уретановую группу, и являются высокометилированными. Естественно ожидать, что все эти особенности должны обусловливать конкуренцию с субстратом — ацетилхолином, который имеет высокометилированный атом азота в холиновом остатке, связанном через посредство эфирной группы (подвергающейся ферментативному расщеплению) с метилсодержащим ацетильным остатком. На фиг. 88 показана структура субстрата и некоторых



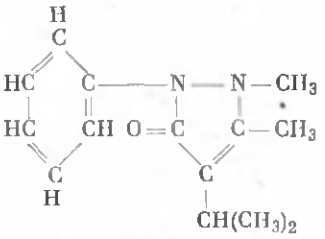
62C47



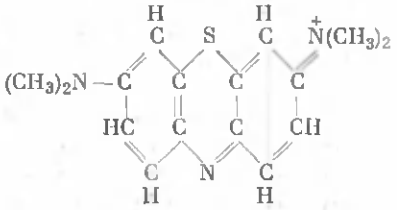
Пилокарпин



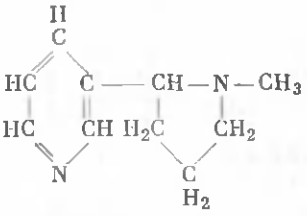
Лизиван



Изопропилантипирин



Метиленовый синий



Никотин

Фиг. 88. Строение некоторых специфических ингибиторов холинэстераз.

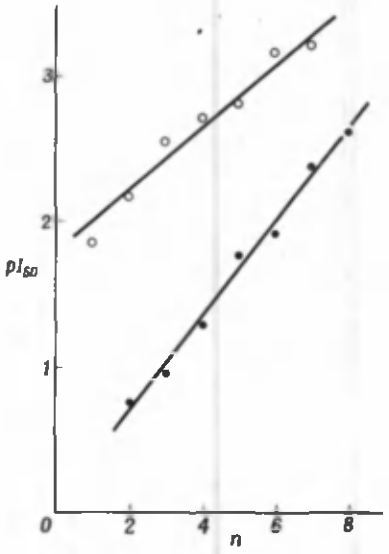
наиболее активных ингибиторов холинэстераз. Более полные сводки опубликованы Августинсоном [97] и (с большим числом данных количественного характера) Тодриком [2664].

Ингибиторы типа эзерина и простигмина, содержащие незамещенную или замещенную карбамоильную группировки, на первый взгляд ведут себя как типичные конкурентные ингибиторы; присутствие субстрата до известной степени препятствует их действию. Большое значение имеет, однако, последовательность введения в среду ингибитора и субстрата. Если *ингибитор добавляют к ферменту раньше*, чем субстрат, то торможение наступает сразу же и бывает гораздо более сильным, чем в том случае, когда ингибитор и субстрат добавляют одновременно, причем после добавления субстрата скорость гидролиза увеличивается весьма медленно. Вильсон и др. [2886] показали, что эти ингибиторы по своему действию напоминают фосфорорганические соединения, так как они переносят свою карбамоильную группу на активный центр фермента, в результате чего образуется карбамоилфермент, который гидролизуется относительно медленно. Карбамоилхолин — довольно плохой субстрат — образует карбамоилфермент так же, как и ингибитор эзерин. Снятие торможения обусловливается медленным декарбамоилированием фермента под действием воды; гидроксиламин значительно ускоряет этот процесс.

Различные холинэстеразы подавляются не всегда одинаково. Ацетилхолинэстеразы, в частности, значительно отличаются от холинэстераз чувствительностью в отношении различных конкурентных ингибиторов; эти *различия настолько сильно выражены, что*, например, Nu-683 [1030] и лизиван [180] рассматриваются как специфические ингибиторы для холинэстеразы, а Nu-1250 [1031] и 62C47 [180] — как ингибиторы ацетилхолинэстеразы. Отношение концентраций, необходимых для 50%-ного подавления

активности соответственно холинэстеразы и ацетилхолинэстеразы, составляет 500 для Nu-1250 и 50 000 для 62C47 [180], а это означает, что при соответствующих концентрациях названных ингибиторов активность ацетилхолинэстеразы может быть практически полностью подавлена, в то время как активность холинэстеразы не понизится вообще.

Тщательное изучение гомологичных рядов ингибиторов обеих холинэстераз было проведено Бергманом и Сегалом [226]. На фиг. 89 представлен график зависимости между концентрацией, вызывающей подавление активности фермента на 50%, и величиной n для ингибиторов типа $CH_3(CH_2)_nN^+(CH_3)_3$.



Фиг. 89. Зависимость эффективности торможения холинэстераз от длины цепи для соединений типа $CH_3(CH_2)_nN^+(CH_3)_3$ [226].
● холинэстераза при 37°,
○ ацетилхолинэстераза при 23°.

Во всех случаях торможение усиливается при увеличении длины цепи; так как при постоянной концентрации субстрата pI_{50} пропорционально pK_i, то можно сделать вывод, что свободная энергия процесса соединения возрастает линейно с увеличением n (за исключением одного случая) и, следовательно, свободная энергия соединения CH_2-группы с ферментом остается постоянной в пределах данного ряда. Трудно сравнивать кривые, полученные для холинэстеразы, с кривыми для ацетилхолинэстеразы, так как эти ферменты изучались при разных значениях температуры. Можно допустить, что путем экстраполирования до $n = 0$ элиминируется участие углеводородной цепи и что при этом определяют свободную энергию взаимодействия фермента с ионом тетраметиламмония.

Все до сих пор упоминавшиеся в этом разделе конкурентные ингибиторы представляют собой вещества, несущие кислотные или основные группы; однако и неионизирующиеся молекулы, например сахара, часто ведут себя как конкурентные ингибиторы ферментов, действующих на сходные с ними молекулы. Так, например, активность гексокиназы мозга конкурентно подавляется D-ксилозой, D-ликсозой и 6-дезокси-D-глюкозой [2469]; фенил-β-тиогалактозид тормозит действие β-галактозидазы, а D-глюкоза (продукт реакции) конкурентно подавляет активность α-глюкозидазы. Все эти вещества почти идентичны соответствующим субстратам и отличаются от них лишь каким-нибудь одним незначительным изменением — замещением — OH на — H в положении 6, или — CH_2OH на — H в положении 5, или — O — на — S — в гликозидной связи.

По отношению к конкурентным ингибиторам, содержащим асимметричный атом углерода, ферменты обычно обнаруживают такую же выраженную стереохимическую специфичность, какую они обнаруживают по отношению к субстратам (см. стр. 179). Так, например, аргиназа подавляется L-лейцином, но не подавляется D-лейцином [1191]. Однако если различие в пространственном расположении ограничивается только той частью молекулы ингибитора, которая не участвует во взаимодействии с ферментом, то такой специфичности может не наблюдаться. Иногда оптический изомер специфичного субстрата, не атакуемый ферментом, неожиданно оказывается конкурентным ингибитором. Вероятно, в подобных случаях некоторые индивидуальные группы взаимодействуют с ферментом достаточно эффективно для того, чтобы удерживать вещество на ферменте, хотя другие группы

не могут взаимодействовать из-за неблагоприятной конфигурации. Так, например, карбобензоксиглицил-D-фенилаланин тормозит гидролиз карбобензоксиглицил-L-фенилаланина, катализируемый карбоксипептидазой [2503].

АНТИФЕРМЕНТЫ

Так как ферменты представляют собой белки, то, если их ввести в кровь животного, они могут вызывать образование соответствующих антител. Был получен ряд антисывороток, содержащих антитела, специфичные по отношению к отдельным ферментам, и небольшое число «антиферментов» было очищено. В некоторых случаях высокоспецифичным методом получения антител может служить их осаждение при помощи самого фермента с последующим удалением фермента (путем денатурации) из осажденного комплекса фермент — антитело. Характер образующихся антител зависит от наличия определенных групп и расположения этих групп в белковой молекуле, причем нет никаких оснований предполагать, что это именно те группы, которые связаны с активным центром фермента. Таким образом, в отличие от ингибиторов, действие которых мы обсуждали выше, антиферменты в общем случае специфичны не по отношению к активному центру, а по отношению к ферментному белку в целом. Если антигенные группы фермента расположены вне его активного центра, то последний и в фермент-антиферментном комплексе может оставаться доступным для субстрата, а следовательно, такой фермент может быть осажден без значительной утраты активности. Если же участки фермента, от которых зависят его антигенные свойства, частично охватывают и область активного центра, то антифермент будет мощным ингибитором, конкурирующим с субстратом.

Известны и те и другие случаи. Например, катехолоксидаза полностью сохраняет активность при осаждении соответствующей антисывороткой, тогда как лецитиназа утрачивает ее почти целиком. К промежуточным случаям относится действие антиферментов на уреазу, каталазу, папаин и рибонуклеазу; эти ферменты при осаждении специфичными антителами сохраняют свою активность частично. Выяснено, что у щелочной фосфатазы антигенный центр не совпадает с активным центром фермента [2328].

Вопрос об антиферментах подробно рассматривается в обзоре Мэррека [1729].

Антиферменты могут служить весьма эффективным орудием при исследовании ферментов, полученных из различных источников, а также при изучении природы изоферментов. Оба эти вопроса обсуждаются в гл. XIII.

ГЛАВА IX

КОФАКТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Для осуществления ферментативной реакции во многих случаях необходимо, помимо субстрата и фермента, еще одно вещество. Такого типа вещества — их называют «кофакторами»— не изменяются к концу реакции, и потому их можно рассматривать как важный элемент механизма катализа. Большая часть кофакторов — это либо специфичные коферменты (обычно органические вещества довольно сложного строения), принимающие непосредственное участие в ферментативной реакции, часто как переносчики некоторых химических групп, либо активаторы (обычно несложные вещества, например неорганические ионы), которые действуют непосредственно на фермент, переводя его в активное состояние.

Специфичные коферменты

Некоторые специфичные коферменты — в частности те, которые служат переносчиками групп, — можно рассматривать и как коферменты и как субстраты, в зависимости от того, о какой ферментной системе идет речь. В гл. XII разбирается вопрос о том, как эти коферменты, служащие обычно связующим звеном между двумя ферментами, обеспечивают образование единой ферментной системы в реакциях переноса групп: один из ферментов системы переносит группу от первого субстрата к коферменту, а другой — от кофермента ко второму субстрату. В таких случаях кофермент по отношению ко всей ферментной системе является истинным коферментом, а по отношению к каждому отдельному ферменту системы — субстратом. Явление это можно проследить практически лишь в тех случаях, когда из данной ферментной системы удается выделить входящие в ее состав ферменты. Наглядным примером может служить ферментная система «альдегидмутазы» (см. стр. 470). Ранее считалось, что в состав этой системы входит только один фермент, который катализирует дисмутацию двух молекул альдегида с образованием одной молекулы кислоты и одной молекулы спирта в присутствии кофермента НАД. В настоящее время установлено, что в ее состав входят две дегидрогеназы. Для каждой из них НАД служит одним из субстратов; однако по отношению ко всей мутазной *системе* его, безусловно, следует рассматривать как кофермент.

В Списке ферментов в квадратных скобках приведены те кофакторы, присутствие которых необходимо для того, чтобы данная ферментативная реакция могла идти; в то же время там, где приводятся отдельные стадии реакции, эти коферменты рассматриваются как субстраты и фигурируют в качестве непосредственных участников реакции.

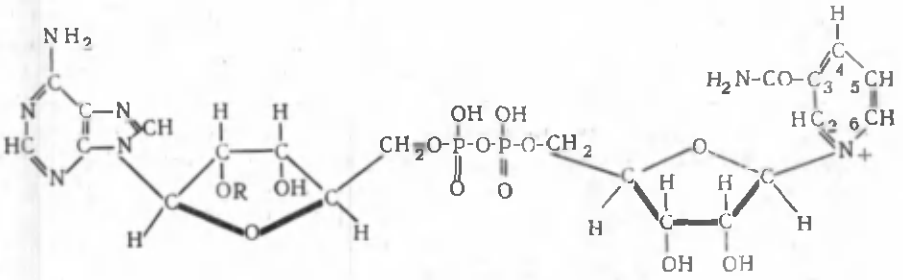
Ниже мы рассмотрим сначала отдельные коферменты, функционирующие как переносчики определенных групп, а затем простетические группы, которые функционируют как прочно связанные кофакторы.

ПЕРЕНОСЧИКИ ВОДОРОДА

НАД и НАДФ

НАД и НАДФ[1] представляют собой родственные динуклеотиды, содержащие аденин и никотинамид (более подробную характеристику см. в обзоре Каплана [1302]). Об их существовании известно уже давно, однако их химическое строение и механизм действия были расшифрованы полностью сравнительно недавно.

Существование термостабильного кофермента, принимающего участие в процессе брожения («козимаза», которая теперь идентифицирована как НАД), было обнаружено Гарденом и Йонгом [1002, 1003] еще в 1904 г.; однако выделить этот кофермент тогда не удалось. В высокоочищенном виде



Фиг. 90. Строение НАД и НАДФ (окисленные формы).
R обозначает — H для НАД и — $PO(OH)_2$ для НАДФ.

данный кофермент был получен в 1936 г. Эйлером и др. [710] и независимо от них Варбургом и Христианом [2785]. НАДФ был открыт Варбургом и Христианом [2783] в 1931 г. как кофермент глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (1.1.1.49). Доказательства того, что активной группой как в НАД, так и в НАДФ является никотинамид и что эта группа функционирует, подвергаясь попеременно восстановлению и окислению, были получены благодаря работам Варбурга и Христиана [2785, 2790]. НАДФ отличается от НАД только тем, что он содержит дополнительную фосфатную группу, которая легко отщепляется (например, под действием фосфатазы); положение этой фосфатной группы было установлено только в 1950 г. Корнбергом и Прейсером [1435].

Строение. Строение окисленных форм НАД и НАДФ изображено на фиг. 90.

Приведенная формула представляет катион молекулы; положительный заряд у атома азота может нейтрализоваться каким-либо содержащимся в растворе анионом, например Cl^-. При pH 7,5 кислотные группы обоих фосфатных остатков в НАД ионизированы, поэтому его общий заряд равен —1 и НАД можно рассматривать как диполярный ион, несущий еще и отрицательный заряд. В НАДФ ионизированы те же группы и, кроме того, еще

---

[1] Эти коферменты известны под различными названиями, а именно:

Никотинамидадениндинуклеотид (НАД)	*Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ)*
Кофермент I (КоI)	Кофермент II (КоII)
Козимаза	Фосфокозимаза
Дифосфопиридиндинуклеотид (ДПН)	Трифосфопиридиннуклеотид (ТПН)

Первое (выделенное курсивом) название каждого кофермента в настоящее время официально принято как Международным биохимическим союзом, так и Международным союзом чистой и прикладной химии. Мотивировка этого решения приведена в гл. 4 Отчета Комиссии по ферментам Международного биохимического союза [2212].

две кислотные группы дополнительного фосфатного остатка, поэтому общий заряд иона оказывается равным —3.

Остатки D-рибозы соединены с атомами азота аденина и никотинамида при помощи β-гликозидных связей. Тодд и его сотрудники [569] первыми обнаружили β-рибозидные связи в аденозине и некоторых других природных нуклеозидах; ими же было высказано предположение о том, что наличие β-рибозидных связей в нуклеозидах является, возможно, общим правилом. При гидролизе обоих коферментов под действием нуклеотид-пирофосфатазы (3.6.1.9) образуется обычная адениловая кислота; следовательно, связь между аденином и сахаром в обоих коферментах имеет β-конфигурацию. Сведения о характере никотинамид-рибозидной связи получены при изучении неактивного изомера НАД, на долю которого приходится около 10—15% даже в очень чистых продажных препаратах [1304]. Этот изомер не поддается действию тех ферментов, которые действуют на обычный НАД, в том числе ряда дегидрогеназ и НАД(Ф)-нуклеозидазы (3.2.2.6). После разрушения обычного НАД действием НАД(Ф)-нуклеозидазы из препарата можно выделить неактивный изомер кофермента. Не отличаясь от обычного НАД химическим составом, этот изомер при гидролизе дает обычную адениловую кислоту и никотинамидмононуклеотид, оптическое вращение которого противоположно по знаку вращению обычного никотинамидмононуклеотида; гидролиз обоих никотинамидмононуклеотидов приводит, однако, к образованию одного и того же рибозо-5-фосфата. Отсюда следует, что обычный НАД и его неактивный изомер отличаются, по-видимому, только конфигурацией никотинамид-рибозидной связи. При изучении оптического вращения обоих этих изомеров и продуктов их гидролиза получены следующие данные:

	Обычный НАД	*Неактивный изомер*
Исходный динуклеотид	—34,8°	+14,3°
Никотинамидмононуклеотид	—38,3°	+58,2°
Рибозо-5-фосфат, полученный из соответствующего мононуклеотида	—2,7°	+ 4,7°

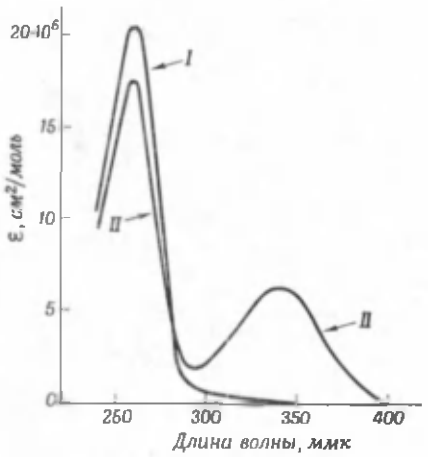
(Для обычного аденозинмонофосфата $[\alpha]_D^{1\%} = -40{,}0°$.)

Эти данные говорят о том, что в нормальном изомере никотинамид-рибозидная связь имеет β-конфигурацию, тогда как неактивный изомер содержит α-связь. Полный синтез НАД был осуществлен Хьюзом, Кеннером и Тоддом [1187]. Методы синтеза нуклеотидных коферментов рассмотрены в обзоре Бэддилея и Хьюза [130].

Восстановление. Коферменты легко восстанавливаются химическими восстановителями, например гидросульфитом, а также ферментативным путем — с участием тех дегидрогеназ, по отношению к которым они специфичны, причем реакция восстановления обратима; в обоих случаях образуется одна и та же восстановленная форма. На восстановление каждой молекулы расходуется два эквивалента водорода. Варбург и Христиан установили, что восстановлению подвергается никотинамидное кольцо. При восстановлении коферментов изменяется спектр их поглощения в ультрафиолете: окисленная форма обнаруживает полосу поглощения только при 260 *ммк*, что обусловлено наличием пуринового и пиридинового кольца, а восстановленная форма имеет еще одну полосу поглощения, при 340 *ммк* (фиг. 91). Эта вторая полоса обусловлена хиноидной структурой восстановленного никотинамидного кольца. Эту же полосу дают и простые производные никотинамида (например, иодметилат никотинамида) в восстановлен-

ном состоянии. Нуклеотиды, не содержащие никотинамида, не дают такой полосы.

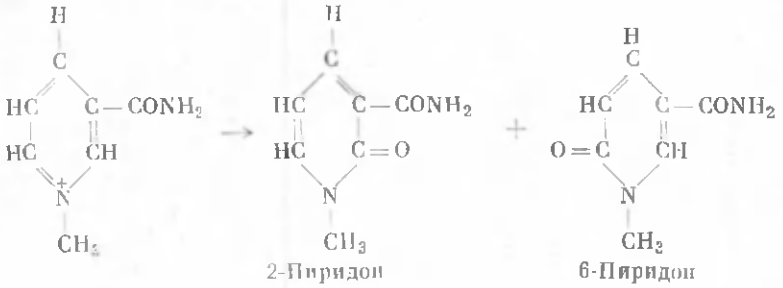
Дальнейшее доказательство того, что в дегидрогеназной реакции восстанавливается именно никотинамидное кольцо, Варбург и Христиан получили следующим образом. При восстановлении коферментов водородом в присутствии платинового катализатора поглощается не два, а шесть эквивалентов водорода и пиридиновое кольцо восстанавливается до пиперидинового, причем в результате образуется продукт, не способный принимать участие в ферментативной реакции и не дающий полосы поглощения при 340 *ммк*. Если кофермент вначале восстанавливается дегидрогеназой (с поглощением двух эквивалентов водорода), а затем водородом в присутствии Pt, то в последней реакции поглощается не шесть, а четыре эквивалента водорода. Это свидетельствует о том, что два эквивалента водорода, присоединившихся при действии фермента, поступают в то же положение, что и два атома из шести атомов водорода, присоединяющихся при восстановлении окисленной формы водородом в присутствии Pt. Если бы они присоединились к любой другой части молекулы, то во второй стадии восстановления потребовалось бы еще шесть эквивалентов водорода. Естественно допустить, что при ферментативной реакции гидрируется одна двойная связь; это должно приводить к образованию структуры с распределением связей, похожим на распределение связей в *о*-хиноне, и обусловливать появление полосы поглощения при 340 *ммк*. Данные, полученные при изучении химических свойств модельных соединений, указывали, что восстановление идет по связи у атома N, но точку гидрирования установить не удавалось: одни исследователи считали, что затрагивается атом углерода в положении 2, а другие указывали на положение 6.



Фиг. 91. Спектры окисленной (*I*) и восстановленной (*II*) форм НАД и НАДФ.

Каким образом идет восстановление коферментов, удалось выяснить с помощью дейтерия. В гл. VII мы ссылались на работу Венесланда и др., в которой показано, что при ферментативном восстановлении НАД дейтерированными субстратами атом дейтерия поступает всегда в одно определенное положение никотинамидного кольца. Химическими способами оказалось возможным определить положение этого атома дейтерия и таким образом установить строение восстановленной формы кофермента.

Пулмен, Сан-Пиетро и Коловик [2125] использовали способность иодметилата никотинамида окисляться щелочным феррицианидом в смесь 2- и 6-пиридонов, как показано ниже:



(IX.1)

Эти пиридоны могут быть разделены. Если никотинамид содержал атом дейтерия при втором углеродном атоме, то дейтерий обнаружится в 6-пиридоне, а 2-пиридон не будет его содержать, так как дейтерий будет удаляться при окислении. И наоборот, если атом дейтерия был связан с шестым углеродным атомом, то дейтерий обнаружится только в 2-пиридоне. Для того чтобы применить такой тест к коферменту, необходимо выделить никотинамид из кофермента, в который путем восстановления предварительно был введен дейтерий. Это можно осуществить, используя НАД(Ф)-нуклеозидазу (3.2.2.6) (из селезенки), которая гидролизует никотинамид-рибозную связь. Однако, поскольку данный фермент не действует на восстановленную форму НАД, дейтерированный кофермент должен быть предварительно снова окислен. Если и первоначальное восстановление и последующее окисление провести ферментативным путем, то весь дейтерий снова будет удален; следовательно, необходимо либо восстанавливать химическим путем, а окислять ферментативно, либо восстанавливать ферментативно, а окислять химическим путем.

Пулмен и его сотрудники использовали оба эти метода. В первом случае кофермент восстанавливался гидросульфитом в D_2O. При этом происходило образование смеси двух стереоизомеров; в одном из них дейтерий находился перед плоскостью кольца, а в другом — за нею:



(IX.2)

Оба эти изомера мы представили здесь не полностью, чтобы не указывать место восстановления. Две стороны плоскости кольца не равноценны вследствие наличия боковой амидной цепи в положении 3 (см. стр. 241). При последующем окислении этой смеси алкогольдегидрогеназой и альдегидом водород (или дейтерий) удаляется только с одной стороны плоскости кольца; образуется смесь двух форм окисленного кофермента — с атомами водорода и с атомами дейтерия, которые лежат теперь в плоскости кольца:



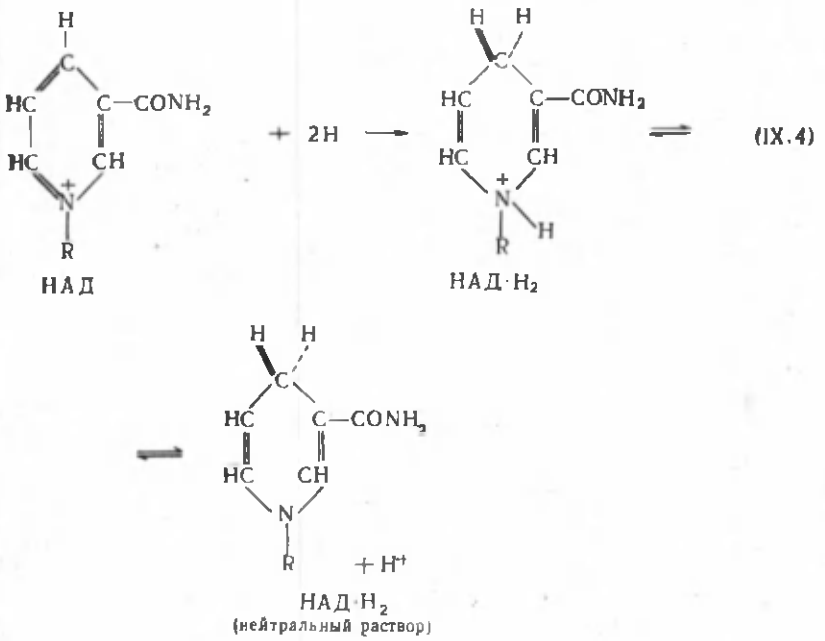
(IX.3)

Из такой смеси после ферментативного гидролиза был выделен никотинамид, который был затем превращен в пиридоны способом, описанным выше. Оказалось, что 2- и 6-пиридоны содержат равные количества дейтерия и что при обработке никотинамида щелочным феррицианидом дейтерий не удаляется. Это противоречит старым представлениям, ибо указывает на то, что дейтерий (а следовательно, и водород) поступает не в положения 2 или 6, а в положение 4 (что является единственно возможным); таким образом, восстановление идет не по двойной связи, а затрагивает все кольцо.

Естественно, однако, предположить, что атом дейтерия, введенный при химическом восстановлении, занимает положение, *недоступное* действию фермента, поскольку этот атом не удаляется при ферментативной реакции. Чтобы избежать этого возражения, Пулмен и его сотрудники повторили свои опыты, но в обратной последовательности (вторым методом): после ферментативного восстановления они провели химическое окисление нейтральным феррицианидом, который в противоположность щелочному феррицианиду окисляет НАД·H_2 только до обычной окисленной формы. Ферментативное восстановление кофермента приводит к образованию только одного изомера. Последующее химическое окисление, будучи стереохимически неспецифичным, от одной половины молекул удаляет атомы дейтерия, а от другой половины — атомы водорода. Следовательно, образуется та же

самая смесь, которая получается при использовании первого метода (IX.3), но в этом случае атом дейтерия оказывается связанным с тем атомом углерода, к которому его перенес фермент. И в этом случае результаты совпадают с теми, которые были получены раньше.

Окончательное доказательство того, что в дегидрогеназной реакции происходит восстановление никотинамидного кольца кофермента в положениях 1 и 4, а не в положениях 1 и 2 или 1 и 6, было получено Левусом, Венесландом и Харрисом [1607]. Химическим путем они синтезировали три никотинамида, каждый из которых содержал атом дейтерия, связанный с атомом углерода в положении соответственно 2, 4 или 6. Каждый из трех меченых никотинамидов был введен в молекулу НАД путем ферментативного замещения с использованием НАД(Ф)-нуклеозидазы; таким способом были получены препараты окисленного кофермента, меченного в трех различных положениях. Эти препараты были затем подвергнуты восстановлению гидросульфитом в H_2O, причем каждый дал смесь двух стереоизомеров (IX.2). После окисления каждого из этих трех препаратов НАД·H_2 пировиноградной кислотой в присутствии лактатдегидрогеназы выделили образовавшийся лактат и определили в нем содержание дейтерия. Оказалось, что из положений 2 и 6 дейтерий совсем не переносится, а из положения 4 он переносится в количестве, почти достигающем теоретического. Это убедительно доказывает, что в дегидрогеназных реакциях положения 2 и 6 не затрагиваются и что восстановление происходит исключительно в положениях 1 и 4. Восстановление может быть представлено следующим образом:



Это было подтверждено также с помощью спектроскопии в инфракрасной области и методом ядерно-магнитного резонанса путем сравнения с 2-, 4- и 6-дейтерированными никотинамидами [343, 1200].

НАДФ·H_2 должен иметь такую же структуру восстановленного кольца, как НАД·H_2, так как при отщеплении фосфатной группы щелочной фосфатазой НАДФ·H_2 превращается в НАД·H_2 [1921].

1,4-восстановление кольца характерно не только для ферментативной реакции; приведенные выше данные показывают, что именно такого типа восстановление осуществляется и гидросульфитом. 1,4-восстановление не

является, однако, общим свойством пиридиновых соединений; оно зависит от присутствия CO-группы в боковой цепи.

Свойства и распространение. НАД восстанавливается многими субстратами в присутствии соответствующих дегидрогеназ. НАДФ восстанавливается, по-видимому, относительно меньшим числом ферментов. Ферменты, которые восстанавливают НАД, обычно не восстанавливают НАДФ, и наоборот; однако известны и исключения из этого правила. Оба эти кофермента восстанавливаются также различными химическими восстановителями, из которых наиболее известен гидросульфит. Молекулярным кислородом, красителями (например, метиленовым синим) и цитохромом *c* восстановленные формы этих коферментов с заметной скоростью не окисляются. Они окисляются под действием многих дегидрогеназ, катализирующих обратные реакции при различных анаэробных брожениях, красителями в присутствии ряда флавопротеидов, цитохромами *c* или b_5 в присутствии соответствующих цитохромредуктаз (1.6.2.1—3), цистином, глутатионом или липоамидом в присутствии их редуктаз (1.6.4.1—3), H_2O_2 в присутствии специфических пероксидаз (1.11.1.1 и 2) и хинонами в присутствии ферментов 1.6.5.1—3. Они окисляются также и неферментативно различными соединениями, в первую очередь феназинами, порфиридинами и порфироксидами [2327].

Стабильность окисленных и восстановленных форм при сдвиге pH изменяется в противоположных направлениях. Восстановленная форма крайне неустойчива в кислых растворах, но относительно стабильна в щелочных, тогда как окисленная форма весьма стабильна в кислых растворах, а в щелочных мало устойчива [1623]. В нейтральном растворе восстановленная форма менее стабильна, чем окисленная. При замораживании и оттаивании растворов восстановленной формы образуется производное неустановленного строения, действующее как сильный ингибитор в ферментативных реакциях, в которых участвует НАД·H_2 [537, 717]. Это обстоятельство обесценивает многие проведенные ранее кинетические исследования, и его следует иметь в виду при использовании восстановленных коферментов. При обработке НАД·H_2 большим избытком глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы в присутствии пирофосфата образуется производное неустановленного строения, которое было обозначено как «DPNH-X» [443, 1779]. Это соединение неактивно и имеет, по-видимому, только одну двойную связь в восстановленном никотинамидном кольце. Оно может быть превращено в НАД·H_2 под действием АТФ и фермента из дрожжей.

В нерастворимых частицах, выделенных из мышцы сердца, при осуществлении переноса водорода от сукцината образуется лабильное фосфорилированное производное НАД. Это производное, не идентичное НАДФ, было получено в очищенном виде. Оно спонтанно расщепляется на свободный кофермент и неорганический фосфат, но при добавлении к системе, содержащей наряду с нерастворимыми частицами из мышцы сердца также и Mg^{++}, оно фосфорилирует АДФ до АТФ и при этом образуется НАД·H_2. Возможно, что это производное играет важную роль в окислительном фосфорилировании [2981].

Оба кофермента широко распространены в живой природе. Клок и Мак-Лин [856] исследовали ряд тканей животных, используя специальные энзимологические методы, которые (в отличие от метода восстановления дитионитом) позволяют определить истинные количества не расщепленных на фрагменты молекул кофермента; их данные, полученные в опытах на крысах, приведены в табл. 24.

В большинстве клеток (исключение составляют клетки листьев растений) НАД присутствует в значительно больших количествах, чем НАД·Ф; в то же время отношение количеств восстановленной и окисленной форм значительно выше для НАДФ, чем для НАД. В листьях растений НАД

Таблица 24

СОДЕРЖАНИЕ НАД И НАДФ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ КРЫСЫ

Ткань	НАД		НАДФ	
	общее содержание, *мкг* на 1 *г* ткани	содержание восстановленной формы, %	общее содержание, *мкг* на 1 *г* ткани	содержание восстановленной формы, %
Печень	570	36	210	97
Сердце	480	38	36	95
Надпочечники	470	33	130	87
Почка	440	48	57	95
Диафрагма	430	32	13	100
Молочная железа	310	27	50	100
Головной мозг	220	40	8	100
Селезенка	200	30	12	100
Поджелудочная железа	190	40	12	100
Легкое	100	33	27	67
Тимус	150	23	12	100
Семенники	150	47	6	100
Семенные пузырьки	140	8	12	100
Предстательная железа	100	18	11	100
Плацента	100	11	3	100
Кровь	90	40	8	40

и НАДФ присутствуют почти в равных количествах; концентрация их составляет около 10 *мкг* на 1 *г* сырого веса [69].

Аналоги. Было получено несколько производных НАД и НАДФ. Эти производные исследовали на активность в ряде ферментных систем. Особенно много работали в этой области Каплан и его сотрудники.

Рассматривая модификации молекулы, не затрагивающие никотинамидную группу, следует отметить, что иодметилат никотинамида и никотинамидмононуклеотид совершенно неактивны в качестве коферментов дегидрогеназ; это относится также и к НАД, у которого аденин замещен никотинамидом. Замена аминогруппы аденина на гидроксильную группу (при этом образуется никотинамидгипоксантиндинуклеотид) уменьшает активность. С различными дегидрогеназами активность этого аналога колеблется примерно от нуля до 50% активности нормального кофермента [2122].

Данный аналог активен также в системе НАД(Ф)-трансгидрогеназы. Модификация остатка сахара тоже влияет на биологическую активность; НАД, содержащий в аденилатной части дезоксирибозу, обладает лишь незначительной активностью как кофермент дегидрогеназ [1397]. Таким образом, для сохранения коферментной активности аденилатная половина молекулы не менее важна, чем никотинамидмононуклеотидная.

В случае НАДФ важно положение третьей фосфатной группы. В кислом растворе эта фосфатная группа спонтанно мигрирует из положения 2′ в положение 3′. Образующийся аналог не действует на те дегидрогеназы, которые специфичны в отношении НАДФ, но активирует (в той же степени, что и НАДФ) большинство дегидрогеназ, которые могут использовать оба кофермента [2398].

Обращаясь к модификациям никотинамидной группы, следует отметить, что, если эта группа соединена с рибозой α-связью, а также в случае полного восстановления никотинамидного кольца, динуклеотид оказывается неактивным. С помощью НАД(Ф)-нуклеозидазы (3.2.2.6) можно заменить

никотинамид другими основаниями и получить таким путем ряд неактивных аналогов. При участии того же фермента был получен и ряд аналогов, содержащих никотинамид с модифицированной боковой цепью [66, 68]. Результаты определения активности этих аналогов в опытах с пятью различными дегидрогеназами приведены в табл. 25.

Таблица 25

СКОРОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ АНАЛОГОВ НАД[1])

Боковая цепь в положении 3	Алкоголь-дегидрогеназа печени лошади	Алкоголь-дегидрогеназа из дрожжей	Лактат-дегидрогеназа из мышц кролика	Лактат-дегидрогеназа из сердца быка	Глицеральдегид-фосфат-дегидрогеназа из мышц кролика	Гидросульфит
$-CO-NH_2$	100	100	100	100	100	+
$-H$	0	0	0	0	0	
$-CH_3$	0	0	0	0	0	—
$-NH_2$	0	0	0	0	0	—
$-NH-CO-CH_3$	0	0	0	0	0	—
$-CS-NH_2$	348	16	3	41	16	+
$-CO-NH-OH$	44	3	20	10	19	+
$-CO-NH-NH_2$	68	8	33	9	38	+
$-CO-H$	30	2	20	30	0	+
$-CO-CH_3$	90	10	60	15	55	+
$-CHOH-CH_3$	0	0	0	0	0	—
$-CO-CH(CH_3)_2$	792	52	125	37	0	+
$-CO-C_6H_5$	31	0	0	0	0	+
$-CH=NOH$	50	6	7	1	1	+
$-CH=CH-CO-NH_2$	0	0	0	0	0	+

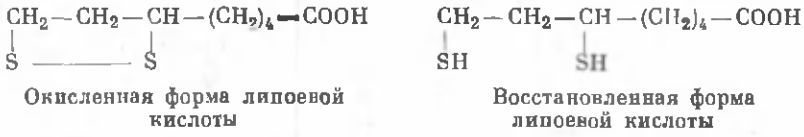
[1]) Скорость восстановления НАД принята за 100%.

Из приведенных в этой таблице данных видно, что для проявления коферментной активности и даже для восстановления гидросульфитом необходимо, чтобы к кольцу была присоединена группа CO или какая-либо другая ненасыщенная группировка. Замещение $-CO-NH_2$ на $-CS-NH_2$ приводит к резкому увеличению активности с одним из ферментов и к значительному уменьшению активности с другими ферментами. Замещение или модификация NH_2-группы обычно не полностью лишает соединение коферментной активности, а приводит лишь к ее снижению, хотя замена на группу $-CH(CH_3)_2$ ведет к значительному увеличению активности с одним из ферментов и полному исчезновению активности с другим. Поскольку специфичность различных дегидрогеназ сильно варьирует, аналоги успешно используются для дифференцировки дегидрогеназ различных видов, а также для дифференцировки изоферментов у одного и того же вида.

НАД образует ряд молекулярных соединений с такими веществами, как альдегиды, кетоны, тиолы, сульфит и цианид; присоединение происходит по положению 4; образующиеся соединения, подобно $НАД \cdot H_2$, имеют полосу поглощения в области 340 *ммк*. Эти соединения могут быть окислены феррицианидом с образованием аналогов НАД, замещенных по положению 4. Как окисленные, так и восстановленные соединения неактивны в энзимологических тестах [371, 2717].

Липоевая кислота

История изучения. Липоевая кислота — этот важный и имеющий широкое распространение переносчик водорода — была открыта в 1941 г. как фактор роста простейшего *Tetrahymena* [603, 604, 1371, 1372] и получила тогда название «фактор II». Стокстед и др. [2539] получили концентрат липоевой кислоты и назвали его вначале протогеном, а позднее протогеном А. Примерно в то же время Гирард и др. [944] обнаружили фактор, наличие которого при отсутствии уксусной кислоты обеспечивало рост тех



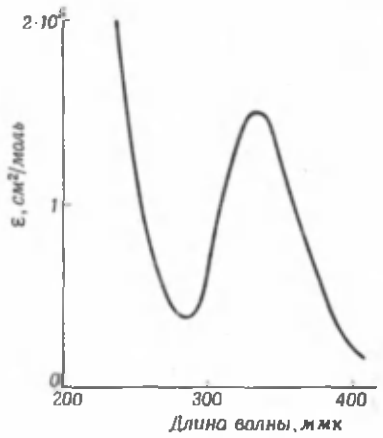
Окисленная форма липоевой кислоты

Восстановленная форма липоевой кислоты

Фиг. 92. Строение двух форм липоевой кислоты.

бактерий, которым эта кислота была необходима, и назвали его фактором, заменяющим ацетат, а О'Кейн и Гунзалус [2019] открыли фактор окисления пирувата у *Streptococcus faecalis.* В дальнейшем было доказано, что оба эти фактора идентичны протогену [2460].

В 1951 г. это вещество было получено в кристаллическом виде Ридом, Де-Бюском, Гунзалусом и Хорнбергером [2196], которые предложили называть его α-липоевой кислотой на том основании, что оно растворялось в органических растворителях; приставка α- в этом названии не имела химического смысла и была введена только для того, чтобы провести различие между данной формой вещества и другой его формой, образующейся в процессе получения. Учитывая некоторые химические свойства вещества (см. ниже), его называли также тиоктовой кислотой. В настоящее время обычно употребляется название «липоевая кислота», причем часто его относят только к окисленной форме. Мы будем использовать это название как для окисленной, так и для восстановленной форм (по аналогии с практикой, сложившейся для глутатиона).



Фиг. 93. Спектр окисленной формы липоевой кислоты [382].

Строение. Строение окисленной и восстановленной форм липоевой кислоты [2195] представлено на фиг. 92.

При переходе окисленной формы липоевой кислоты в восстановленную дисульфидная группа восстанавливается до двух тиоловых групп. В молекуле липоевой кислоты содержится один асимметрический атом углерода, и, следовательно, эта кислота может существовать в виде двух оптических изомеров. Природный изомер окисленной формы вращает плоскость поляризации вправо, но при восстановлении его образуется левовращающая восстановленная форма. В системе оксидазы пировиноградной кислоты активны только природные изомеры.

В клетках большая часть липоевой кислоты присутствует, по-видимому, в связанной с белком форме, присоединяясь с помощью пептидной связи к боковой цепи лизина; она может быть отщеплена с помощью фермента из дрожжей или бактерий [2195].

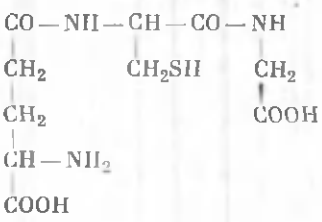
Свойства. Липоевая кислота в окисленной форме представляет собой желтоватое вещество; спектр поглощения его изображен на фиг. 93. Полоса

поглощения при 335 *ммк* обусловлена наличием у окисленной формы пятичленного кольца [382]. При действии сильных восстановителей, например цинка в соляной кислоте (но не боргидрида), это кольцо вследствие восстановления дисульфидной связи разрывается. Липоевая кислота восстанавливается пировиноградной и α-оксоглутаровой кислотами в присутствии соответствующих дегидрогеназ (1.2.4.1 и 2) и тиаминпирофосфата; в этих случаях восстановление осуществляется путем переноса ацильной группы от субстрата вначале на тиамин, а затем к липоевой кислоте с образованием ацетилгидролипоата и сукцинилгидролипоата соответственно (реакция 19 табл. 41 и реакция 7 табл. 42). Гунзалус и др. [948] доказали, что ацетильная группа ацилирует тиоловую группу в положении 6.

Восстановленный липоат после отщепления любой ацильной группы окисляется при помощи НАД в присутствии липодамиддегидрогеназы (1.6.4.3). Его можно окислить также, используя такие мягкие химические окислители, как иод.

Глутатион

Глутатион — широко распространенный в природе серусодержащий пептид — открыт в 1921 г. Гопкинсом [1153]. В восстановленной форме глутатион был впервые выделен в аморфном состоянии; предполагалось, что он представляет собой дипептид цистеина и глутаминовой кислоты. Позже



Фиг. 94. Строение восстановленного глутатиона.

Гопкинс предложил очень изящный метод выделения кристаллического глутатиона из тканевых экстрактов [1154]; почти одновременно с ним глутатион в кристаллическом виде получили Кендалл и др. [1358]. В обеих этих работах было показано, что глутатион представляет собой трипептид цистеина, глутаминовой кислоты и глицина; однако Гопкинсу не удалось установить последовательность аминокислот в этом пептиде, а предположение Кендалла о последовательности аминокислот оказалось неправильным. Окончательно строение глутатиона было установлено после того, как его удалось синтезировать; оказалось, что он представляет собой γ-L-глутамил-L-цистеинилглицин [1006] (фиг. 94).

Функциональной группой молекулы глутатиона является тиоловая группа, поэтому для восстановленного глутатиона принято удобное сокращение GSH.

Свойства. Восстановленный глутатион окисляется до дисульфида мягкими окислителями, например иодом или феррицианидом. Это окисление аналогично окислению цистеина и может быть представлено уравнением

$$2GSH - 2H = 2GSSG. \qquad (IX.5)$$

Глутатион в соответствующих условиях в присутствии следов металлов-катализаторов окисляется также молекулярным кислородом; кроме того, он окисляется цитохромом *c* и может быть окислен также и ферментативным путем — дегидроаскорбиновой кислотой в присутствии глутатиондегидрогеназы (1.8.5.1). Для восстановления окисленной формы глутатиона необхо-

димо действие сильных восстановителей, однако ферментативным путем глутатион может быть восстановлен за счет НАД и НАДФ (особенно за счет последнего) в присутствии глутатионредуктазы (1.6.4.2). Благодаря своей способности подвергаться ферментативному окислению и восстановлению глутатион может служить биологическим переносчиком водорода; кстати, среди известных нам теперь переносчиков водорода первым был открыт именно глутатион.

В тиол-дисульфидных системах в отсутствие ферментов довольно легко устанавливается окислительно-восстановительное равновесие; глутатион и цистеин (CSH) находятся, таким образом, в равновесии согласно следующему уравнению:

$$2GSH + CSSC \rightleftharpoons GSSG + 2CSH. \qquad (IX.6)$$

Одна из подобных реакций катализируется ферментом глутатион-гомоцистин-трансгидрогеназой (1.8.4.1).

Несмотря на то что глутатион открыт очень давно и ему посвящена очень большая литература, роль его еще не вполне ясна. Он может, несомненно, выполнять функцию биологического переносчика водорода, что и было в свое время установлено Гопкинсом. Он может обеспечивать окисление коферментов при участии аскорбиновой кислоты и либо аскорбатоксидазы в растениях, либо цитохромоксидазы в организме животных. Однако до настоящего времени нет данных о физиологическом значении этих путей окисления. Глутатион может, кроме того, выполнять роль специфичного кофермента в глиоксалазной системе (табл. 48) и в системах малеилацетоацетат- и малеилпируват-изомеразы (5.2.1.2 и 5.2.1.а), а также в системе формальдегиддегидрогеназы (1.2.1.1). Участие глутатиона в глиоксалазной системе изучалось очень интенсивно, однако значение этой системы в обмене веществ все еще остается невыясненным. Многие ферменты представляют собой тиоловые соединения, активные только в SH-форме; предполагают, что очень важная функция глутатиона состоит в том, чтобы поддерживать эти ферменты в восстановленной форме.

Аскорбиновая кислота

L-аскорбиновая кислота (витамин С) была вначале получена рядом исследователей в виде частично очищенных концентратов, а затем, в 1928 г., выделена в кристаллическом виде Сцент-Дьерди [2590]. Ее строение было установлено Хейуортом и др. [101] и подтверждено синтезом.

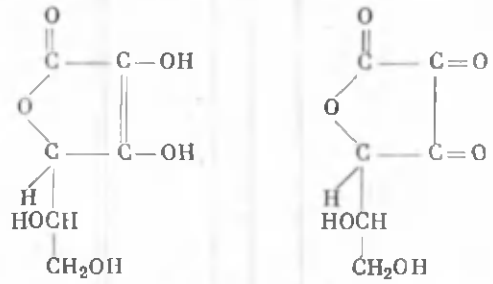
Необходимо отметить, что, хотя это вещество существует как в окисленной, так и в восстановленной форме, название «аскорбиновая кислота» относится только к восстановленной форме; окисленная же форма известна под названием «дегидроаскорбиновая кислота» (фиг. 95).

Свойства. Аскорбиновая кислота — сильный восстановитель, быстро восстанавливающий многие красители и даже нейтральный раствор нитрата серебра (до металлического серебра). Она, естественно, окисляется также обычными окислителями (например, иодом) и кислородом в присутствии следов металлов-катализаторов. В растениях эту реакцию осуществляет специфичная аскорбатоксидаза (1.10.3.3), в состав которой входит медь. В животных тканях этого фермента нет, и там аскорбиновая кислота может окисляться при помощи цитохромной системы.

Обе формы аскорбиновой кислоты представляют собой лактоны. Восстановленная форма обладает свойствами кислоты вследствие ионизации ендиоловой структуры, тогда как окисленная форма нейтральна. Лактоновое кольцо в аскорбиновой кислоте стабильно, а в дегидроаскорбиновой кислоте легко гидролизуется, причем образуется кислота с открытой цепью

$$CH_2OH—CHOH—CHOH—CO—CO—COOH.$$

Лактоновая форма дегидроаскорбиновой кислоты легко восстанавливается в аскорбиновую кислоту под действием H_2S или глутатиона в присутствии глутатиондегидрогеназы (1.8.5.1). Дегидроаскорбиновая кислота с открытой цепью не восстанавливается сероводородом до аскорбиновой кислоты; в растворе эта форма подвергается дальнейшим необратимым изменениям, поэтому окисление аскорбиновой кислоты становится необратимым в том случае, если не происходит быстрого восстановления окисленного продукта. Одно из окисленных производных аскорбиновой кислоты,



Фиг. 95. Строение аскорбиновой кислоты и ее окисленной формы.

которое не является дегидроаскорбиновой кислотой, но весьма быстро в нее превращается, способно окислять НАД·H_2 и НАДФ·H_2 (особенно первый) в присутствии дегидроаскорбатредуктазы (1.6.5.4). Это окисленное производное образуется (по крайней мере в качестве промежуточного продукта) при действии аскорбатоксидазы [1365, 1927]. Отсюда, естественно,



Фиг. 96. Перенос водорода аскорбиновой кислотой.
Ко — НАД или НАДФ; А — аскорбиновая кислота; Фл — флавопротеидный фермент; Гл — глутатион; c_1, c и a_3 — цитохромы; цифры в скобках — шифры ферментов, катализирующих соответствующие реакции.

напрашивается вывод о том, что аскорбиновая кислота может служить биологическим переносчиком водорода; однако значение ее в этом отношении все еще не вполне ясно. Схемы реакций, в которых аскорбиновая кислота служит переносчиком водорода, представлены на фиг. 96.

Аскорбиновая кислота необходима в качестве витамина только для приматов и морских свинок; однако ее широкое распространение в тканях других организмов свидетельствует о том, что она, вероятно, играет важную роль в обмене у всех животных.

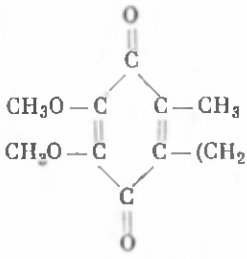
Являясь хорошим восстановителем, аскорбиновая кислота, подобно глутатиону, может стабилизировать активность SH-ферментов. Это было подтверждено в ряде опытов in vitro.

Хиноны

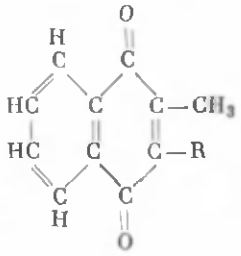
Хиноны широко распространены в живой природе. Работы последнего времени показывают, что некоторые из них играют важную роль как промежуточные переносчики водорода в дыхательной системе. Это относится

в первую очередь к метилированным хинонам с полиизопреноидными боковыми цепями. Такого рода соединения подразделяются на две категории: убихиноны и витамины К. Структура их приведена на фиг. 97.

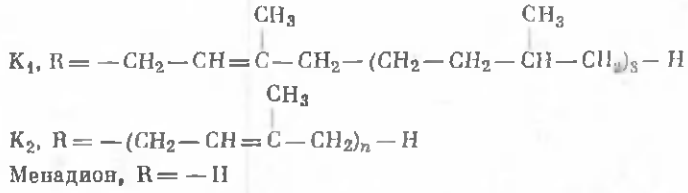
Убихиноны и витамины K_2 — это близкородственные соединения, отличающиеся только значением n (фиг. 97). У убихинонов, встречающихся в тканях животных и высших растений, $n = 10$, тогда как у низших организмов обнаружены гомологи, у которых n может принимать значения от 6 до 9. У витаминов K_2 n может иметь значения 6, 7 или 9.



Убихинон ($УХ_n$)



Витамины К



K_1, $R = -CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-(CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2)_3-H$

K_2, $R = -(CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2)_n-H$

Менадион, $R = -H$

Фиг. 97. Строение убихинонов и витаминов К.

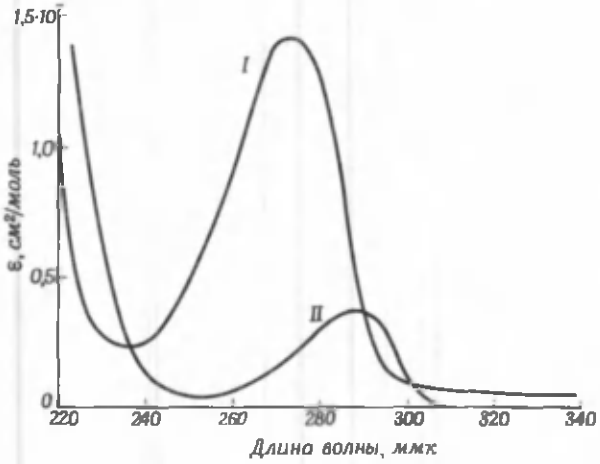
История открытия убихинона. Убихинон был открыт Р. Мортоном и его группой в 1953 г., а также Крейном, Хатефи, Лестером и Уидмером в 1957 г. Основные данные относительно его строения были получены Мортоном и его сотрудниками, а полная структура была описана в 1958 г. одновременно группой Мортона и группой Грина. История открытия и работы по изучению структуры убихинона подробно изложены в статьях Мортона и др. [1872] и Уолстенхолма и др. [2903]. Большая часть работ, посвященных выяснению роли убихинона в ферментативных процессах, была выполнена в Институте по исследованию ферментов в Висконсине.

Убихинон известен под различными названиями: «вещество 272 *ммк*», «SA», «Q_{275}», «убихинон», «митохинон», «кофермент Q», «убиферон Q». Мы будем пользоваться названием «убихинон» в соответствии с рекомендациями Комиссии по ферментам Международного биохимического союза. Следует, однако, отметить, что и название «кофермент Q» пока еще применяется достаточно широко.

Свойства убихинона. Подобно другим хинонам, *убихинон образует* при восстановлении гидрохиноннную форму, и именно с этим связана его

основная физиологическая функция. Он содержится в митохондриях в количестве 2—3 *мг* на 1 *г* белка и входит как необходимый компонент в митохондриальную дыхательную цепь. Как и некоторые другие компоненты этой системы, убихинон нерастворим в воде, и реакции, в которых он принимает участие, протекают in vivo в неводной фазе.

Убихинон экстрагируется из препарата митохондрий ацетоном, содержащим 4% воды; после этого митохондриальные частицы теряют способность окислять сукцинат молекулярным кислородом при помощи цитохрома *c*. Способность к окислению может быть полностью восстановлена при добавлении убихинона, но не других хинонов (неэффективен в этом смысле и витамин К) [1553]. Было сделано заключение, что убихинон является связующим звеном между сукцинатом и цитохромом *c*. В пользу



Фиг. 98. Спектры окисленной (*I*) и восстановленной (*II*) форм убихинона [2903].

Кривые получены для убихинона с $n = 10$ в этаноле.

этого заключения говорят и спектроскопические данные. Спектры окисленной и восстановленной форм приведены на фиг. 98. Из этих спектров видно, что за процессом окисления и восстановления можно следить, определяя поглощение при 275 *ммк*. Чанс и Редфирн [425] показали, что в препаратах митохондрий восстановление эндогенного убихинона идет примерно с той же скоростью, что и окисление сукцината.

После экстракции ацетоном, содержащим 10% воды, сукцинатоксидазная активность митохондриальных частиц не восстанавливается при добавлении одного убихинона; для восстановления активности, кроме убихинона, необходимо добавить смесь экстрагируемых ацетоном липидов. Эту смесь липидов можно заменить некоторыми индивидуальными фосфолипидами, например фосфатидилинозитом; однако эффективность чистых фосфолипидов ниже, чем эффективность смеси [1553].

В настоящее время трудно сказать, как велико число соединений, окисление которых зависит от убихинона. После обработки митохондриальных частиц ацетоном в них нарушается процесс окисления НАД·H_2. При последующем добавлении убихинона нарушение не восстанавливается. Это, вероятно, обусловлено тем, что под действием ацетона инактивируется катализирующий данное окисление фермент. Известно, что из митохондрий можно получить препарат фермента (1.6.5.3), который катализирует восстановление убихинона восстановленными коферментами [1026]. Этот ферментный препарат, подобно другим митохондриальным препаратам, содер-

жит много негеминового железа, которое может играть существенную роль в реакции.

Восстановленная форма убихинона (убихинол) может быть окислена другим ферментным препаратом из митохондрий при участии цитохромной системы [1025]. Окисление зависит от присутствия цитохрома *c* и цитохромоксидазы; оно тормозится актиномицином А (в отличие от процесса восстановления убихинона, который вопреки прежним утверждениям актиномицином не тормозится) [2126] и сопряжено с фосфорилированием. Действие актиномицина отличается от действия амитала, который тормозит восстановление убихинона за счет НАД·H_2, но не за счет сукцината.

Витамин К. Имеются известные сомнения относительно того, содержится ли в митохондриях витамин К. Предположение о том, что он функционирует как переносчик в дыхательной цепи, еще не получило убедительных доказательств [2903]. В то же время известно, что витамин К и менадион (в особенности этот последний) могут подвергаться восстановлению и окислению в суспензии митохондрий. *Обнаружена очень активная менадионредуктаза* (1.6.5.2), осуществляющая восстановление менадиона (но не витаминов K_1 и K_2 или убихинона) за счет НАД·H_2 или НАДФ·H_2 [1722]. *Действие этого фермента тормозится* незначительными концентрациями дикумарина, не оказывающими влияния ни на поглощения O_2, ни на фосфорилирование в митохондриях. Если, следовательно, менадионредуктаза участвует в дыхательной цепи, то очевидно, что должен существовать и другой путь, который функционирует при добавлении дикумарина.

Имеются существенные данные в пользу того, что витамин К участвует в процессе переноса водорода при фотосинтетическом фосфорилировании в хлоропластах.

Цитохромы

Название «цитохром» предложено в 1925 г. Кейлином [1331] для группы внутриклеточных гемопротеидов, которые в восстановленной форме обнаруживают хорошо выраженное характерное поглощение в видимой части спектра. *В настоящее время к цитохромам относят все внутриклеточные* гемопротеиды, за исключением гемоглобина, миоглобина, пероксидазы и каталазы. В эту группу входят вещества, несущие различные биологические функции. Роль некоторых цитохромов неясна, но, по-видимому, все они функционируют путем последовательного окисления и восстановления. Из тех цитохромов, роль которых установлена, одни являются ферментами, а другие просто переносчиками в процессах окисления и восстановления.

Спектр поглощения типичной системы цитохромов (компоненты *a*, *b* и *c*) с четырьмя полосами в видимой области наблюдал Мак-Мунн [1669] еще в 1886 г. при изучении ряда животных тканей; однако значение этих наблюдений было оценено только в 1925 г., когда Кейлин подтвердил их, а также, продолжив исследования, выделил компонент *c* и установил, что цитохромная система (цитохром + цитохромоксидаза) играет очень важную роль в процессах клеточного дыхания. Начиная с 1925 г. Кейлин провел ряд классических работ [1331—1333, 1338, 1340—1342], в которых он изучил природу и механизм действия этой системы.

Помимо открытых вначале трех цитохромов, Кейлин и другие исследователи обнаружили и ряд других, так что к настоящему времени известно уже свыше двадцати представителей этой группы. Перечень известных цитохромов с указанием некоторых свойств этих соединений приведен в табл. 26.

Номенклатура отдельных цитохромов в последнее время сильно усложнилась вследствие того, что из различных источников были выделены цитохромы со сходными свойствами. Цитохромы распадаются на четыре группы, отличающиеся природой простетической гем-группы. Комиссия по фер-

Таблица 26

ЦИТОХРОМЫ

Цитохром	Распространение	Полосы поглощения: восстановленная форма α	β	γ	Полосы поглощения: окисленная форма γ	Молекулярный вес	Число гемов на 1 моль	E_0' при pH 7, в	Функция	Источник данных
a	Широкое	603	Нет	450	407			+0,29	Компонент цитохромоксидазы	[933, 1341, 1547, 2020, 2452, 2949]
a_1	Бактерии, дрожжи	590	»	445					?	[1335, 2451]
a_3	Широкое	603	»	445					Компонент цитохромоксидазы	[933, 1341, 1547, 2020, 2452, 2949]
b	Широкое	563	532	429	418	28 000	1	+0,08	Переносчик при окислении сукцината (?)	[858, 1143, 1341]
b_1	Бактерии	560		430					?	[1335, 2451, 2732]
b_2	Дрожжи	557	528	424	413	170 000	2		Лактатдегидрогеназа (1.1.2.3)	[82, 119, 1880, 1881]
b_3	Растения	559	529	425				+0,04	?	[513, 1099, 1736]

b_5	Ткани животных	556	526	423	413
b_6	Хлоропласты растений	563			
b_7	Початок (*Arum*)	560	529		
B (559, *Streptomyces*)		559	530	428	408
c	Широкое	550	521	415	407
c_1	Широкое	554	524	418	410
c_2	Фотосинтезирующие бактерии	552	522	418	410
c_3	*Desulphovibrio*	552	522	418	409
c_4	*Azotobacter* и др.	551	522	414	409

14 000	1	+0,02	Переносчик в процессе дыхания	[424, 427, 2186, 2553, 2556, 2728]
		−0,06	Переносчик в процессе фотосинтеза (?)	[1096, 1097, 1098]
		−0,03	Переносчик в дыхании, нечувствительном к цианиду	[202, 204]
			?	[249]
13 000	1	+0,254	Переносчик в процессе дыхания	[679, 708, 1062, 1333, 1338, 1716, 2058, 2238, 2630]
37 000	1	+0,220	То же	[284, 707, 2732, 2924, 2986]
15 600		+0,33	Переносчик в процессе фотосинтеза	[1168, 1860]
11 300	2	−0,205	Переносчик при восстановлении сульфата	[1168, 2110, 2111]
		+0,30	Переносчик в процессе дыхания у бактерий	[450, 1298, 1954, 2658, 2659]

Продолжение табл. 26

Цитохром	Распространение	Полосы поглощения: восстановленная форма α	β	γ	окисленная форма γ	Молекулярный вес	Число гемов на 1 моль	E_0' при pH 7, в	Функция	Источник данных
c_5	*Azotobacter*	555	524	418	414			+0,32	То же	[1954, 2658, 2659]
C (551,	*Pseudomonas*)	551	521	416	409	7 600	1	+0,286	Переносчик в процессе дыхания	[1166]
C (552,	*Chromatium*)	552	523	416	410	97 000	3	+0,01	Переносчик в процессе фотосинтеза у бактерий	[176]
C (552,	*Euglena*)	552	523	417	412			+0,36	Переносчик в процессе фотосинтеза (?)	[543. 1973]
C (553,	*Chlorobium*)	553	522	417	408	~50 000	1	+0,16	?	[830]
C (554,	*Chlorobium*)	554	523	417	412	~12 000	1	+0,14	?	[830]
C (554, галотолерантные бактерии) (известен также как цитохром b_4)		554	521	415					?	[675]

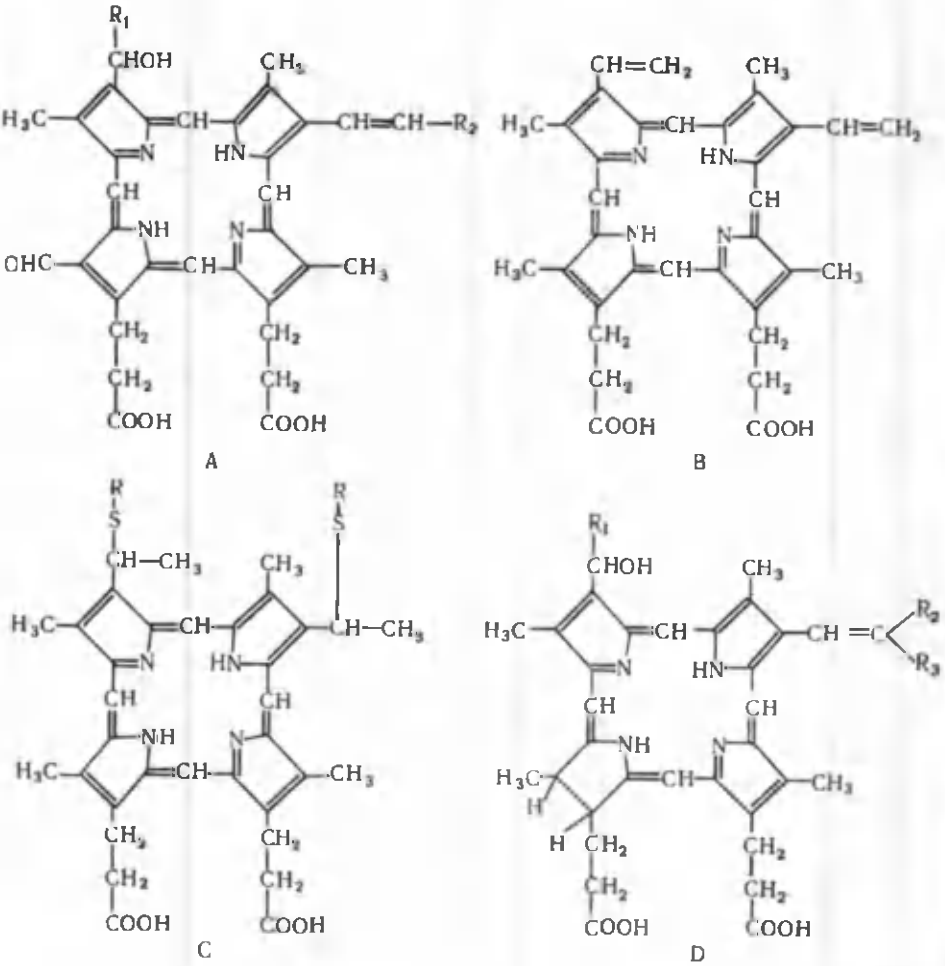
C (555, хлоропласты растений) (известен также как цитохром *f*)	555	525	423	413
C (556, гепатопанкерас (*Helix pomatia*) (известен также как цитохром *h*)	556	527	422	408
CD (625, 554, 549, *Pseudomonas aeruginosa*) (известен также как цитохром GB или a_2)	625 554 549	521	418	408
Цитохромоиды				
C (*Rhodospirillum rubrum*) (известен также как RHP)	568 550	Нет	424	390
C (*Chromatium*) (известен также как RHP)	565 547	»	426	400

110 000	2	+0,365	Переносчик в процессе фотосинтеза (?)	[426, 542, 543, 1098, 1099, 1633]
18 500	1		?	[1350]
90 000	2		Оксидаза цитохромов (c_4+c_5) (1.9.3.a)	[172, 423, 1167, 1335, 1547, 2451, 2656, 2934]
28 000	2	−0,008	Оксидаза	[175, 1168]
36 000	2	−0,005	Переносчик в процессе фотосинтеза (?)	[176]

ментам рекомендовала положить это в основу наименования цитохромов. Группы обозначаются буквами A, B, C и D:

A — цитохромы с гем-группой, содержащей формилпорфирин;
B — цитохромы с протогем-группой;
C — цитохромы с замещенной мезогем-группой, образующей ковалентную связь с белком;
D — цитохромы с гем-группой, содержащей дигидропорфирин.

Различные критерии для отнесения цитохромов к соответствующей группе приведены в гл. 5 Отчета Комиссии по ферментам [2212].



Фиг. 99. Порфирины цитохромов A, B, C и D.

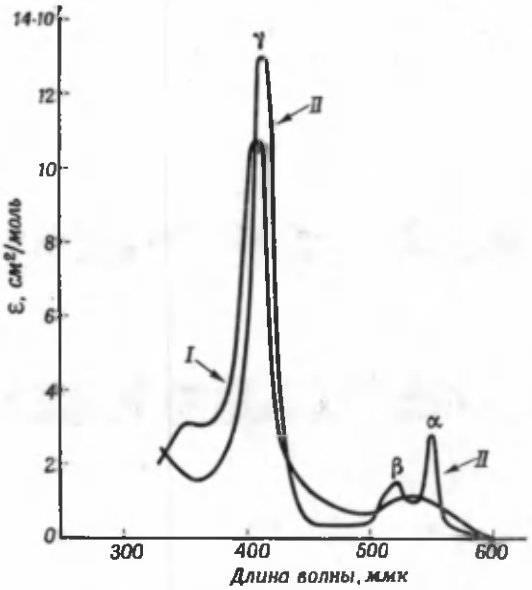
Цитохромы, индивидуальность которых установлена, обозначают курсивной строчной буквой латинского алфавита, указывающей на принадлежность к определенной группе, и подстрочным числовым индексом. Эти обозначения приняты по международному соглашению и список их приведен в Приложении C к Отчету комиссии [1]. Недавно открытые цитохромы, еще не получившие окончательного названия, получают временное обозначение; при этом используют прописную букву латинского алфавита (в соответ-

[1] См. русский перевод Отчета комиссии, Приложение B.

ствии с групповой принадлежностью), указывают длину волны α-полосы в спектре поглощения и источник получения. Эту систему обозначений, возможно, придется изменить после того, как число известных цитохромов возрастет.

На фиг. 99 показаны вероятные структуры порфиринов четырех простетических групп цитохромов A, B, C и D.

Гемы *b* и *c* содержат протопорфирин; порфирин гема *a* имеет в качестве боковых цепей формильную, этиленовую и две алкильные группы (одна



Фиг. 100. Спектры окисленной (*I*) и восстановленной (*II*) форм цитохрома *c* [1715].

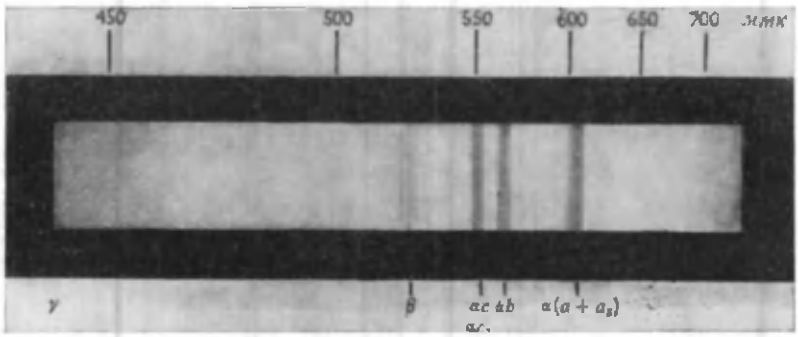
из них может иметь длинную цепь) [459, 1547]; гем *d* содержит не формилпорфирин, а хлорин (дигидропорфирин) [172]. У цитохромов типа *c* простетическую группу можно рассматривать как протогем, связанный с белком необычным образом — путем присоединения двух тиоловых групп белка по двойным связям винильных групп протопорфирина [2630]. При этом образуется прочная тиоэфирная связь, так что при разделении гема и белка фрагмент белка остается связанным с гемом, вследствие чего получается замещенный мезопорфирин, представленный фиг. 99, C.

Характер простетической группы оказывает значительное влияние на положение α-полос поглощения в спектре полностью восстановленных цитохромов; α-полосы цитохромов *a*, *b* и *c* располагаются соответственно в области 590 *ммк* и дальше (в сторону более длинных волн), в области 554—563 *ммк* и в области 550—557 *ммк*. Деление цитохромов на группы на основании данных о спектрах их поглощения следует считать только ориентировочным; в частности, с большой осторожностью следует подходить к вопросу об отнесении цитохромов в группу *b* или *c*, так как спектры представителей обеих групп несколько перекрывают друг друга.

Свойства. Спектры цитохрома *c* (фиг. 100) можно считать типичными спектрами окисленных и восстановленных форм цитохромов. В результате окисления, которое представляет собой одноэквивалентную реакцию превращения закисного железа в окисное, в спектре исчезают резкие α- и β-полосы; γ-полоса не исчезает, но сдвигается в сторону ультрафиолетовой области. Однако у восстановленных цитохромов *a* (и у полученных из них ферро-

гемохромов) β-полоса поглощения выражена очень слабо, а иногда и совсем отсутствует. Эту особенность цитохрома *a* установили не сразу, так как, не выделяя его предварительно, получили спектр, образующийся в результате наложения спектров цитохромов *a*, *b* и *c* тканевых препаратов.

Такой смешанный спектр (фиг. 101) типичен, как показано Кейлином (1331, 1334, фиг. 5), для цитохромной системы большого числа различных аэробных клеток. Действительно, в состав цитохромной системы таких клеток входят обычно цитохромы *a*, *b* и *c*, большинство же других цитохромов представляет собой особые формы, имеющие довольно ограниченное распространение. Обычная аэробная система содержит также цитохромы a_3, c_1 и часто b_5, но выявлению их полос поглощения мешают другие полосы, и поэтому наблюдать их спектры в обычных условиях не удается.



Фиг. 101. Типичный цитохромный спектр аэробных клеток.

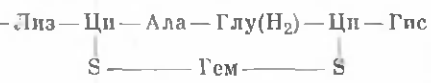
Цитохромы *b*, как правило, окисляются непосредственно молекулярным кислородом; другие же цитохромы обычно не обладают способностью к аутоокислению. Однако способность к такому окислению не может служить надежным показателем принадлежности цитохрома к данной группе, так как, с одной стороны, цитохромы a_3, c_3, C (552, *Chromatium*) и CD способны к аутоокислению и цитохром *c* приобретает способность к аутоокислению при значениях pH ниже 4 и выше 12, а, с другой стороны, аутоокисление некоторых цитохромов *b* происходит очень медленно.

При изучении цитохромной системы главная трудность, которая обусловливает большую часть неясностей, запутывающих исследование, состоит в том, что многие цитохромы трудно получить в виде истинных растворов; большинство цитохромов можно выделить только с помощью жестких приемов. Исключение в этом отношении составляет легкорастворимый цитохром *c*; этот цитохром был выделен и очищен первым [1333, 1338, 2630, 2046, 1716]. Цитохром *c* пингвина получил в виде кристаллов Бодо [279]. В кристаллическом виде был получен цитохром *c* из многих тканей животных, из дрожжей и из зерен пшеницы [280, 971, 973, 974, 975, 976]. Были также выделены и очищены цитохромы *a*, *b*, b_2, b_3, b_5, c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, C (551, *Pseudomonas*), C (552, *Chromatium*), C (553, *Chlorobium*), C (554, *Chlorobium*), C (555, хлоропласты растений), C (556, гепатопанкреас *Helix pomatia*) и CD (625, 554, 549, *Pseudomonas aeruginosa*).

Очищенный цитохром *c* из сердечной мышцы изучен довольно подробно. Спектр поглощения его восстановленной формы не меняется при изменениях pH в пределах всей шкалы; это указывает, что связи между атомом железа и четырьмя атомами азота в порфирине остаются ковалентными. В то же время окисленная форма цитохрома *c* имеет пять спектров различного типа, характер которых зависит от pH; величины p*K*, установленные на основа-

нии точек перехода, равны 0,4; 2,5; 9,3 и 12,8 [2631]; кислая и щелочная формы цитохрома частично ионизированы. Измерения E_0' дают еще одно значение pK для окисленной формы, равное 6,8 [2058] или 7,7 [2238].

Полную последовательность аминокислот в цитохроме *c* из сердца лошади определили Марголиаш и др. [1718]. N-концевое положение занимает ацетилглицин. У некоторых аминокислот обнаружена выраженная тенденция располагаться однородными группами; так, имеется ряд участков, которые состоят преимущественно из остатков основных аминокислот, и другие участки, в которых локализуются преимущественно остатки гидрофобных аминокислот. Остатки кислых аминокислот также обнаруживают тенденцию располагаться вместе. Гем-группа присоединена к участку, отстоящему от N-конца на расстояние, равное примерно $^1/_7$ общей длины цепи. Последовательность аминокислот на участке присоединения гем-группы имеет следующий вид:



Эта последовательность соответствует R-группам, показанным на фиг. 99, С. У разных видов она несколько различается (см. стр. 565).

Последовательность аминокислот в молекуле цитохрома С (551, *Pseudomonas*) была определена Амблером [58]. Гем в этой молекуле присоединен аналогично тому, как это показано выше, и на таком же относительном расстоянии от N-конца, с тем, однако, различием, что группировка — Ала — Глу(NH_2) — между двумя остатками цистеина заменена на —Вал — Ала —.

Некоторые из наиболее важных цитохромов, принимающих участие в дыхании клетки, локализуются во внутриклеточных частицах. Так, например, в животных тканях цитохромы a_3, b и c_1 и большая часть цитохрома *c* (или даже весь он) сосредоточены в митохондриях. Ранее полагали, что цитохром b_5 локализуется только в микросомах. Однако недавно он был обнаружен вместе с соответствующей редуктазой в митохондриях печени [2186]. Эти цитохромы (за исключением некоторых цитохромов группы *c*) не извлекаются водой, но их растворимость можно повысить путем добавления поверхностноактивных веществ, например холата. Холат и дезоксихолат широко использовались для фракционирования трудно разделимых систем, часто в сочетании с фракционированием солями. Этим путем оказалось возможным разделить все цитохромы, однако не удалось установить, образуют ли при этом цитохромы истинные растворы, так как при удалении солюбилизирующего агента они выпадали в осадок. Не удалось также отделить цитохром a_3 от цитохрома a, поэтому некоторые исследователи склонны считать их одним соединением.

Очищенные компоненты цитохромной системы не реагируют друг с другом при смешивании, если одновременно не добавлены фосфолипиды. Субмитохондриальные частицы, в которых осуществляется перенос водорода, содержат значительные количества фосфолипидов, и по крайней мере некоторые этапы этого процесса протекают в липидной фазе. Было показано, что водорастворимый цитохром *c* при взаимодействии с липидом образует растворимый в липидах и нерастворимый в воде комплекс. Этот комплекс получил название «липидный цитохром *c*» [2859]. Действие фосфолипидов на цитохромоксидазу изучено еще недостаточно; Вартон и Гриффитс [2848] считают, что активация этого фермента фосфолипидами обусловлена предохранением солюбилизированной оксидазы от агрегации.

Восстановленный цитохром *c* в нейтральном растворе не окисляется молекулярным кислородом, но окисляется перекисью водорода, феррицианидом и солями меди. У некоторых микроорганизмов реакция с H_2O_2 очень

энергично катализируется цитохром-*c*-пероксидазой (1.11.1.5). Восстановленный цитохром *c* очень легко окисляется кислородом в присутствии цитохромоксидазы; эта реакция является завершающей стадией окисления. Окисленный цитохром *c* восстанавливается такими химическими восстановителями, как гидросульфит, цистеин, полифенолы и аскорбиновая кислота. Он восстанавливается также цитохромами b_5 и c_1 и некоторыми ферментами, в том числе цитохром-*c*-редуктазами (1.6.2.1 и 3), дрожжевой лактатдегидрогеназой (цитохром b_2) (1.1.2.3) и (непрямым путем) сукцинатдегидрогеназой и другими дегидрогеназами. Ферментативное окисление и восстановление цитохрома *c* в тканях идет очень быстро; поэтому он является чрезвычайно активным переносчиком в процессе окисления соответствующих субстратов молекулярным кислородом.

Нетрудно заметить, что по механизму действия цитохром *c* очень похож на коферменты и что фактически по отношению к приведенным выше системам он играет роль истинного кофактора. Цитохром *c*, подобно другим цитохромам, представляет собой белок (хотя и с низким молекулярным весом), и от природы этого белка зависит специфичность его реакций. Таким образом, дело обстоит здесь точно так же, как обычно с ферментами. Тем не менее мы не относим цитохром *c* к ферментам, так как сам по себе он не имеет каталитических свойств и действие его может проявиться только в присутствии ферментов.

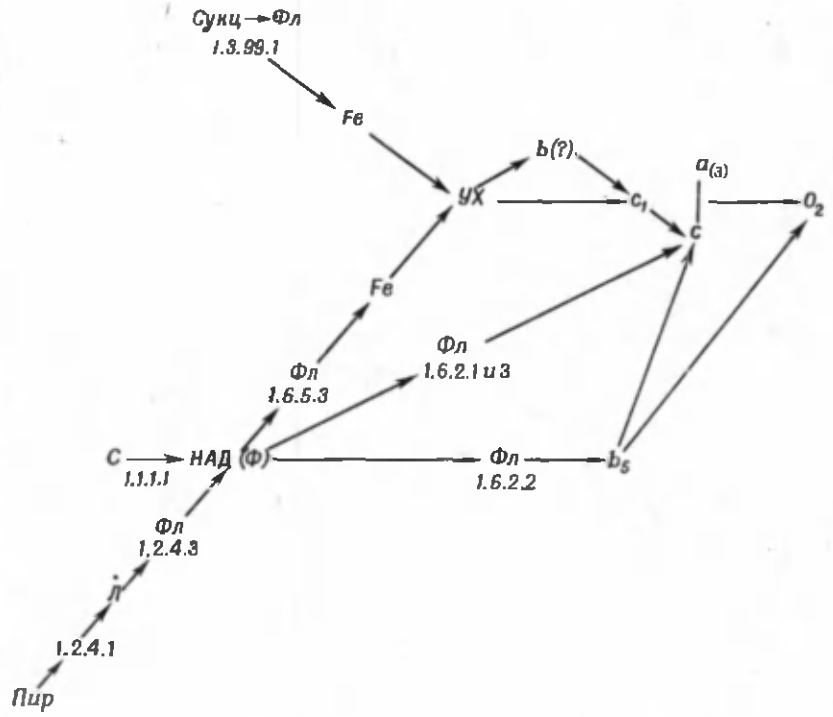
Состав некоторых систем, восстанавливающих цитохром *c*, весьма сложен; помимо дегидрогеназы, они содержат еще ряд промежуточных переносчиков. Этот вопрос был рассмотрен в обзоре Слейтера [2427]. Восстановление сукцинатом, по-видимому, осуществляется при участии убихинона, цитохрома *b* и цитохрома c_1. Восстановление цитохрома *c* восстановленными коферментами катализируется in vitro цитохромредуктазами, которые представляют собой флавопротеиды. Этот процесс не требует участия дополнительных переносчиков (механизм реакции восстановления обсуждался в гл. VII). В то же время в тканевых препаратах окисление НАД·H_2, как и окисление сукцината, тормозится уретаном, димеркаптопропанолом (БАЛ) в присутствии кислорода и антимицином А, т. е. агентами, которые не тормозят действия цитохромредуктаз. Три перечисленных выше агента тормозят определенное звено, а именно восстановление цитохрома *c* убихинином или цитохромом *b*.

Наиболее важные взаимоотношения между цитохромными компонентами внутриклеточной окислительной системы приведены на фиг. 102. Стрелки на этой схеме указывают путь переноса водорода от субстрата до O_2. Все приведенные на схеме компоненты имеются в митохондриях; следует, однако, отметить, что цитохром b_5 и соответствующая редуктаза находятся главным образом в микросомах, а значительная часть НАД вместе с соответствующими дегидрогеназами находится в растворимой части цитоплазмы.

Данные, подтверждающие указанную на схеме последовательность взаимодействия цитохромов, могут быть суммированы кратко следующим образом. Компонентом, который непосредственно реагирует с O_2, является, несомненно, цитохром a_3, так как он а) эффективно соединяется с окисью углерода, конкурирующей с O_2; б) эффективно взаимодействует с цианидом, в результате чего тормозится окисление всех остальных компонентов; в) может быть отделен от других цитохромов и в этом случае функционирует как цитохромоксидаза при добавлении цитохрома *c*.

Ближе к субстрату, чем остальные компоненты, должен находиться цитохром *b*. При добавлении антимицина А, тормозящего окисление сукцината кислородом, цитохром *b* оказывается восстановленным, а все остальные цитохромы — окисленными; это указывает, что по отношению к месту действия данного ингибитора цитохром *b* находится на субстратной сто-

роне, а остальные цитохромы — на стороне O_2. Цитохром c_1 окисляется системой цитохром $a_{(3)} + O_2$ только при добавлении цитохрома c; это говорит о том, что по отношению к цитохрому c он расположен на субстратной стороне; в пользу этого же свидетельствует и тот факт, что цитохром c_1 восстанавливается сукцинатом в отсутствие цитохрома c. Функция цитохрома b выяснена в настоящее время еще не в полной мере.



Фиг. 102. Взаимосвязь цитохромов.

Сукц — сукцинат; Фл — флавопротеидный фермент; Fe — железо во флавопротеиде; УХ — убихинон; С — различные субстраты дегидрогеназ; Пир — пируват; Л — липоат (связанный); $a_{(3)}$, b, b_5, c, c_1 — цитохромы; цифры под символами — шифры ферментов, катализирующих соответствующие реакции.

Приведенная на фиг. 102 последовательность взаимодействия компонентов дыхательной цепи подтверждается выделением ферментных препаратов, катализирующих отдельные этапы окислительного процесса. При обработке поверхностноактивными веществами, например холатом, из митохондриальной системы было получено четыре ферментных препарата, катализирующих следующие реакции: а) НАД·H_2 → УХ; б) Сукц → УХ; в) УХ·H_2 → c; г) c → O_2 [1026]. При смешивании этих препаратов удается рекомбинировать полную систему окисления.

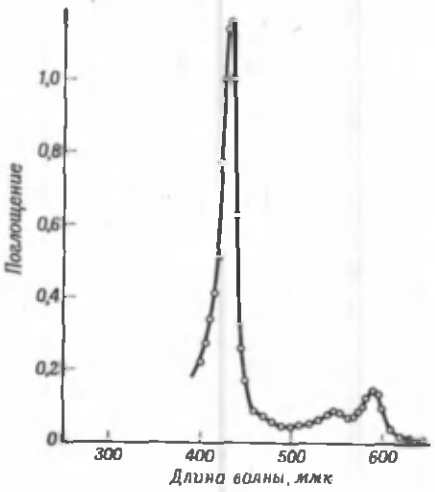
Цитохромоксидаза

Восстановленный цитохром c в нейтральном растворе с кислородом не реагирует; однако почти все ткани содержат цитохромоксидазу, катализирующую его окисление кислородом. Механизм действия этого фермента, все еще несколько неясный, разбирался нами в конце гл. VII. Кейлин показал, что только в присутствии цитохрома c цитохромоксидаза окисляет такие вещества, как цистеин, аскорбиновая кислота или n-фенилендиамин.

Можно думать, однако, что этот фермент функционирует не просто как переносчик между восстановленным цитохромом c и O_2, так как вос-

становленная форма цитохрома $a_{(3)}$ не окисляется кислородом, если одновременно не добавлен цитохром *c*; в присутствии же последнего окисление протекает очень быстро [2366]; это говорит о том, что активная оксидаза является комплексом цитохромов *c* и *a*.

Фермент очень чувствителен к цианиду, азиду, H_2S и окиси углерода, т. е. к хорошо известным ингибиторам реакций, катализируемых металлами. Перечисленные ингибиторы, и в частности окись углерода, использовались при установлении идентичности этого фермента цитохрому a_3 животных тканей [1341] и пекарских дрожжей [414], а также цитохрому CD или цитохромоиду C (известному ранее, как цитохром *o*) различных бактерий [414, 2656]. Как известно, окись углерода связывается с такими гемопротеидами, как гемоглобин, но не соединяется с большинством цитохромов.



Фиг. 103. Фотохимический спектр дыхательной системы пекарских дрожжей в присутствии окиси углерода [414]. Поглощение выражено в относительных величинах (поглощение при 436 ммк принято за 1).

Варбург [2782] установил, что окись углерода обратимо тормозит поглощение кислорода пекарскими дрожжами и некоторыми бактериями. На свету, как известно, продукты присоединения окиси углерода к гемопротеидам диссоциируют на свободную окись углерода и гемопротеид, а Варбург показал, что на свету дыхание подавляется окисью углерода слабее, чем в темноте; это указывает, что процесс дыхания зависит от какого-то гемопротеида, обладающего каталитической активностью. Эффективность монохроматического света (снимающего тормозящее действие окиси углерода на процесс поглощения кислорода) зависит от длины его волны; при графическом изображении этой зависимости получена кривая, изображенная на фиг. 103, по форме очень похожая на спектр поглощения цитохрома [1475, 2791]. Поскольку количество освобождающейся окиси углерода зависит от количества поглощенного света, есть основания предполагать, что этот *фотохимический спектр* представляет собой спектр поглощения неактивного продукта присоединения окиси углерода к активному веществу; впрочем, можно было бы привести доводы и в пользу того, что этот спектр представляет собой не спектр соединения, которое диссоциирует под действием света, а спектр вещества, участвующего в процессе как фотохимический сенсибилизатор.

Кейлин и Хартри [1341] установили, что при насыщении окисью углерода восстановленного препарата цитохромов сердечной мышцы полосы поглощения, характерные для спектра цитохромов *a*, несколько изменяются: около α-полосы при 603 *ммк* появляется еще одна полоса при 590 *ммк*, а γ-полоса в значительной мере заменяется новой полосой в области около 430 *ммк*.

Было предложено два объяснения наблюдаемых изменений. Кейлин и Хартри высказали предположение, что изменения спектра являются результатом наложения спектров двух компонентов — *a* и a_3, из которых только a_3 взаимодействует с окисью углерода. Следовательно, полосы поглощения при 590 и 430 *ммк*, появляющиеся в присутствии CO, относятся к спектру соединения a_3 — CO. Далее, эти авторы допускали, что α-полоса компонента *a* интенсивнее, чем соответствующая полоса компонента a_3.

тогда как γ-полоса компонента a_3 интенсивнее соответствующей полосы компонента *a*. Кейлин и Хартри считали, что соединение, которое они назвали «цитохромом a_3», в действительности идентично цитохромоксидазе, поскольку оно, подобно оксидазе, соединяется с CO, и что полосы поглощения продукта, образующегося при присоединении CO, соответствуют тем, которые наблюдаются в фотохимическом спектре, показанном на фиг. 103.

Согласно другому объяснению, которого придерживается ряд авторов, имеется только одно соединение, а именно цитохром *a*, которое соединяется с CO и образует комплекс, имеющий спектр поглощения, описанный Кейлином и Хартри, с асимметрическими полосами. Это соединение и функционирует как оксидаза. В пользу этого говорит то обстоятельство, что до сих пор так и не удалось достичь хотя бы частичного разделения компонентов *a* и a_3, между тем как все другие цитохромы сердечной мышцы можно отделить один от другого. Кроме того, высокоочищенные препараты цитохромоксидазы при взаимодействии с CO характеризуются сходными изменениями спектра, а имеющиеся данные свидетельствуют о наличии только одного типа гем-группы — гема *a*, содержащего один атом меди.

Джонетани [2948] получил ряд кинетических данных, которые, как он полагал, говорили в пользу существования компонентов *a* и a_3. Исследуя окисление аскорбата молекулярным кислородом в присутствии цитохрома *c*, он использовал высокоочищенный (но не кристаллический) препарат цитохромоксидазы из мышцы сердца и регистрировал изменение поглощения одновременно при 445 и 605 *ммк*. В стационарном состоянии степень восстановления оксидазы по данным определений поглощения при двух длинах волн оказывалась различной; подобная картина, по мнению автора, не могла быть объяснена при допущении существования только одного компонента. Полученные результаты можно было объяснить, приняв, что полоса поглощения при 605 *ммк* обусловлена в основном компонентом *a*, а полоса при 445 *ммк* — компонентом a_3, как предполагали Кейлин и Хартри. Можно предложить, однако, и другие объяснения; например, подобная картина могла бы наблюдаться в присутствии медленно восстанавливающегося каталитически неактивного производного цитохромоксидазы, которое, следовательно, не должно оказывать влияния на концентрацию активной оксидазы в стационарном состоянии. Кроме того, следует отметить, что даже кристаллические препараты Джонетани имели активность в 5 раз более низкую, чем препараты Гриффитса и Вартона [933].

Дополнительные данные в пользу представлений Джонетани были получены Гибсоном и Гринвудом [833]; они исследовали при различных концентрациях O_2 ту же систему, которую изучал Джонетани, но применили методику прослеживания быстротекущих реакций. В условиях низких концентраций O_2 скорость окисления восстановленного препарата оксидазы оказывалась выше, если ее определяли по изменению поглощения при 605, а не при 445 *ммк*. При более высоких концентрациях O_2 процесс окисления оказывался двуфазным: вслед за стадией быстрого окисления, характеристика которого зависела от концентрации O_2, следовала медленная стадия, не зависящая от концентрации O_2. Эти результаты можно объяснить, если считать, что при низких концентрациях O_2 лимитирующей скорость стадией является окисление компонента a_3, тогда как при высоких концентрациях O_2 скорость процесса вначале лимитируется окислением компонента a_3, а затем восстановлением компонента a_3 за счет компонента *a*.

Работы, изложенные в двух последних разделах, не разъясняют характера различий между компонентами *a* и a_3. Гем-группы этих компонентов, по-видимому, одинаковы; по всей вероятности, одинаковы и белки. Это позволило Лембергу высказать предположение о том, что различие между компонентами *a* и a_3 связано с характером присоединения гем-группы к белку. Лемберг и др. [1548], используя детергенты, получили данные о том,

что в компоненте a_3 с гем-группой связана молекула липида, в результате чего создаются препятствия для образования координационных связей между железом гема и азотсодержащими группами белка; поэтому железо оказывается доступным для атаки со стороны кислорода. Цитохром *a*, подобно цитохрому *c*, не способен к аутоокислению, видимо потому, что железо в нем защищено в результате образования координационных связей с группами белка. Если предположение Лемберга правильно, то различие между компонентами *a* и a_3 может быть значительно менее существенным, чем это полагали до настоящего времени многие исследователи.

Вследствие неясности вопроса о раздельном существовании компонентов *a* и a_3 функциональный цитохром цитохромоксидазы обозначен на фиг. 102 и в этой главе через $a_{(3)}$.

Несмотря на то что представления об участии цитохромоксидазы в дыхании аэробных клеток получили широкое признание, исследователю в этой области приходится встречаться с рядом трудностей. Фотохимические спектры были получены только для очень ограниченного ряда клеток, по преимуществу для клеток, содержащих большие количества цитохромов, например пекарских дрожжей, клеток сердечной мышцы и некоторых бактерий. Между тем известно, что многие другие клетки и ткани содержат очень мало цитохрома *c*; кроме того, дыхание большинства животных тканей нечувствительно к окиси углерода, а дыхание многих клеток нечувствительно даже к цианиду.

В таких клетках должны, по-видимому, функционировать другие дыхательные системы (табл. 46). В связи с этим представляет интерес то обстоятельство, что животные ткани с низким содержанием цитохромоксидазы характеризуются относительно высоким содержанием пероксидазы [1949].

У некоторых бактерий положение α-полосы в фотохимическом спектре отличается от обычного. Это служит указанием на то, что у них в качестве цитохромоксидазы функционирует, по всей вероятности, цитохром a_1 или CD, а не цитохром a_3. У двух видов бактерий наблюдаемый фотохимический спектр имеет α- и β-полосы равной интенсивности; его приписывают «цитохрому *o*» — еще одной гемопротеид-оксидазе, способной соединяться с окисью углерода [414, 415].

Исследование специфичности действия также говорит о том, что цитохромоксидазы ряда бактерий отличаются от цитохромоксидаз животных тканей; например, оксидазы *Pseudomonas* и *Azotobacter* окисляют цитохром *c* с незначительной скоростью, но эффективно окисляют цитохром c_4, присутствующий в этих микроорганизмах; и, наоборот, оксидаза из тканей животных не окисляет цитохром c_4 [1526, 2659].

Другие переносчики водорода

Любое вещество, способное восстанавливаться одним ферментом и окисляться другим, можно рассматривать как переносчик водорода. Такими переносчиками могут быть обычные метаболиты. Пример такого рода приведен в табл. 46, из которой ясно, что система глиоксилат — гликолат может функционировать как переносчик водорода точно таким же путем, как НАД.

Другим важным переносчиком водорода является флавиновая группа, но это не свободный переносчик, а простетическая группа флавиновых ферментов, и потому мы рассмотрим ее несколько позже (см. стр. 356).

ПЕРЕНОСЧИКИ АМИНОГРУПП

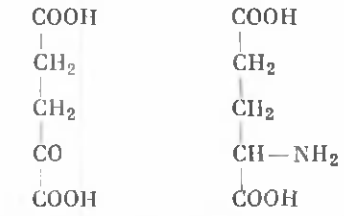
Подобно тому как имеется много дегидрогеназ, реагирующих с общим переносчиком и таким путем осуществляющих распределение водорода, существует также и ряд трансаминаз, реагирующих с общей кетокислотой

(2-оксоглутарат), которая таким образом может действовать как переносчик аминогрупп (ср. стр. 472). Здесь мы имеем пример метаболита, действующего как кофермент.

2-оксоглутарат

Аминированная форма 2-оксоглутарата представляет собой L-глутамат. *Строение обеих этих форм приведено на фиг. 104.*

Из Списка ферментов видно, что подавляющее большинство известных трансаминаз реагирует с этой парой соединений (осуществляющей функцию переноса) и с ее помощью связывается друг с другом.



Фиг. 104. Система переносчиков аминогрупп.

Небольшое число трансаминаз катализирует реакции, не зависящие от глутамата [2268]. *Не имеется данных о том, что какая-либо другая* аминокислота может действовать как общий переносчик в реакциях переаминирования.

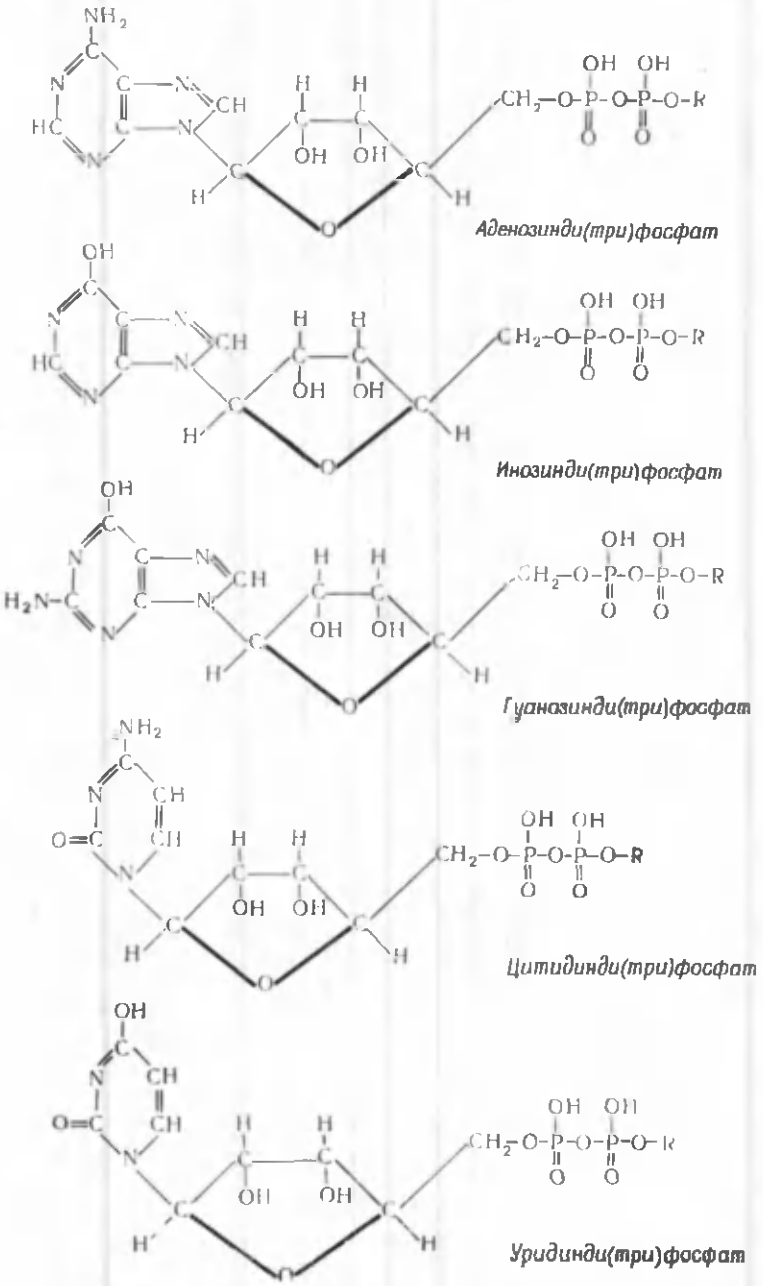
Действие подавляющего большинства ферментов, участвующих в реакциях переаминирования, связано с пиридоксальфосфатом. Пиридоксальфосфат функционирует как простетическая группа трансаминаз, а также некоторых других ферментов, действующих на аминокислоты. Мы рассмотрим это соединение подробнее на стр. 361.

ПЕРЕНОСЧИКИ ФОСФАТА

Среди различных реакций переноса наибольшее значение имеют, по-видимому, реакции переноса водорода и фосфата. Реакции переноса водорода служат источником энергии в живых системах, а реакции переноса фосфата обеспечивают передачу энергии от одного процесса к другому. Биологическими переносчиками фосфата служат нуклеозиддифосфаты, действующие как кофакторы в процессах трансфосфорилирования; реакции переноса с участием нуклеозиддифосфатов катализируются киназами подгрупп 2.7.1—4.

Нуклеозид-5′-дифосфаты

Главным биологическим переносчиком фосфата служит аденозиндифосфат (АДФ), который может присоединять третью фосфатную группу и таким образом превращаться в аденозинтрифосфат (АТФ). Не вполне ясно, в какой мере могут действовать как переносчики фосфата другие нуклеозиддифосфаты. Из Списка ферментов видно, что практически все киназы реагируют с АДФ; однако лишь очень немногие из этих киназ были испытаны с другими нуклеозиддифосфатами. Показано, что восемь киназ реагируют помимо АДФ еще с некоторыми другими нуклеозиддифосфатами (структура которых представлена на фиг. 105). *В то же время из киназ*, проверенных на способность использовать в качестве донора фосфата ИТФ, только шесть оказались способными вступать в реакцию с ИТФ, так что,



Фиг. 105. Строение дифосфатов и трифосфатов нуклеозидов.
R означает —H для дифосфатов и $-H_2PO_3$ для трифосфатов.

по крайней мере по отношению к этому нуклеозидтрифосфату, у киназ, несомненно, имеется известная специфичность. В этой области еще много неясного, но изучение ее связано с большими трудностями, ибо препараты нуклеозидтрифосфатов редко бывают достаточно чистыми, а в некоторых препаратах киназ содержатся примеси нуклеозиддифосфаткиназы.

Следует отметить, что у этих переносчиков фосфатные группы присоединены в положении 5 рибозного остатка, а не в положениях 2 или 3, как у обычных нуклеотидов, получаемых из нуклеиновых кислот.

Все рассматриваемые трифосфаты содержат три последовательно соединенные фосфатные группы и, следовательно, имеют две пирофосфатные связи. В реакциях переноса фосфата обычно участвует только концевая фосфатная группа.

Хотя все исследователи сходятся в том, что главным переносчиком фосфата является АДФ, другие нуклеозиддифосфаты также, вероятно, могут функционировать в качестве биологических переносчиков фосфатных групп. Об этом свидетельствует способность некоторых киназ реагировать с другими нуклеозиддифосфатами (помимо АДФ), а также тот факт, что одна из киназ не реагирует с АДФ. Однако относительное значение этих дополнительных переносчиков пока еще трудно оценить из-за недостатка сведений о специфичности соответствующих ферментов и о содержании различных нуклеозиддифосфатов в живых клетках. Благодаря действию нуклеозиддифосфаткиназы (2.7.4.6) различные переносчики фосфата, вероятно, могут образовывать in vivo взаимосвязанные системы по следующему типу:

$$X-Ф+ГДФ=X+ГТФ, \qquad (IX.7)$$

$$ГТФ+АДФ=ГДФ+АТФ, \qquad (IX.8)$$

$$АТФ+У=АДФ+У-Ф. \qquad (IX.9)$$

В данном случае и ГДФ и АДФ действуют как переносчики фосфата, реакция (IX.8) катализируется нуклеозиддифосфаткиназой, а реакции (IX.7) и (IX.9) — другими киназами.

Важно отметить, что переносчики фосфата могут связывать не только действие двух киназ, но также и действие киназ и синтетаз, например так, как это показано ниже:

$$X-Ф+АДФ=X+АТФ, \qquad (IX.10)$$

$$У+Z+АТФ=У-Z+АДФ+Ф, \qquad (IX.11)$$

или в реакциях, обратных реакциям (IX.11) и (IX.10)

Действие фосфокиназы и синтетазы может быть связано также при помощи двух нуклеозиддифосфатов и нуклеозиддифосфаткиназы (см., например, реакции 13 и 14 табл. 42).

АТФ выполняет большое число биологических функций, поставляя энергию для мышечного сокращения, для биолюминесценции, для процессов всасывания и секреции, для генерирования высокого напряжения в электрических органах животных и, вероятно, для других процессов. АТФ действует также как донор аденозина в связи с процессом трансметилирования (реакции 1 и 2 табл. 50) и как донор аденилата при образовании динуклеотидов нуклеотидилтрансферазами (реакция 4 табл. 56 и реакция 5 табл. 57). ГТФ, ЦТФ и УТФ также действуют как доноры нуклеотидов в других нуклеотидилтрансферазных реакциях, которые связаны с реакциями, описанными в следующем разделе.

Комбинированный перенос фосфата и гликозильных групп

Некоторые нуклеозид-5′-дифосфаты, в частности УДФ, ЦДФ и ГДФ, выполняют специальные функции в необычного типа переносе гликозильных групп, в котором каталитический цикл завершается переносом фосфата.

При обычном переносе фосфата, а именно при переносе фосфатной группы от B к C с помощью переносчика A, процесс можно изобразить следующим образом:

$$A + B\Phi = A\Phi + B, \quad (IX.12)$$

$$A\Phi + C = A + C\Phi. \quad (IX.13)$$

Если предположить, что с помощью того же самого переносчика A, но действующего теперь уже как переносчик гликозильной группы, может осуществляться подобный простой перенос гликозильной группы G от C к D, то можно написать

$$A + CG = AG + C, \quad (IX.14)$$

$$AG + D = A + DG. \quad (IX.15)$$

В действительности, однако, в живых системах перенос гликозильной группы не протекает тем простым путем, который представлен реакциями (IX.14) и (IX.15). В изученных системах переносы гликозильной группы и фосфата взаимосвязаны путем комбинирования обеих простых реакций переноса (IX.13) и (IX.14) в одну реакцию двойного обмена (IX.17), так что весь процесс может быть представлен в следующем виде:

$$A + B\Phi = A\Phi + B, \quad (IX.16)$$

$$A\Phi + CG = AG + C\Phi, \quad (IX.17)$$

$$AG + D = A + DG. \quad (IX.18)$$

Например, в системе биосинтеза сахарозы УДФ действует как переносчик и фосфата и глюкозы; следовательно,

$$\text{УДФ} + \text{АТФ} = \text{УТФ} + \text{АДФ}, \quad (IX.19)$$

$$\text{УТФ} + \text{Глюкозо-1-фосфат} = \text{УДФ-глюкоза} + \text{Пирофосфат}, \quad (IX.20)$$

$$\text{УДФ-глюкоза} + \text{Фруктоза} = \text{УДФ} + \text{Сахароза}. \quad (IX.21)$$

В данном случае переносчик A — это УДФ, B — АДФ, C (так же как и Ф) — фосфат (так что в рассматриваемой системе СФ — пирофосфат), D — фруктоза, G — глюкоза; процесс катализируется нуклеозиддифосфаткиназой (2.7.4.6), УДФГ-пирофосфорилазой (2.7.7.9) и сахарозо-УДФ — глюкозилтрансферазой (2.4.1.13) (табл. 59). Аналогичное участие принимает УДФ в синтезе ряда других гликозидов (например, в синтезе сахарозофосфата, трегалозофосфата, крахмала, гликогена, целлюлозы и хитина).

Существуют системы, в которых осуществляется комбинированный перенос фосфата и некоторых других групп. Именно так обстоит дело при синтезе фосфатидов; ЦДФ действует здесь как переносчик в реакциях, катализируемых ферментами подгруппы 2.7.8.

В системе взаимопревращения галактозы и глюкозы УДФ действует как кофактор посредством механизма другого рода (табл. 49). В этом случае инвертирующий фермент действует на гексозы, только если они присоединены к УДФ; следовательно, УДФ функционирует как «манипулятор», который присоединяется к молекуле сахара, прежде чем осуществится инверсия, и удаляется (путем переноса на другую молекулу) после завершения инверсии.

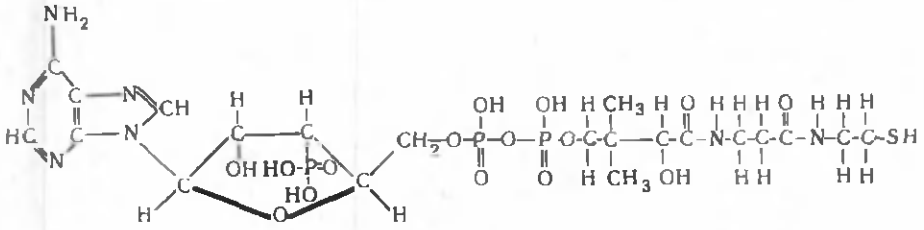
ПЕРЕНОСЧИКИ АЦИЛЬНЫХ ГРУПП

В настоящее время изучение промежуточного обмена жиров и углеводов привлекло внимание к важности процесса переноса ацильных групп, особенно с участием переносчиков, содержащих тиоловые группы, с кото-

рыми ацильные группы образуют тиоловые эфиры. Эти богатые энергией соединения наряду с богатыми энергией фосфатными соединениями выполняют *важную функцию переноса энергии в биологических системах.*

Кофермент А

Этот важный кофермент был впервые открыт как кофермент ацетилирования в печени и у микроорганизмов Липманом в 1947 г. Строение его выяснено главным образом в результате работ школы Липмана, а синтез был осуществлен частично химическим и частично ферментативным путем [128]. Ферментативный путь биосинтеза кофермента А выяснен полностью (табл. 57). Строение кофермента показано на фиг. 106. Он представляет собой 3′-фосфо-АДФ-пантоил-β-аланилцистеамин; следовательно,



Фиг. 106. Строение кофермента А.

он в известной мере сходен с адениндинуклеотидом, у которого второй нуклеозид заменен пантетеином (т. е. пантотенилцистеамином). Подобно НАДФ, он содержит третью фосфатную группу у рибозного остатка адениловой кислоты, но в данном случае фосфатная группа находится не в положении 2, а в положении 3. Как и у НАД и НАДФ, а также у флавинадениндинуклеотида (который мы рассмотрим позднее), функциональная группа (в данном случае SH-группа) *расположена в наиболее удаленной от аденина* части молекулы. (Обзор работ по коферменту А см. у Дженике и Линена [1230].)

«Двууглеродный фрагмент», или «активный ацетил», участвующий в углеводном обмене, в результате работ Липмана, Очоа и их сотрудников был идентифицирован как ацетил-КоА. Это вещество было выделено Линеном и Рейхертом [1640] и оказалось тиоловым эфиром, т. е. S-ацетил-КоА. Позже было установлено, что не только ацетил-КоА, но и вообще соединения типа ацил-КоА играют очень важную роль в процессах обмена. Об этом свидетельствует то обстоятельство, что на ацил-КоА-соединения действует свыше 60 ферментов.

Свойства. Кофермент А — бесцветное вещество, имеющее в ультрафиолетовой области полосу поглощения при 257 *ммк*, обусловленную остатком аденина.

Ацильные группы могут присоединяться к тиоловой группе кофермента А либо в результате переноса от другой молекулы, либо в результате *синтетазной реакции. Ферменты подгруппы 6.2.1 катализируют образование* тиоловых эфиров кофермента А из свободных кислот, используя энергию АТФ или (в одном случае) ГТФ. Ацилтрансферазы подгруппы 2.3.1 *катализируют* перенос ацильных групп на кофермент А или от него. Перенос может осуществляться от соединений, у которых ацильная группа связана с атомом S (ферменты 2.3.1.10—12), атомом N (ферменты 2.3.1.1 — 5, 13 и 14), атомом O (ферменты 2.3.1.6, 7 и 15 и 2.3.1.c), атомом C (ферменты 2.3.1.9 и 16) или с фосфатом (ферменты 2.3.1.8 и 2.3.1.b). Из 19 известных реакций ацильного переноса в 13 случаях переносится ацетильная группа.

Ацетил-КоА участвует также в реакциях другого типа, катализируемых ферментами группы лиаз (ферменты 4.1.3.2,4 и 5 и 4.1.3.a). В этих реакциях ацетильная группа присоединяется по двойной связи акцепторной молекулы либо с одновременным гидролизом тиоэфирной связи, либо без него. В результате трех синтетазных реакций образуются важные метаболиты: цитрат, малат и оксиметилглутарил-КоА.

Многие из ферментов, катализирующих реакции переноса ацильных групп, могут функционировать также с простыми аналогами кофермента А, например с N-ацетилцистеамином. Другие, однако, строго специфичны по отношению к коферменту А. В тех случаях, когда могут быть использованы относительно легко синтезируемые модельные переносчики, они оказываются весьма полезными для выяснения метаболических взаимоотношений ферментов данной группы.

Кофермент А необходим для работы цикла лимонной кислоты, для осуществления реакций окислительного распада жирных кислот и для различных биосинтетических процессов (см. таблицы в гл. XII).

ПЕРЕНОСЧИКИ ОДНОУГЛЕРОДНЫХ ГРУПП

В процессах синтеза и распада ряда аминокислот и пуринов происходит перенос одноуглеродных фрагментов в форме оксиметильной, формильной, формиминной и метильной групп. Перенос осуществляется тетрагидрофолатом (ТГФ) или его производными; метильная группа переносится также аденозилгомоцистеином и витамином B_{12}. Биотин, играющий роль простетической группы, которая функционирует как переносчик CO_2, мы рассмотрим позднее.

Тетрагидрофолат

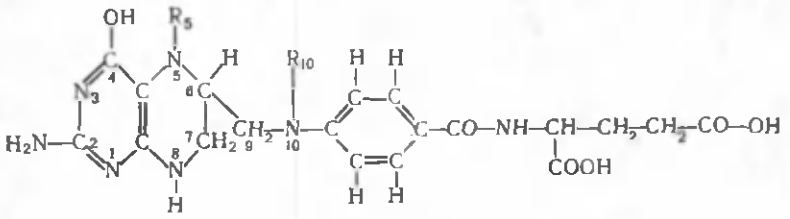
Хотя уже довольно давно было известно, что какое-то производное фолевой кислоты играет важную роль в реакциях переноса одноуглеродных групп, однако природу этого производного долго не удавалось выяснить, да и сейчас еще окончательно установлена только природа реагирующей группы. Из работ Блекли [259] вытекает, что активным переносчиком является не сама фолевая кислота; птеридиновое ядро переносчика должно быть восстановлено до тетрагидроформы (фиг. 107). Это восстановление происходит ферментативным путем в неочищенных ферментных препаратах; поэтому в опытах, где используются такие препараты, фолат оказывается активным. Однако, например, с очищенными препаратами ферментной системы из животных тканей, которая превращает глицин в серин, активностью, как выяснилось, обладают только ди- или тетрагидрофолат. С аналогичной ферментной системой из бактерий активным оказывается уже не сам тетрагидрофолат, а только его полиглутаминовое производное, которое было названо «коферментом С» [2920]. Опубликован обзор данных об участии тетрагидрофолата в метаболических реакциях [1185].

Свойства. Тетрагидрофолат представляет собой бесцветное вещество; однако и сам он и его производные имеют характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области (фиг. 108). Тетрагидрофолат легко самоокисляется и в присутствии молекулярного кислорода быстро превращается в дигидрофолат. Он окисляется также ферментативным путем при участии НАДФ. Фолат восстанавливается до ди- и тетрагидрофолата в присутствии дегидрогеназы из печени (1.5.1.3) и НАДФ·H_2; бактериальный фермент (1.5.1.4) специфически катализирует восстановление дигидрофолата до тетрагидрофолата [263, 2957].

ТГФ функционирует как переносчик метильных, оксиметильных, формильных и формиминных групп. В результате присоединения к переносчику

оксиметильных и формильных групп могут образоваться 5-, 10- и 5,10-производные (фиг. 107).

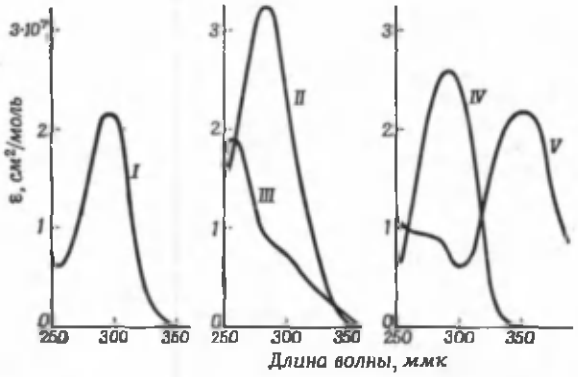
Отдельные ферменты, по-видимому, специфичны каждый по отношению к определенному производному, однако вследствие легкого ферментативного и неферментативного взаимопревращения различных производных нередко весьма трудно решить вопрос, какое из производных участвует



	R_5	R_{10}
Тетрагидрофолат (ТГФ)	—H	—H
5-формил-ТГФ	—CO—H	—H
10-формил-ТГФ	—H	—CO—H
5-метенил-ТГФ (ангидролейковория)	$>N^{+}=CH-N<$ (5, 10)	
5,10-метилен-ТГФ	$>N-CH_2-N<$ (5, 10)	
5-оксиметил-ТГФ	$-CH_2OH$	—H
5-формимино-ТГФ	—CH=NH	—H

Фиг. 107. Строение производных тетрагидрофолата.

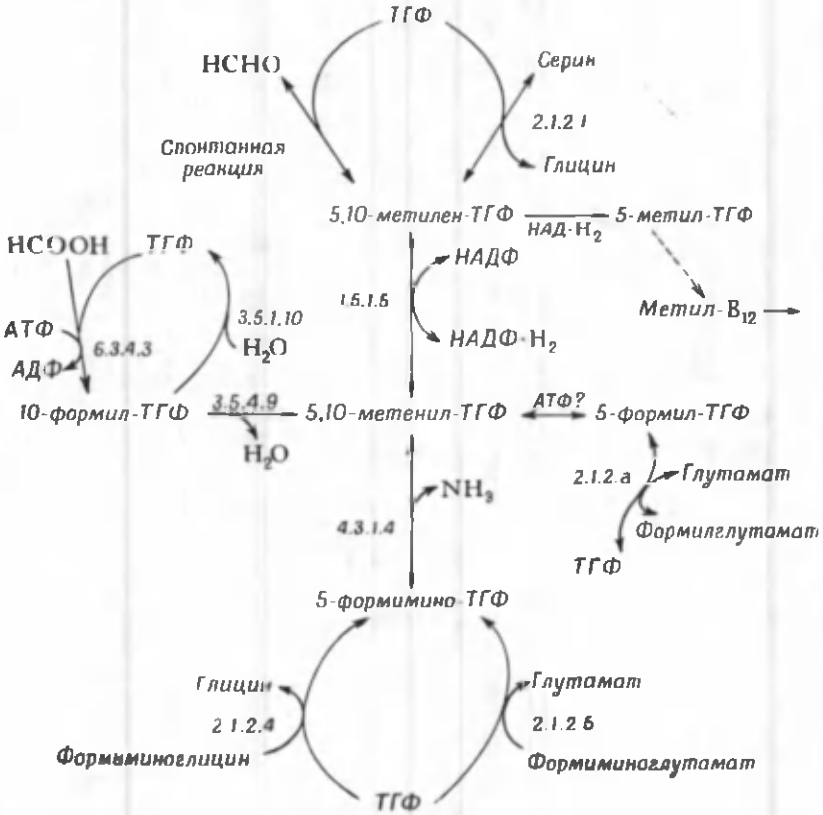
в реакции с исследуемым ферментом. Этому, в частности, мешает широкое распространение циклогидролазы 3.5.4.9. Получение более очищенных препаратов ферментов будет в значительной мере способствовать преодолению отмеченных трудностей [1017].



Фиг. 108. Спектры тетрагидрофолата и некоторых его производных [1185].
I — ТГФ; *II* — 5-формил-ТГФ; *III* — 10-формил-ТГФ; *IV* — 5,10-метилен-ТГФ; *V* — 5,10-метенил-ТГФ [1185].

На фиг. 109 приведены некоторые из наиболее важных метаболических реакций, в которых участвует ТГФ. На схеме указаны шифры, под которыми ферменты приведены в Списке ферментов. В ходе метаболизма могут использоваться свободные одноуглеродные соединения; формальдегид реагирует с ТГФ неферментативным путем, но для взаимодействия формиата с ТГФ необходимы АТФ и соответствующая синтетаза. В результате фер-

ментативного переноса оксиметильной группы на ТГФ образуется производное с метиленовым мостиком, однако не исключено, что в качестве промежуточного продукта образуется 5-оксиметил-ТГФ [261]; при ферментативном переносе формиминогруппы образуется 5-формимино-ТГФ, тогда как при ферментативном переносе формильной группы может образоваться либо 5-формил-, либо 10-формил-ТГФ, либо производное с метениловым мостиком. Формилтрансфераза (2.1.2.a) катализирует образование 5-формил-ТГФ; при действии двух других формилтрансфераз (2.1.2.2 и 3)



Фиг. 109. Некоторые метаболические реакции, осуществляющиеся при участии ТГФ и его производных.

(они не показаны на фиг. 109), участвующих в синтезе пуринов, образуется производное с метениловым мостиком и 10-формил-ТГФ соответственно.

НАД·H_2 в присутствии дегидрогеназы может восстановить производное с метиленовым мостиком в метилпроизводное, идентифицируемое (с большой вероятностью) как 5-метил-ТГФ [2991]. Еще не полностью охарактеризованная ферментная система может затем катализировать перенос метильной группы на витамин B_{12}, который также функционирует как переносчик метильных групп [942] (см. ниже).

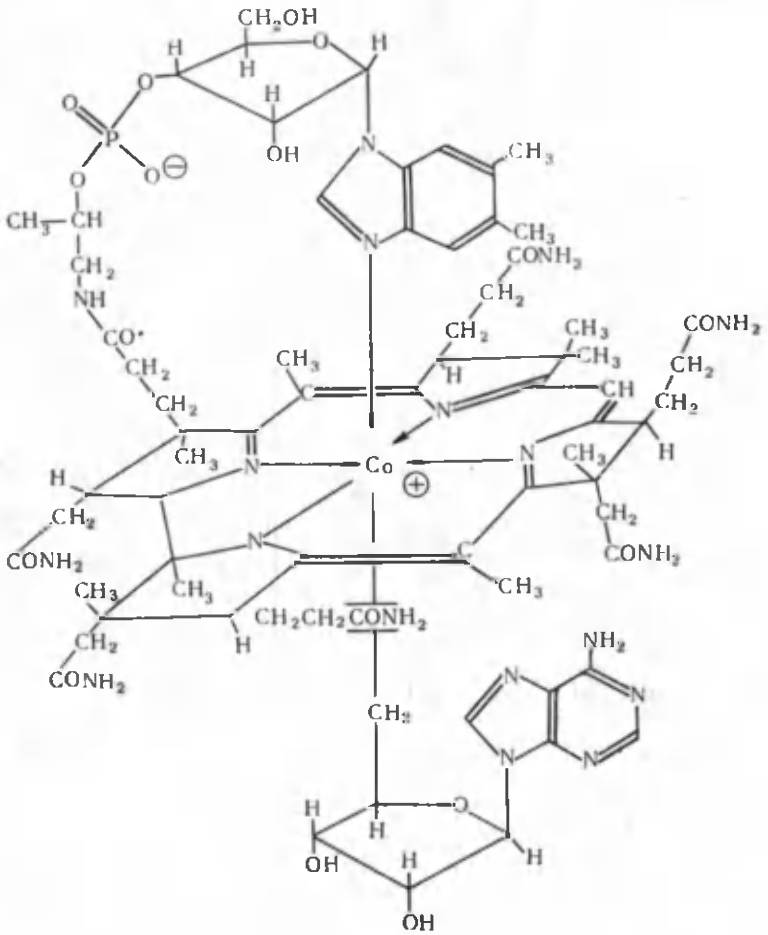
Тетрагидрофолат отличается от других переносчиков в том отношении, что переносимая им группа, будучи присоединена к переносчику, может претерпеть изменение; в таком случае группа, перенесенная на акцептор, оказывается не идентичной той, которая была вначале присоединена переносчиком. К переносчику, например, может присоединиться формильная группа, а на акцептор после превращения будет перенесена оксиметильная группа.

Аденозилгомоцистеин

Кантони [394] показал, что при переносе метильной группы метионина на другие вещества (трансметилировании) необходим АТФ и что в каждом случае в процессе участвуют два фермента. Первый фермент, метионин-аденозилтрансфераза (2.4.2.13), образует S-аденозилметионин, освобождая одну молекулу пирофосфата и одну молекулу фосфата (реакция 1 табл. 50). Во второй стадии группа CH_3^+ переносится от образовавшегося сульфониевого соединения (при этом остается аденозилгомоцистеин) на другие соединения, например на никотинамид или гуанидинацетат. Этот перенос катализируется специфическими метилтрансферазами (2.1.1), из которых к настоящему времени охарактеризовано восемь. Так как переносы, катализируемые метилтрансферазами, обратимы, то аденозилгомоцистеин выступает как переносчик метильных групп, связывающий пары метилтрансфераз.

Кобамидные коферменты

Эти коферменты, относящиеся к группе витамина B_{12}, содержат атом кобальта в центральном кольце — сложной кольцевой структуре, напоминающей порфирин, но вместе с тем и существенно отличающейся от него.



Фиг. 110. Строение кофермента B_{12} [163, 1549].

Вопросы химии и терминологии витамина B_{12} и его производных подробно освещены в монографии Смита [2440]. В молекуле витамина B_{12} (цианкоб-

аламина) кобальт образует координационные связи с диметилбензимидазолнуклеотидом и с цианидной группой.

На фиг. 110 приведена структура главного встречающегося в природе кофермента (называемого также «DBC-коферментом» или «коферментом B_{12}». Вместо цианидной группы витамина B_{12} (которую следует рассматривать как артефакт) этот кофермент содержит 5′-дезоксиаденозин, имеющий нормальную β-связь в отличие от диметилбензимидазолнуклеотида, имеющего α-связь. Дезоксинуклеозид присоединен по положению 5 рибозы связью углерод — кобальт. В клетках большая часть витамина B_{12} присутствует, по-видимому, в форме кофермента B_{12} или близкородственных ему коферментов.

Кофермент B_{12} выступает в качестве кофактора в реакциях изомеризации, в ходе которых осуществляется внутримолекулярный перенос с образованием новых C — C-связей. Он является кофактором ферментов 5.4.99.1 и 2, а также еще не охарактеризованного фермента из *Aerobacter*, катализирующего превращение 1,2-пропандиола в пропионовый альдегид (см. [163]). Механизм действия этого фермента обсуждался выше, на стр. 265.

Гест и др. [942] показали, что витамин B_{12} может функционировать как переносчик метильных групп. В результате ферментативного переноса метильной группы от 5-метил-ТГФ образуется метилкобаламин, в котором метильная группа присоединена непосредственно к кобальту вместо группы дезоксиаденозина, показанной в нижней части фиг. 110. Был выделен в очищенном состоянии фермент, катализирующий без участия какого-либо другого кофактора перенос метильной группы от метилкобаламина на гомоцистеин с образованием метионина.

ПРОСТЕТИЧЕСКИЕ ГРУППЫ КАК ПЕРЕНОСЧИКИ

До сих пор мы рассматривали переносчики, которые связывают действие двух ферментов, не обладая при этом сами ферментативной активностью. В некоторых же случаях в качестве переносчиков функционируют простетические группы ферментов, переносящие определенные группировки от одного соединения к другому. Эти простетические группы часто входят в качестве прочно связанного компонента в молекулу фермента, а потому их, может быть, лучше было бы рассмотреть в следующей главе. Однако, поскольку они действуют как переносчики, мы считаем более удобным рассмотреть их вместе с другими переносчиками; кроме того, в ряде случаев простетические группы связаны относительно непрочно и могут, следовательно, рассматриваться как кофакторы.

Флавиновые группы

Первым из флавопротеидных ферментов был открыт флавопротеид Варбурга и Христиана (1.6.99.1) [2784]. Он был выделен из дрожжей в 1932 г. и разделен на желтую флавиновую группу (она теперь называется «рибофлавинфосфатом» или «флавинмононуклеотидом») и коллоид, который, как было показано позднее Теореллом, представляет собой белок. Строение рибофлавина было установлено путем синтеза Куном и др. [1482] и Каррером и др. [1311] в 1935 г.

Варбург и Христиан рассматривали позднее открытый ими флавопротеид как артефакт [2786]. Однако в настоящее время число известных флавопротеидных ферментов достигает примерно сорока (табл. 27). Некоторые из них имеют в качестве простетической группы рибофлавин-5′-фосфат (флавинмононуклеотид, ФМН), но большинство содержит флавинаденинди нуклеотид (ФАД). Структуры этих групп представлены на фиг. 111. Строение флавинаденинди нуклеотида в настоящее время подтверждено

Таблица 27

ФЛАВОПРОТЕИДЫ [1])

Шифр	Название фермента	Источник получения	Флавин	Число атомов металла на флавиновую группу	Число флавиновых групп на молекулу	Максимальная активность каталитического центра
		Оксидазы				
1.1.3.1	Гликолатоксидаза	Растения	ФМН	—	2 или 4	530
1.1.3.2	Лактатоксидаза	Бактерии	ФМН	—	2	470
1.1.3.4	Глюкозооксидаза	Плесневые грибы	ФАД	—	2	17 000
1.2.3.1	Альдегидоксидаза	Печень	ФАД	$^1/_2$ Mo $^1/_2$ Г?		500
1.2.3.2	Ксантиноксидаза	Молоко	ФАД	$^1/_2$ Mo 4 Fe	2	240
1.2.3.3	Пируватоксидаза	Бактерии	ФАД			
1.2.3.4	Оксалатоксидаза	Мхи	ФМН или РФ			
1.3.3.1	Дигидрооротатдегидрогеназа	Бактерии	ФАД+ +ФМН	1 Fe	2	1 200
1.4.3.1	D-аспартат-оксидаза	Почки	ФАД	—	2	
1.4.3.2	Оксидаза L-аминокислот	Ткани животных	ФМН	—	2	
1.4.3.2	Оксидаза L-аминокислот	Змеиный яд	ФАД	—	1	3 000
1.4.3.3	Оксидаза D-аминокислот	Почки	ФАД	—	1	2 000
1.4.3.5	Пиридоксаминфосфат-оксидаза	Печень	ФМН			
1.5.3.2	Оксидаза N-метиламинокислот	Почки	ФАД			
		Дегидрогеназы				
1.1.2.3	Лактатдегидрогеназа	Дрожжи	ФМН	1 Г	2	6 000
1.1.2.4	D-лактатдегидрогеназа	Дрожжи	ФАД	3 Zn	1	90 000
1.1.99.a	Дегидрогеназа D-2-оксикислот	Дрожжи	ФАД	М		
1.2.2.2	Пируватдегидрогеназа	Бактерии	ФАД		4	10 000
1.3.2.1	Бутирил-КоА-дегидрогеназа	Ткани животных	ФАД	—	4?	
1.3.2.2	Ацил-КоА-дегидрогеназа	Ткани животных	ФАД	1 Fe		
1.3.99.1	Сукцинатдегидрогеназа	Сердечная мышца	ФАД	4 Fe	1	

[1]) В таблице приняты следующие обозначения: РФ—рибофлавин; ФМН—флавинмононуклеотид; ФАД—флавинадениндинуклеотид; Г—гем-группа; М—еще не окончательно идентифицированный атом двухвалентного металла.

Продолжение табл. 27

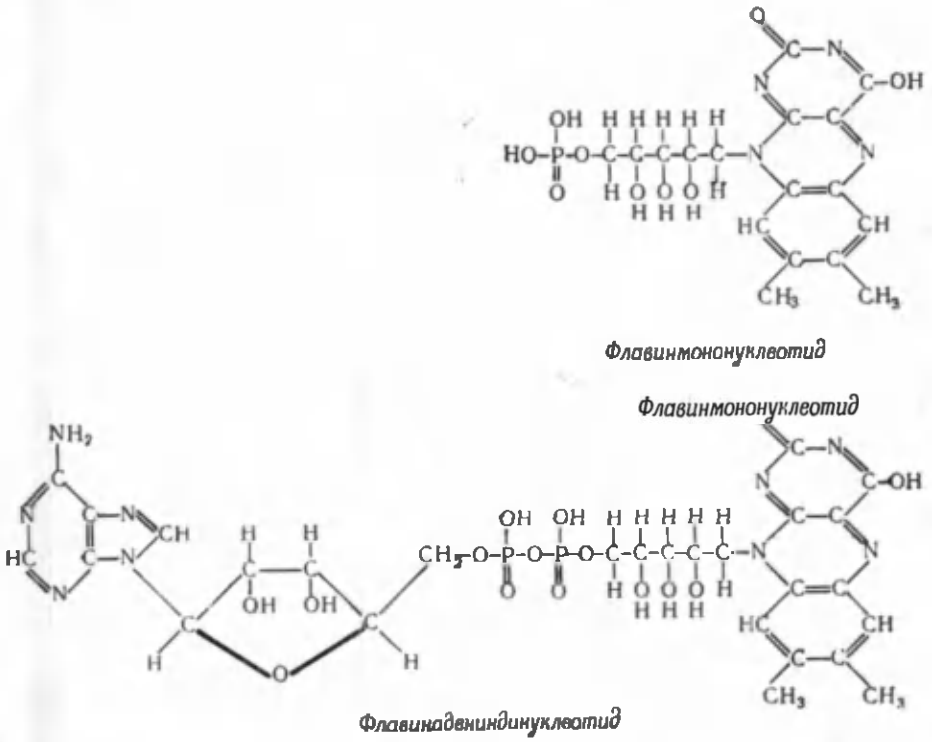
Шифр	Название фермента	Источник получения	Флавин	Число атомов металла на флавиновую группу	Число флавиновых групп на молекулу	Максимальная активность каталитического центра
		НАД (Ф)·H_2-дегидрогеназы				
1.6.2.1	НАД·H_2-цитохром-*c*-редуктаза	Сердечная мышца	ФАД?	4Fe	1	7 000
1.6.2.2	НАД·H_2-цитохром-b_5-редуктаза	Печень	ФАД	2Mg	1	
1.6.2.3	НАДФ·H_2-цитохром-*c*-редуктаза	Дрожжи	ФМН	—		1 300
1.6.2.3	НАДФ·H_2-цитохром-*c*-редуктаза	Печень	ФАД			1 140
1.6.4.2	Глутатионредуктаза	Ткани животных, растения	ФАД			
1.6.4.3	Липоамиддегидрогеназа	Сердечная мышца, бактерии	ФАД	—	2	80 000
1.6.5.1	Хинонредуктаза	Бактерии	ФМН	—		88 000
1.6.5.2	Менадионредуктаза	Печень	ФАД	—	1	700 000
1.6.5.3	Убихинонредуктаза	Сердечная мышца	ФАД	Fe		
1.6.6.1	НАД·H_2-нитратредуктаза	Растения, бактерии	ФАД	M		
1.6.6.2	Нитратредуктаза	Растения	ФАД?			
1.6.6.3	НАДФ·H_2-нитратредуктаза	Растения, плесневые грибы	ФАД?	Mo		
1.6.6.4	Нитритредуктаза	Плесневые грибы	ФАД	M		
1.6.99.1	НАДФ·H_2-диафораза	Дрожжи	ФМН	—	2	50
1.6.99.1	НАДФ·H_2-диафораза	Растения	ФАД	—		4 000
1.11.1.1	НАД-пероксидаза	Бактерии	ФАД	—		5 000
		Другие флавопротеидные ферменты				
1.7.99.1	Гидроксиламинредуктаза	Бактерии	ФАД	Mn		
1.7.99.2	Редуктаза окиси азота	Бактерии	ФАД или ФМН	M		
1.7.99.a	Нитритредуктаза	Бактерии	ФАД	Cu		

в результате полного синтеза [453]; это первый известный пример синтеза динуклеотида.

Приведенные структуры соответствуют окисленным формам, которые представляют собой желтые флуоресцирующие вещества; спектры поглощения этих веществ показаны на фиг. 112. Флавиннуклеотиды очень легко восстанавливаются до лейкоформ химическими восстановителями и после восстановления теряют свой желтый цвет и способность к флуоресценции (исчезает полоса поглощения при 450 *ммк*). При восстановлении два водородных атома присоединяются к хиноидной структуре в изоаллоксазино-

вом ядре, как показано на фиг. 113. Восстановленные формы флавиннуклеотидов легко окисляются кислородом.

Был проведен ряд исследований для выяснения характера связывания простетической группы с белком во флавопротеидах. Теорелл [2002, 2637] высказал предположение, что в дополнение к ионным связям, образованным фосфатом, флавиновое кольцо может быть связано с остатком тирозина



Фиг. 111. Строение флавиновых простетических групп.

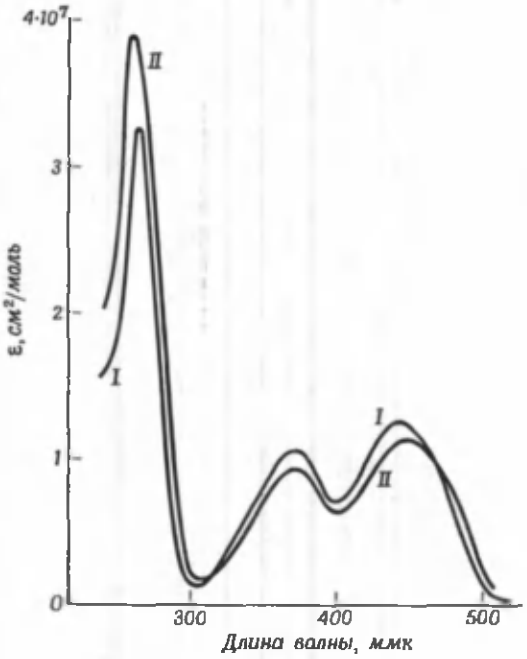
белковой части молекулы. Стриттметтер [2554] показал, что в случае фермента 1.6.2.2 связывание осуществляется не SH-группами белка, а остатком тирозина.

Биологическая активность флавиннуклеотидов, входящих в состав флавопротеидов, обусловлена их способностью к окислению и восстановлению: они действуют как переносчики водорода. Не всегда, однако, связанные с белком флавиновые группы обладают способностью к флуоресценции и не всегда их восстановленные формы бывают способны к аутоокислению. Простетическая группа флавопротеидного фермента легко восстанавливается соответствующим специфическим субстратом, активируемым в результате соединения с активным центром в белковой части молекулы фермента. В ряде случаев было получено спектроскопическое доказательство образования в ходе этого процесса полувосстановленного семихинона флавина [198].

Важность стадии образования семихинона при действии липоамиддегидрогеназы обсуждается на стр. 246 и 248.

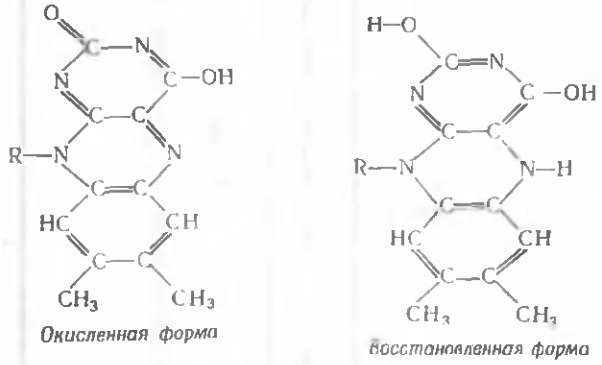
Приведенные в табл. 27 флавопротеидные ферменты сгруппированы в соответствии с типом катализируемой реакции. Первые четырнадцать ферментов — оксидазы, которые непосредственно реагируют с O_2, восстанавливая молекулу кислорода до H_2O_2. Это, однако, не означает, что они не

могут реагировать с другими акцепторами; большинство из них реагирует также с такими красителями, как индофенолы и метиленовый синий, причем некоторые, например ксантиноксидаза, проявляют вообще по отношению



Фиг. 112. Спектры окисленных форм флавинмононуклеотида (*I*) и флавинадениндинуклеотида (*II*).

к акцептору весьма незначительную специфичность. Дигидроортотатдегидрогеназа представляет собой исключение в том отношении, что, будучи способна реагировать с НАД, она может функционировать либо как дигидрооротатоксидаза, либо как зависящая от НАД дигидрооротатдегидрогеназа,



Фиг. 113. Окисленная и восстановленная формы флавиновой группы.

либо, наконец, как НАД·H_2-оксидаза. Кроме того, молекула ее содержит одну группу ФАД и одну группу ФМН, причем каждая из этих групп связывает один атом Fe.

Ферменты следующей группы не могут использовать в качестве акцептора O_2 или НАД(Ф) и реагируют in vivo с акцепторами, природа которых

еще не во всех случаях ясна. Дегидрогеназы коферментов довольно сильно различаются по своей специфичности в отношении акцепторов. Первые четыре фермента этой группы — необычные флавопротеиды в том отношении, что они специфически реагируют с цитохромом; это характерно также для дегидрогеназ 1.1.2.2 и 1.1.2.3. Примером противоположного характера может служить НАД-пероксидаза, которая, подобно ксантиноксидазе, способна реагировать со многими акцепторами, включая H_2O_2, феррицианид и хиноны. Некоторые из флавопротеидных ферментов являются важными компонентами дыхательной цепи, катализируя реакции окисления коферментов.

Из табл. 27 видно, что многие флавопротеиды (хотя и далеко не все) содержат один или несколько атомов металла, которые, по всей вероятности, связаны с флавиновой группой. Вопросы, касающиеся механизма действия металлопротеидов, уже обсуждались в гл. VII.

Величины, характеризующие активность каталитического центра, являются весьма ориентировочными; мы приводим их для того, чтобы показать, что различия между ферментами в этом отношении могут быть весьма значительными.

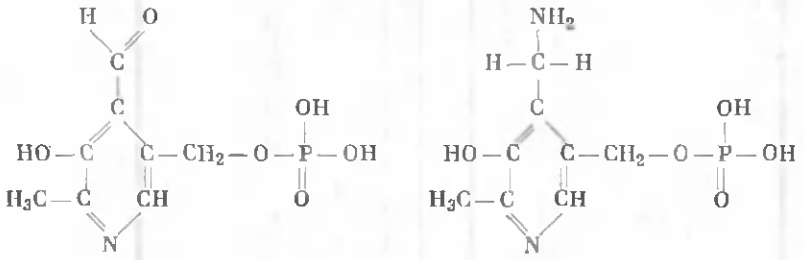
Пиридоксальфосфат

Пиридоксальфосфат служит простетической группой ряда ферментов, которые катализируют большое число различных превращений аминокислот. В некоторых из этих реакций (реакции переаминирования) он действует как переносчик аминогрупп; в других случаях он образует с аминокислотой реакционноспособное соединение и, следовательно, может действовать как «манипулятор».

В 1943 г. Гейл и Эппс [809] разделили лизиндекарбоксилазу (4.1.1.18) на белок и простетическую группу и частично очистили последнюю; эту простетическую группу они назвали «кодекарбоксилазой». В следующем году те же исследователи, выделяя этот кофактор из дрожжей, сумели очистить его в 15 000 раз [811]. Браунштейн и Крицман [315] в 1943 г. показали, что переаминирование между аспартатом и пируватом зависит от неустойчивого в кислоте диализуемого кофактора («коаминоферазы»). Этот кофактор был получен ими в концентрированном виде. В 1944 г. Гунзалус и Белами [949] обнаружили у бактерий, которые росли на среде, не содержащей пиридоксина, и не были способны образовывать тирозиндекарбоксилазу (4.1.1.25), восстановление тирозиндекарбоксилазной активности при добавлении пиридоксаля. В том же году эти авторы вместе с Умбрейтом [950] показали, что если использовать высушенные клетки, выросшие на среде, не содержащей пиридоксина, то для восстановления тирозиндекарбоксилазной активности помимо пиридоксаля потребуется еще и АТФ. Названные авторы синтезировали пиридоксальфосфат и показали, что он восстанавливает активность высушенных клеток. В 1945 г. Бэддилей и Гейл [129] нашли, что синтетический пиридоксальфосфат активирует специфичные аподекарбоксилазы лизина, аргинина, тирозина и орнитина. В 1946 г. Умбрейт, О'Кейн и Гунзалус [2698] показали, что пиридоксаминфосфат также обладает кофакторной активностью в отношении трансаминаз (но не декарбоксилаз) аминокислот. Некоторые исследователи пытались опровергнуть эти данные, но Мейстер и др. [1788] показали, что их отрицательные результаты объясняются различием в скорости активации трансаминаз под действием пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата (активация под действием пиридоксальфосфата происходит значительно быстрее).

Строение пиридоксальфосфата было установлено в 1952 г. Бэддилеем и Матиасом [131] в результате полного синтеза. Формула этого соединения приведена на фиг. 114.

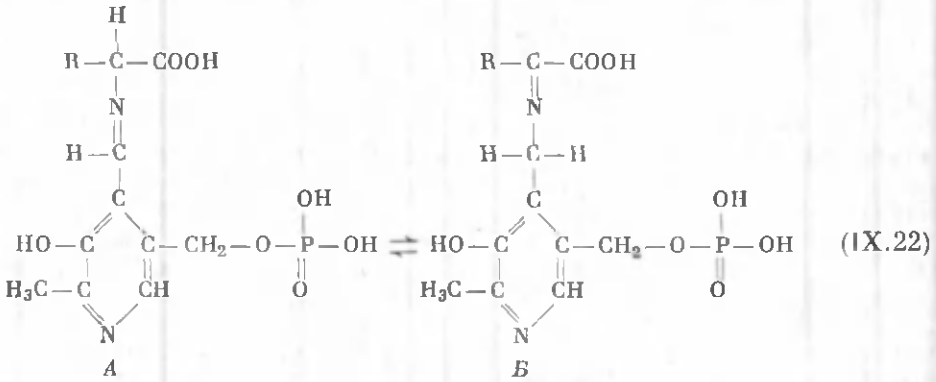
Механизм действия пиридоксальфосфата обсуждали Снелл [1802, 1803] и Браунштейн [312]. Полагают, что во всех случаях пиридоксальфосфат действует путем образования азометина (шиффова основания) в результате



Пиридоксальфосфат Пиридоксаминфосфат

Фиг. 114. Строение пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата.

соединения его альдегидной группы с аминогруппой субстрата. Образовавшийся продукт может подвергаться таутомеризации по следующей схеме:

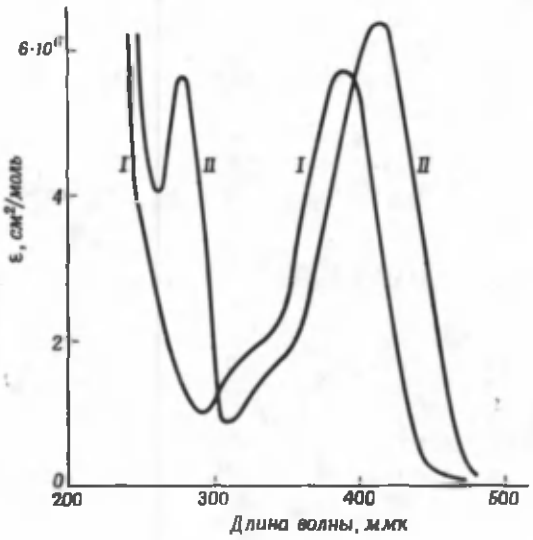


А *Б* (IX.22)

Судьба этого продукта зависит от природы белковой части фермента, к которой присоединен пиридоксальфосфат, и от характера группы R. С помощью данной схемы легко объяснить действие рацемаз, так как в форме *Б* утрачивается асимметрия α-углерода. При действии трансаминаз в результате гидролиза по месту двойной связи в форме *Б* образуются пиридоксаминфосфат и кетокислота; при обращении этой реакции аминогруппа может быть перенесена от пиридоксаминфосфата на другую кетокислоту [1253]. В реакциях, катализируемых декарбоксилазами аминокислот, карбоксильная группа в образующемся продукте становится лабильной и легко отщепляется; при этом остается связанный амин, который затем легко освобождается в результате гидролиза. В ряде других случаев из образовавшегося продукта выделяется молекула воды или другого вещества; при этом остается ненасыщенный остаток, который затем путем гидролиза освобождается из соединения с пиридоксальфосфатом, как, например, при действии серин-, гомосерин- и треониндегидратаз (4.2.1.13—16) и аллиинлиазы (4.4.1.4). Пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат в ближней ультрафиолетовой области имеют полосы поглощения при 395 и 330 *ммк* соответственно. Спектр поглощения пиридоксальфосфата показан на фиг. 115; данные по спектрам поглощения приведены в работах Браунштейна [312] и Дженкинса и Сайзера [1253].

Спектрофотометрически было показано [260], что свободный пиридоксальфосфат может неспецифически соединяться с аминокислотами в отсутствие ферментов (фиг. 115). При изучении переноса NH_2-группы от пиридо-

ксамина было установлено [157], что образование шиффова основания является относительно быстрой стадией; лимитирует скорость процесса стадия таутомеризации, показанная в уравнении (IX.22). Было также найдено, что величины K_m пиридоксальфосфатных ферментов по отношению к их субстратам (аминокислотам) в большинстве случаев равны константам диссоциации и по крайней мере в одном случае константа диссоциации и K_m *изменяются аналогичным образом при изменении* pH [1626]. Специфичность по отношению к определенным аминокислотам и тип катализируемой реакции определяются белковой частью фермента; так, трансаминазы



Фиг. 115. Спектры пиридоксальфосфата и продукта его соединения с глицином [260].

I — пиридоксальфосфат; *II* — пиридоксальфосфат + 0,1 *M* глицин. (Бикарбонатный буфер. pH 7,2.)

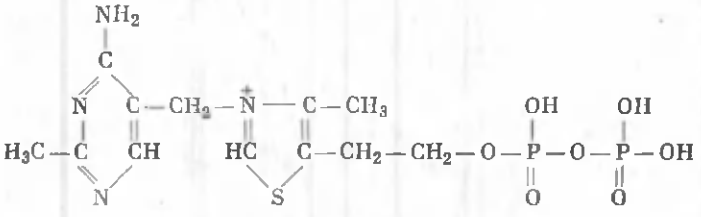
не катализируют декарбоксилирования аминокислот, а декарбоксилазы не катализируют реакций переаминирования, и ни одна из этих групп ферментов не обладает рацемазной активностью. Почти все эти ферменты высокоспецифичны по отношению к своим субстратам — определенным аминокислотам.

Пиридоксальфосфат служит простетической группой не только для рассмотренных выше ферментов, но также и для некоторых других ферментов, в частности для треонин-синтазы (4.2.99.2), катализирующей несколько необычную реакцию — превращение фосфогомосерина в треонин и фосфат. Исследуя эту реакцию с помощью изотопов, Флавин и Слотер [751] получили данные относительно ее механизма, который, по-видимому, состоит в том, что первоначально из шиффова основания удаляется фосфат, а затем по месту образовавшейся двойной связи присоединяется вода.

В роли простетической группы выступает пиридоксальфосфат и у фермента совершенно другого типа, а именно у *α-глюканфосфорилазы из мышц* (2.4.1.1). Показано [1207, 1362], что пиридоксальфосфат прочно связан с белковой частью молекулы этого фермента своей альдегидной группой, однако не за счет образования шиффова основания. Активность α-глюканфосфорилазы зависит от наличия у пиридоксаля фосфатной группы, но в ходе реакции эта группа не обменивается. Механизм действия α-глюканфосфорилазы пока еще не выяснен.

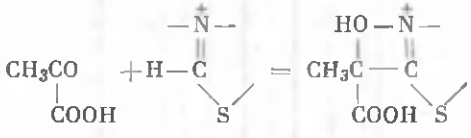
Тиаминпирофосфат

Способность этого вещества служить кофактором впервые установили Ломан и Шустер [1611] в 1937 г.; они выделили из дрожжей кристаллическое вещество, определили его химическую природу и показали, что оно является простетической группой пируватдекарбоксилазы, которая, как обнаружили позднее Грин, Херберт и Субраманян [902], представляет собой тиаминпирофосфатпротеид. Для этой простетической группы различными авторами были предложены различные названия: кокарбоксилаза, дифосфотиамин (ДФТ), тиаминпирофосфат (ТПФ), анейринпирофосфат, витамин-B_1-пирофосфат. Строение тиаминпирофосфата показано на фиг. 116.



Фиг. 116. Строение тиаминпирофосфата.

Тиаминпирофосфат участвует также в функционировании пируватоксидазной и 2-оксоглутаратоксидазной систем и системы, катализирующей образование ацетоина. Уже давно известно, что в реакциях, связанных с превращениями пирувата, в результате декарбоксилирования образуется присоединенный к кофактору остаток «активного ацетальдегида». В отношении места присоединения активного ацетальдегида к молекуле тиамина были высказаны различные предположения. Строение промежуточного соединения было установлено в работах Бреслоу и др. [1147, 1457]. Местом присоединения активного ацетальдегида оказался реакционноспособный атом С между атомами S и N в тиазоловом кольце. Вначале происходит присоединение пирувата, как это схематически изображено ниже (показана лишь та часть тиазолового кольца молекулы тиамина, к которой присоединяется пируват):



(IX.23)

Образовавшееся соединение претерпевает быстрое декарбоксилирование

(IX.24)

В результате образуется α-оксиэтилтиаминпирофосфат, который и является соединением, содержащим остаток активного ацетальдегида.

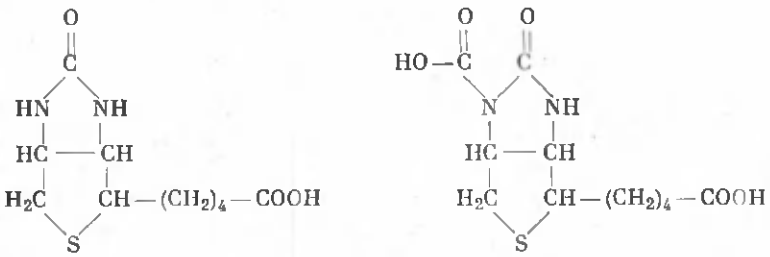
Судьба этого соединения зависит от природы фермента. Декарбоксилаза катализирует его прямой распад с образованием ацетальдегида; в случае пируватдегидрогеназы (оксидазная система) вначале происходит окисление липоатом до ацетильного производного (помимо липоата в качестве акцепторов могут выступать также и некоторые другие соединения, например феррицианид или индофенол), а затем перенос ацетильной группы на вос-

становленный липоат. Пока еще не установлено, происходит ли перенос ацетильной группы одновременно с переносом водорода или сразу же после него (реакция 19 табл. 41).

Другие ферменты, действующие на 2-кетокислоты, например 2-оксоглутарат-дегидрогеназа, вероятно, имеют аналогичный механизм действия; тиаминпирофосфат выступает в этом случае как переносчик более сложных групп. Было показано, что транскетолаза (2.2.1.1), переносящая гликольальдегидную группу от седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат, образует промежуточное соединение, представляющее собой, как полагают, α,β-диоксиэтилтиаминпирофосфат [1149].

Биотин

Биотин уже давно известен как витамин; однако лишь сравнительно недавно было выяснено [1638], что он функционирует в качестве кофактора в ферментативных реакциях, в которых происходит включение или перенос CO_2 (фермент 2.1.3.1 и группа ферментов 6.4). Заболевание, развивающееся

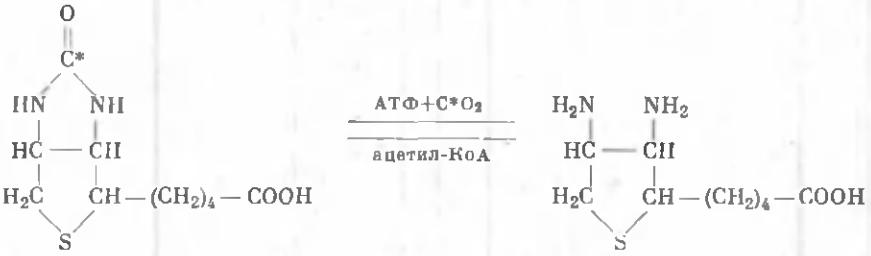


Фиг. 117. Строение биотина и его карбоксилированного производного.

при употреблении с пищей больших количеств яичного белка (egg white injuri), есть не что иное, как биотиновая недостаточность. Оно обусловлено тем, что компонент яичного белка авидин имеет очень высокое сродство к биотину и вследствие этого действует как специфичный ингибитор в реакциях, которые зависят от биотина. Приблизительно в 1950 г. Ларди показал, что при биотиновой недостаточности нарушаются различные протекающие в печени реакции, связанные с включением или переносом CO_2. В 1959 г., изучая механизм действия биотина, Линен и др. [1638, 1639] обнаружили, что при действии метилкротонил-КоА—карбоксилазы (6.4.1.4) из добавленного биотина образуется N-карбоксилированное производное (фиг. 117).

Позднее Вакил и Вайт [2757] в опытах с ацетил-КоА—карбоксилазой (6.4.1.2) нашли, что связанный в виде простетической группы биотин ведет себя не так, как в описанном выше случае. При добавлении к ферменту АТФ, Mn и меченой CO_2 в отсутствие акцептора (ацетил-КоА) они наблюдали включение в биотин одного атома C^{14}, который затем мог быть количественно перенесен на ацетил-КоА и появлялся в образующемся малонил-КоА. Изучение строения карбоксилированной простетической группы, образующейся после первой стадии реакции, показало, однако, что эта группа представляет собой не карбоксибиотин, а неизмененный биотин с полностью меченным «верхним» атомом углерода. Выделенная после второй стадии реакции простетическая группа оказалась модифицированным биотином, как полагали авторы,— диаминобиотином. На основании имеющихся данных можно прийти к заключению, что в ходе реакции простетическая группа претерпевает изменения, показанные на фиг. 118.

У ферментов группы 6.4 биотин выступает в качестве прочно связанной простетической группы; при участии этих ферментов в результате синтетаз-



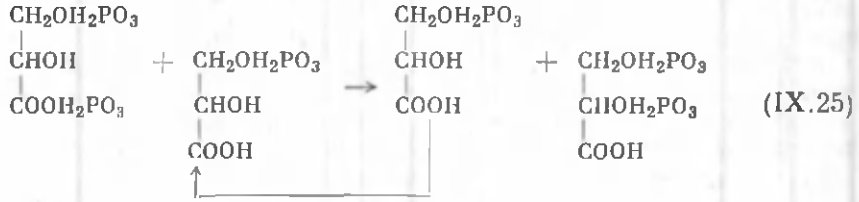
Фиг. 118. Механизм действия биотина в качестве простетической группы.

ной реакции, в ходе которой расщепляется АТФ, происходит включение свободной CO_2 в некоторые метаболиты; механизм этих реакций обсуждался на стр. 269.

ДРУГИЕ КОФЕРМЕНТЫ

Коферменты фосфомутаз

О необычном механизме фосфомутазной реакции уже упоминалось в гл. V. Он отличается от других механизмов ферментативных реакций тем, что здесь в результате переноса одного фосфатного остатка кофермент превращается в продукт, а эквивалентное количество субстрата превращается в кофермент. Почти во всех случаях (2.7.5.1—3), когда фосфат переносится из положения *a* в положение *b*, коферментом служит *a*,*b*-дифосфат (см., например, реакции 2 и 11 табл. 41). В одном случае (2.7.5.4), однако, *a*, *b*-дифосфат превращается в *b*, *c*-дифосфат; коферментом при этом служит *b*-монофосфат:


(IX.25)

Эти фосфомутазные реакции представляют собой частные случаи реакции переноса общего типа

$$АФ + В = А + ВФ. \qquad (IX.26)$$

В рассмотренных выше реакциях первого типа АФ идентично ВФ; в реакциях второго типа А идентично В. Механизм действия фермента 5.4.2.1 отличается от рассматриваемого выше.

Глутатион как специфичный кофермент

Глутатион уже упоминался как переносчик водорода; однако восстановленный глутатион действует также как специфичный кофермент для небольшого числа ферментов или ферментных систем. В этих случаях цистеин не может заменить глутатион. Вероятно, во всех подобных случаях глутатион образует ковалентное соединение с субстратом.

Ломан [1610] первым в 1932 г. идентифицировал восстановленный глутатион как кофермент глиоксалазы. Кюнау [1484] продемонстрировал спонтанное соединение глутатиона с метилглиоксалем. Позднее этот резуль-

тат подтвердили Джоветт и Кастел [1271], которые предположили, что продукт этого соединения и является истинным субстратом фермента. Ямазойе [2939] показал, что в присутствии фермента происходит образование другого соединения; это соединение при pH 7,0 медленно распадалось на молочную кислоту и глутатион, и распад его ускорялся неочищенными препаратами глиоксалазы. Гопкинс и Морган [1157] нашли, что в опытах, в которых субстратом служил метилглиоксаль, в осуществлении реакции помимо глутатиона участвовало два белковых компонента; названные авторы частично очистили эти компоненты и дали им названия «фермент» и «фактор». *Если субстратом служил фенилглиоксаль, то «фактор» не участвовал* в реакции.

Механизм превращения метилглиоксаля в молочную кислоту был выяснен Рэккером [2150] и независимо от него Круком и Лоу [521] (табл. 48). «Фермент» и «фактор» Гопкинса и Моргана известны в настоящее время соответственно как лактоилглутатион-лиаза (4.4.1.5) и оксиацилглутатионгидролаза (3.1.2.6). Первый фермент превращает упомянутое выше соединение Джоветта и Кастела в соединение, обнаруженное Ямазойе; второй фермент гидролизует ряд тиоловых эфиров глутатиона и α-оксикислот. Однако этот фермент не гидролизует соединение, образованное фенилглиоксалем, так что превращение последнего в миндальную кислоту зависит от спонтанного гидролиза этого соединения. Следовательно, «метилглиоксалаза» представляет собой двуферментную систему, а «фенилглиоксалаза»— один фермент.

Другим примером, в котором истинным субстратом фермента является соединение, образованное SH-группой глутатиона и альдегидом, может служить действие формальдегиддегидрогеназы из печени (1.2.1.1). Стритт-меттер и Болл [2555] не нашли другого тиолового соединения, которое могло бы функционировать в этой системе. Они предположили, что фермент катализирует следующую реакцию:

$$GSCH_2OH + НАД = GSCHO + НАД \cdot H_2. \qquad (IX.27)$$

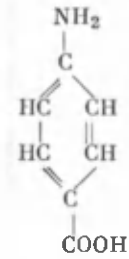
Образующийся формилглутатион затем гидролизуется, по всей вероятности, ферментом, содержащимся в препаратах дегидрогеназы, так как те же препараты быстро гидролизовали также и S-ацетилглутатион.

Восстановленный глутатион действует и как специфичный кофермент некоторых *цис-транс*-изомераз (группа 5.2); механизм действия этих ферментов обсуждался в гл. VII.

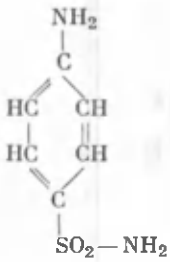
КОФЕРМЕНТЫ И ВИТАМИНЫ

Легко заметить, что многие из коферментов представляют собой производные витаминов. Рассмотрим их в том порядке, в котором они приведены в настоящей главе. Коферменты НАД и НАДФ содержат никотинамид (один из витаминов группы В); липоат служит фактором роста для некоторых микроорганизмов; аскорбат (витамин С) играет роль витамина у приматов и морских свинок; кофермент А содержит пантотеновую кислоту (еще один витамин из группы В); тетрагидрафолат представляет собой производное фолевой кислоты (витамина группы В, в состав молекулы которого входит еще один, более простой витамин — *п*-аминобензойная кислота); кобамидные коферменты близкородственны витамину B_{12}; флавиновые простетические группы содержат рибофлавин (витамин B_2); пиридоксальфосфат является производным пиридоксина (витамин B_6); тиаминпирофосфат содержит тиамин (витамин B_1) и биотин сам является одним из витаминов группы В.

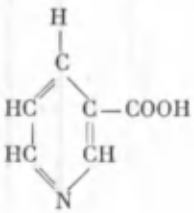
Весьма вероятно, что главная функция витаминов именно в том и состоит, чтобы служить активным компонентом специализированных коферментов и простетических групп; иными словами, организмы часто оказываются



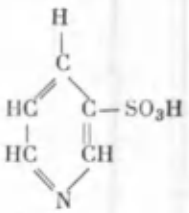
n-Аминобензойная кислота



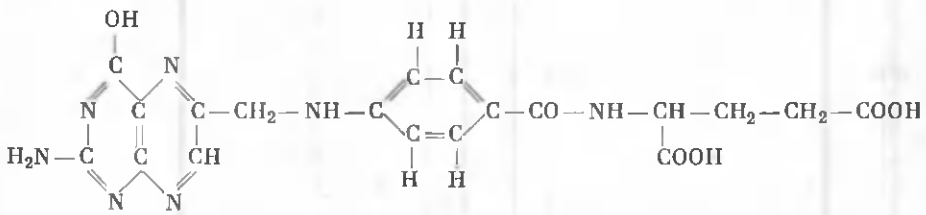
Стрептоцид



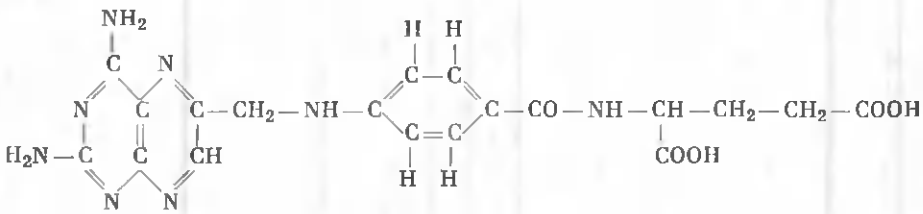
Никотиновая кислота



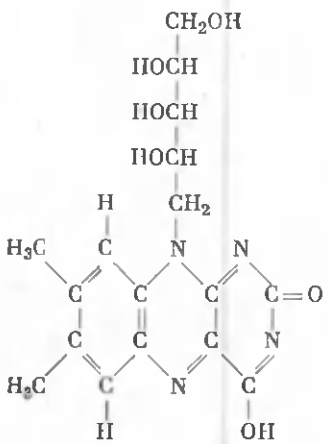
Пиридин-3-сульфоновая кислота



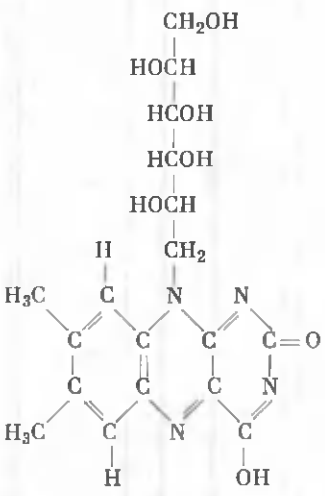
Фолевая кислота



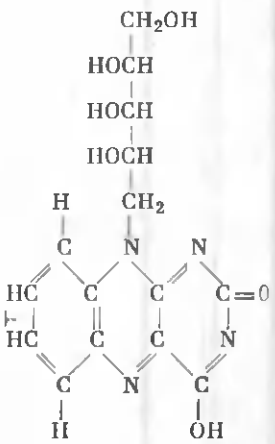
Аминоптерин



Рибофлавин



Галактофлавин



Деметилрибофлавин

Фиг. 119. Строение некоторых витаминов и антивитаминов.

неспособными синтезировать необходимые компоненты многих важных ферментных систем, и в таких случаях эти компоненты должны быть доставлены извне. Существует, очевидно, и ряд других случаев, не отраженных в приведенном выше перечне. На стр. 333 мы уже упоминали предположение Мартиуса о том, что витамин К действует как переносчик водорода в сопряженной с фосфорилированием системе окисления НАД·H_2.

Уолд и его сотрудники (см. [1178]) показали, что витамин А функционирует (в форме альдегида, ретинена) как кофактор в цикле превращений, который протекает при восприятии света.

Естественно ожидать, что вещества, близкородственные витаминам, но не способные выполнять их функцию, должны соединяться с ферментами вместо активных групп и таким образом действовать как своего рода конкурентные ингибиторы. Такие вещества были названы «антивитаминами». Многие из них, будучи введены в организм даже в очень небольших количествах, вызывают симптомы недостаточности соответствующего витамина и могут оказаться высокотоксичными. Так, например, аминоптерин (фолат с аминогруппой вместо гидроксильной группы) ведет себя как антагонист тетрагидрофолата и, кроме того, конкурентно тормозит образование тетрагидрофолата из фолата. Введение в рацион аминоптерина в столь малом количестве, как $1 : 10^6$, убивает крыс и мышей в течение одной недели. Действие целой группы лекарственных веществ, родственных стрептоциду, также основано на их антифолатной активности, в основе которой лежит их сходство с *п*-аминобензойной кислотой. Бактериостатическое действие сульфамидных препаратов снимается либо *п*-аминобензоатом, либо фолатом. Из других антивитаминов можно назвать пиридин-3-сульфоновую кислоту, которая конкурирует с никотиновой кислотой, а также 6,7-дидеметилрибофлавин и галактофлавин, которые конкурируют с рибофлавином. Химическую основу этой конкуренции разъясняет фиг. 119.

ЗНАЧЕНИЕ «НУКЛЕОТИДНОЙ» СТРУКТУРЫ В КОФЕРМЕНТАХ

При рассмотрении структуры различных коферментов бросается в глаза, что большинство из них либо представляют собой истинные нуклеотиды, либо в какой-то степени напоминают нуклеотиды. Многие коферменты содержат азотистое основание на одном конце молекулы и фосфатную группу на другом, с углеводом или без углевода между ними, или же они имеют в своем составе две такие структуры, соединенные в виде динуклеотида. Такое строение имеют переносчики фосфата (см. фиг. 105), которые являются истинными нуклеотидфосфатами; НАД и НАДФ, которые представляют собой истинные динуклеотиды, но вместо пурина или пиримидина содержат никотинамид, и, наконец, флавиннуклеотиды, у которых одна рибоза заменена на рибитол, а основание представлено диметилизоаллоксазином. Одна половина молекулы кофермента А также представляет собой нуклеотид (правда, *не эта часть молекулы служит активной группой*), а тиаминпирофосфат можно рассматривать как пиримидиннуклеотидфосфат, в котором сахар заменен кольцом тиазолия, тогда как в молекуле пиридоксальфосфата фосфат непосредственно присоединен к основанию. Четыре кофермента из перечисленных выше, а именно НАД, НАДФ, кофермент А и флавинаденилдинуклеотид, содержат наряду с реакционноспособным участком остаток адениловой кислоты.

В гл. XI мы будем обсуждать доказательства образования ферментов на нуклеиновокислотных матрицах. Если ферменты действительно образуются таким путем, то весьма вероятно, что ферментный белок сохраняет как бы отпечаток структуры нуклеиновой кислоты, так что отдельные участки молекулы фермента оказываются весьма хорошо приспособленными для соединения с нуклеотидоподобными молекулами. Таким образом, хотя это

пока ничем убедительно не доказано, вполне возможно, что именно в силу названной причины многие коферменты имеют «нуклеотидный» тип строения.

Не может не иметь значения также и тот факт, что три кофермента, участвующие в переносе водорода, содержат в качестве компонента своей структуры группировку, которая, находясь в свободном состоянии, участвует в переносе фосфата; при этом следует иметь в виду, что процессы окисления, в которых принимают участие эти переносчики, сопряжены in vivo с фосфорилированием. Более того, НАД может сам присоединять фосфатный остаток от АТФ, превращаясь в НАДФ. Значение этих взаимоотношений станет яснее в результате дальнейших исследований.

Активаторы ферментов

В этой части главы мы рассмотрим такие кофакторы, которые переводят фермент в каталитически активное состояние, не принимая при этом сами участия в катализируемой ферментом реакции.

ПРОСТЫЕ ЭЛЕКТРОЛИТЫ

Активность одних ферментов не изменяется сколько-нибудь заметно в зависимости от присутствия или отсутствия солей; активность других, напротив, очень сильно зависит от природы и концентрации присутствующих в системе ионов. Некоторые ионы абсолютно необходимы для нормального функционирования ряда ферментов, тогда как другие (например, Ag^+, Hg^{2+}, Pb^{2+}) высокотоксичны почти для всех известных ферментов. Исключением является дифосфоглицератфосфатаза (3.1.3.13), активность которой значительно увеличивается в условиях низких концентраций Hg^{2+} или Ag^+ [2174]. Известны ионы, которые отравляют одни ферменты и активируют другие; некоторые ионы могут даже в зависимости от концентрации по-разному действовать на один и тот же фермент и либо подавлять, либо активировать его. Характер взаимодействия между ионом и ферментом, точно так же как и в реакциях между ионами и белками вообще, может быть чрезвычайно сложным; к чисто коллоидным эффектам добавляется здесь такое явление, как специфичная потребность активного центра данного фермента в ионах определенного типа. Влияние ионов на ферменты может осуществляться различными путями, и в большинстве случаев отдельные факторы не были надлежащим образом проанализированы. Литература по этому вопросу пока еще недостаточно систематизирована.

Некоторые из наблюдаемых эффектов, особенно там, где речь идет о действии анионов, отличаются малой специфичностью; обычно фермент в какой-то степени активен и в отсутствие электролитов, и почти любой анион оказывает активирующее действие. В других случаях (преимущественно там, где активаторами служат катионы) сам фермент не обладает активностью и потребность в катионе оказывается, как правило, довольно специфичной; активирующим действием обладает либо только один определенный катион, либо иногда два или три различных катиона. В качестве примеров для двух рассмотренных выше крайних случаев можно привести фумаратгидратазу, активность которой резко изменяется в присутствии многих анионов, и неорганическую пирофосфатазу, активную только в присутствии ионов Mg^{2+}, которые в этой своей роли не могут быть заменены никакими другими ионами.

Быть может, влияние катионов представляется нам значительно более специфичным, чем влияние анионов, еще и в силу некоторых особенностей постановки исследований. Дело в том, что влияние катионов обычно изучается только в тех случаях, когда фермент в их отсутствие оказывается

неактивным; влияние же различных анионов автоматически проверяется при определении зависимости активности фермента от pH, ибо для того, чтобы провести исследования в широком диапазоне pH, необходимо использовать ряд различных буферных растворов, обычно представляющих собой натриевые или калиевые соли слабых органических или неорганических кислот. Тем не менее имеются, вероятно, определенные различия и в самой природе действия катионов и анионов, хотя лежащие в основе этих различий физико-химические факторы нам пока еще не ясны.

Вначале мы рассмотрим более специфичное влияние неорганических катионов.

Специфичные активаторы — ионы металлов

Показано, что пятнадцать различных катионов металлов, а именно Na^+, K^+, Rb^+, Cs^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} и Al^{3+}, а также NH_4^+ активируют один или несколько ферментов. Соединения молибдена также активируют определенные ферменты, однако в этом случае характер ионной формы активатора неизвестен.

У металлов, перечисленных в приведенном выше списке, атомные номера лежат в пределах между 11 и 55, в большинстве случаев — между 19 и 30. Не известно случая, чтобы металл с атомным номером больше 55 выступал в качестве самостоятельного активатора фермента.

Вероятно, одним из важных факторов, определяющих, какие ионы металлов будут служить активаторами ферментов, должен быть размер ионов. Атомные радиусы ионов-активаторов лежат в относительно узкой области значений, находящейся в центре диапазона известных атомных радиусов.

Приведенные в списке ионы отнюдь не являются взаимозаменяемыми; в некоторых случаях только один из них, но большей же части только два или три способны активировать определенный фермент. Mg^{2+}, например,— обычный активатор многих (хотя и не всех) ферментов, действующих на фосфорилированные субстраты, а именно киназ, синтетаз и ферментов, катализирующих гидролиз ангидридов фосфорной кислоты (но не фосфорилаз). Почти во всех этих случаях Mg^{2+} может быть заменен ионом Mn^{2+}, тогда как другие металлы его обычно заменить не могут. Между тем едва ли можно было бы ожидать сходства в действии Mg^{2+} и Mn^{2+} на основании химических данных. В то же время Na^+, в химическом отношении столь близкий к K^+, не может заменить его в активации пируваткиназы (2.7.1.40), хотя он и заменяет его в качестве активатора кетогексокиназы (2.7.1.3); Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} и иногда Zn^{2+} взаимозаменяемы при активации ряда пептидаз и некоторых других ферментов, действующих на азотсодержащие группировки. Zn входит также как прочно связанный компонент в состав некоторых ферментов (см. [2707]). Много данных по вопросу об активации ферментов металлами собрано в обзоре Ленниджера [1533], а также Мальмстрёма и Розенберга [1699].

Случаи антагонизма ионов при активации ферментов довольно обычны (табл. 28).

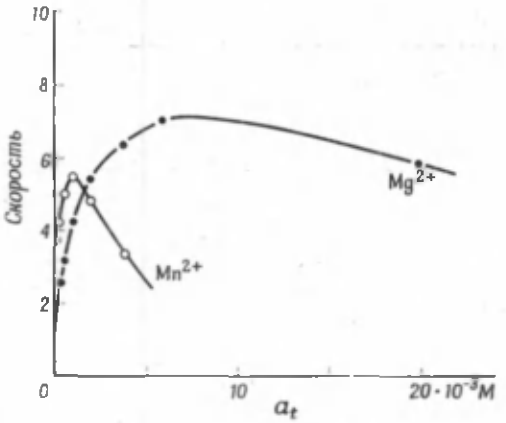
Na^+ часто действует как ингибитор ферментов, активируемых ионами K^+, и так же действуют другие щелочные металлы. Это может быть проиллюстрировано на примере двух первых ферментов, приведенных в табл. 28. Щелочноземельные металлы нередко конкурируют друг с другом; в частности, например, Ca^{2+} подавляет активность ряда ферментов, активируемых ионами Mg^{2+} (АТФ-аза (3.6.1.4) и некоторые другие следующие за ней в Списке ферменты), а Mg^{2+} тормозит действие АТФ-азы миозина, активатором которой служит Ca^{2+}. Часто конкурируют друг с другом также и другие двухвалентные ионы, например Mn^{2+} и Zn^{2+} в случае имидодипептидазы (3.4.3.7).

Таблица 28

АНТАГОНИЗМ ИОНОВ

Фермент	Активаторы	Ингибиторы
Фосфат-ацетилтрансфераза (2.3.1.8)	K^+ или NH_4^+	Na^+ или Li^+
Альдегиддегидрогеназа (1.2.1.5) (дрожжи)	K^+, NH_4^+ или Rb^+	Na^+, Li^+ или Cs^+
Глицеролдегидрогеназа (1.1.1.6) (бактерии)	NH_4^+, K^+ или Rb^+	Zn^{2+}
Метионин-аденозилтрансфераза (2.4.2.13) (дрожжи)	(Mg^{2+} или Mn^{2+}) *плюс* (K^+, NH_4^+ или Rb^+)	Ca^{2+} или Zn^{2+} —
Ацетил-КоА—синтетаза (6.2.1.1)	(Mg^{2+} или Mn^{2+}) *плюс* (K^+, NH_4^+ или Rb^+)	— Na^+ или Li^+
Пантотенатсинтетаза (6.3.2.1)	(Mg^{2+} или Mn^{2+}) *плюс* (K^+ или NH_4^+)	Ca^{2+} или Zn^{2+} Na^+
Пируваткиназа (2.7.1.40)	(Mg^{2+}) *плюс* (K^+, Rb^+ или Cs^+)	Ca^{2+} Na^+ или Li^+
АТФ-аза (3.6.1.4)	Mg^{2+} или Mn^{2+}	Ca^{2+}
5-Нуклеотидаза (3.1.3.5)	Mg^{2+}	Ca^{2+}
Аргининосукцинат-синтетаза (6.3.4.5)	Mg^{2+}	Ca^{2+} или Mn^{2+}
Глутаминсинтетаза (6.3.1.2)	Mg^{2+} или Mn^{2+}	Ca^{2+}
Рибофлавинкиназа (2.7.1.26) (ткани животных)	Mg^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} или Mn^{2+}	Ca^{2+}
Рибофлавинкиназа (2.7.1.26) (растения)	Mg^{2+}, Zn^{2+} или Mn^{2+}	Hg^{2+}, Fe^{2+} или Cu^{2+}
Неорганическая пирофосфатаза (3.6.1.1)	Mg^{2+}	Ca^{2+} или Zn^{2+}
Фосфопируват-гидратаза (4.2.1.11)	Mg^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} или Cd^{2+}	Ca^{2+} или Sr^{2+}
АТФ-аза (3.6.1.3) (миозин)	Ca^{2+} *или* K^+ или NH_4^+	Mg^{2+}
Глициллейцин-дипептидаза (3.4.3.2)	Zn^{2+} или Mn^{2+}	Ca^{2+}
Имидодипептидаза (3.4.3.7)	Mn^{2+}	Zn^{2+}
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+} или Zn^{2+}	Zn^{2+} или Be^{2+}
Креатинкиназа (2.7.3.2)	Mg^{2+}, Mn^{2+} или Ca^{2+}	Zn^{2+}
Малатдегидрогеназа (1.1.1.40) (декарбоксилирующая)	Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} или Cu^{2+}	Hg^{2+}
Малатдегидрогеназа (1.1.1.38) (декарбоксилирующая)	(Mn^{2+}, Co^{2+} или Mg^{2+}) *плюс* (K^+, Rb^+ или Cs^+)	
Кетогексокиназа (2.7.1.3)	(Mg^{2+} или Mn^{2+}) *плюс* (K^+ или Na^+)	
Диизопропилфторфосфат—фторгидролаза (3.8.2.1)	Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} или Co^{2+})	
Пируватдекарбоксилаза (4.1.1.1)	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Al^{3+} или Fe^{3+}	
Оксалоацетатдекарбоксилаза (4.1.1.3)	Mn^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} или Ca^{2+}	
Альдегиддегидрогеназа (1.2.1.4) (дрожжи)	Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} или Ba^{2+}	
Триметафосфатаза (3.6.1.2)	Co^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+} или Mg^{2+}	
Пантетеинкиназа (2.7.1.34)	Mn^{2+}, Mg^{2+} или Ca^{2+}	

Иногда для активации фермента требуются одновременно два иона, обычно с различной валентностью. Причина этого неясна. Например, из приведенных в табл. 28 данных следует, что для пантотенатсинтетазы требуются ионы Mg^{2+} или Mn^{2+} и, кроме того, ионы K^+ или NH_4^+. Часто в таких случаях обнаруживается двойной антагонизм ионов; в данном случае, например, Ca^{2+} или Zn^{2+} конкурируют с активирующим двухвалентным ионом, а Na^+ — с одновалентным ионом. Следует отметить, однако, что ионы, которые обычно действуют как антагонисты, подобно Ca^{2+} и Mg^{2+}, не всегда оказываются антагонистами и могут даже иногда выступать как активаторы одного и того же фермента. Во второй части табл. 28 (под чертой) приведено небольшое число примеров для иллюстрации этого положения. Следует отметить, что активация пируватдекарбоксилазы и оксалоацетатдекарбоксилазы катионами почти столь же неспецифична, как и активация



Фиг. 120. Активация НАД-киназы (2.7.1.23) ионами Mg^{2+} и Mn^{2+} [1427].
a_t — общая концентрация активирующего иона металла (Mg^{2+} или Mn^{2+}).

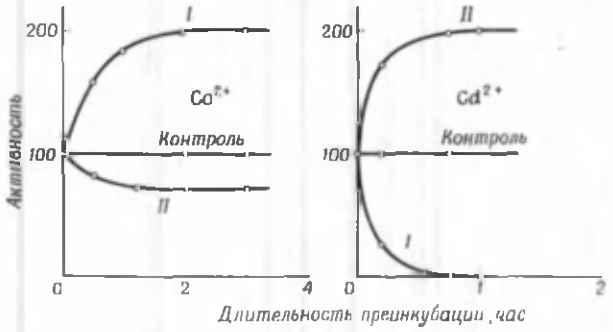
анионами, которую мы рассмотрим ниже. Однако необходимо также учесть, что соответствующие реакции декарбоксилирования катализируются указанными в таблице ионами металлов и в отсутствие ферментов, так что последние просто ускоряют катализ, осуществляемый металлом.

График зависимости между скоростью ферментативной реакции и концентрацией активирующего иона обычно напоминает кривую Михаэлиса, описывающую зависимость между скоростью реакции и концентрацией субстрата. Однако с увеличением концентрации иона скорость реакции часто снова уменьшается. Это особенно отчетливо выражено при активации ионами Mn^{2+}; подобное же явление, хотя и в более слабой форме, обнаруживается также при активации ионами Mg^{2+}. У ферментов, которые активируются как ионами Mg^{2+}, так и ионами Mn^{2+}, и активация и торможение с Mn^{2+} проявляются при значительно меньших концентрациях, нежели с Mg^{2+}; две типичные кривые, иллюстрирующие это явление, приведены на фиг. 120. В таких случаях при концентрации Mg^{2+}, достаточной для максимальной активации, добавление Mn^{2+} вызывает торможение. Точно таким же образом многие двухвалентные ионы, приведенные в табл. 28 в качестве возможных активаторов, оказываются при определенных условиях в конкурентных взаимоотношениях друг с другом.

Активация ионами Mg^{2+} обычно наступает быстро. Однако в других случаях для достижения состояния равновесия требуется значительное время. Именно так, в частности, обстоит дело при активации ионами Mn^{2+}, Co^{2+} и Ni^{2+}, когда процесс активации может длиться много часов [479, 2251].

В реакциях, катализируемых одним и тем же ферментом, определенный ион может оказывать различное влияние при использовании различных субстратов. Следовательно, активирующий ион может таким путем заметно влиять на специфичность фермента. Приведем два примера, которые позволяют нам наглядно представить себе подобные взаимоотношения.

Фиг. 121 показывает, как влияет предварительная инкубация с Co^{2+} и Cd^{2+} на пептидазную и эстеразную активность карбоксипептидазы В (3.4.2.2). При добавлении Co^{2+} пептидазная активность увеличивается вдвое, а эстеразная активность уменьшается; при добавлении Cd^{2+}, наоборот,



Фиг. 121. Влияние предварительной инкубации с Co^{2+} и Cd^{2+} на пептидазную и эстеразную активности карбоксипептидазы В [757].

Предварительная инкубация с 0,01 *М* Co^{2+} (при 40°) или с 0,01 *М* Cd^{2+} (при 25°). *I* — пептидазная активность (субстрат — гиппуриларгинин); *II* — эстеразная активность (субстрат — О-гиппуриларгининовая кислота). Активность выражена в процентах по отношению к активности, наблюдаемой в опытах без добавления металла.

вдвое возрастает эстеразная активность и полностью подавляется пептидазная [757]. Аналогичные результаты были получены и для карбоксипептидазы А (3.4.2.1) [479].

Другим примером влияния ионов на специфичность действия фермента может служить гидролиз нуклеозидтрифосфатов миозином (табл. 29). В этом случае к препарату фермента для удаления следов двухвалентных металлов, присутствующих в препарате, был добавлен версен — агент, образующий комплексы с такими металлами. Результаты опытов говорят сами за себя.

Таблица 29

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ НА СПЕЦИФИЧНОСТЬ АТФ-АЗЫ (МИОЗИНА) [1376]

Субстрат	Относительные скорости гидролиза в различных условиях		
	0,005 *М* $CaCl_2$	0,4 *М* K^+ + версен	0,2 *М* NH_4^+ + версен
АТФ	1,00	2,90	17,2
ГТФ	1,82	0	0
ИТФ	4,51	0	0,92
ЦТФ	0,45	1,09	1,97
УТФ	1,59	0,37	2,58
Аденозинтетрафосфат	1,09	0	0

Влияние определенных активирующих ионов на фермент может изменяться не только в зависимости от характера субстрата и значения pH, но также в зависимости от степени очистки и срока хранения ферментного препарата. Частично очищенная аргиназа (3.5.3.1) активируется ионами Co^{2+}, Mn^{2+} и Ni^{2+} (перечисленные активаторы приведены в порядке убывания эффективности), но высокоочищенный фермент активируется только ионами Mn^{2+} [122]. Киназу фосфорилазы (2.7.1.38) в неочищенных экстрактах активируют Mn^{2+} и Ca^{2+}, но не Mg^{2+}; очищенный же фермент активируют Mn^{2+} и Mg^{2+}, но не Ca^{2+} [1459]. АТФ-азу, присутствующую в миофибриллах в соединении с белком актином (актомиозин), активируют либо Ca^{2+}, либо Mg^{2+}, тогда как свободный миозин активирует только Ca^{2+} [2073]. Эти различия пока еще не объяснены.

Возможные механизмы активации ионами металла. Ионы металлов-активаторов могут различным путем влиять на ферменты. Иногда соответствующие механизмы мало отличаются друг от друга, и в каком-либо конкретном случае может оказаться весьма трудным экспериментально решить вопрос о механизме активации того или иного фермента. В небольшом числе случаев механизм действия ионов был достаточно точно установлен. Ниже мы перечислим некоторые из возможных механизмов активирующего действия ионов.

Металл может быть необходимым компонентом активного центра фермента. Наиболее широко распространенное представление об активирующем действии металлов предусматривает именно такой механизм, и в некоторых случаях это, безусловно, справедливо. Например, дифенолоксидазы (1.10.3.1 и 1.10.3.2) содержат медь, и после удаления меди их можно специфически реактивировать ионами Cu^{2+}, которые включаются в активный центр фермента [1474]. В этом случае медь действует как переносчик в процессе окисления — восстановления; в других случаях, например в гемопротеидных ферментах, металл может действовать либо таким же, либо каким-нибудь иным путем.

Металл может функционировать как связующий мостик между ферментом и субстратом, находясь в соединении с обоими и удерживая таким образом субстрат около активного центра фермента. Последовательность, в которой происходит соединение фермента, металла и субстрата (определяющаяся величинами сродства металла к ферменту и субстрату), может быть различной. Теоретически здесь возможны три случая:

$$E + M + S = EMS; \qquad (IX.28)$$

$$E + M = EM, \quad EM + S = EMS; \qquad (IX.29)$$

$$M + S = MS, \quad E + MS = EMS, \qquad (IX.30)$$

В первом случае (IX.28) предполагается, что активный комплекс образуется прямо из свободных компонентов. Однако подобный процесс представляет собой тримолекулярную реакцию, и потому данный вариант кажется нам маловероятным; более вероятно, что вначале металл соединяется с ферментом или с субстратом, т. е. что он реагирует по второму (IX.29) или по третьему (IX.30) варианту.

Во втором случае (IX.29) металл образует часть активного фермента EM; функция металла состоит здесь в том, чтобы служить местом присоединения субстрата.

В третьем случае (IX.30) металл вначале соединяется с добавленным субстратом, причем образуется истинный субстрат, MS, на который затем уже и должен воздействовать фермент. Второй и третий варианты принято считать кардинально различными; однако, поскольку в образовавшемся комплексе металл соединен и с ферментом и с субстратом, различие между ними касается только порядка соединения компонентов, сам же комплекс

будет в обоих случаях одним и тем же. Действительно, для данного конкретного фермента оба процесса могут идти одновременно, и относительное преобладание того или другого из них будет зависеть от соответствующих констант скоростей и от концентраций компонентов.

В комплексе EMS металл может действовать просто как «манипулятор», т. е. как нечто, удерживающее субстрат в требуемом положении, или же он сам может участвовать в активации субстрата. Последний тип взаимодействия играет важную роль в гипотезе, развиваемой Хеллерманом и Смитом для случаев активации металлами таких ферментов, как аргиназа и некоторые пептидазы. Образование хелатного соединения между связанным с ферментом атомом металла, с одной стороны, и субстратом — с другой, представляет, согласно этим взглядам, важный этап в активации последнего. Мы уже обсуждали эту гипотезу довольно подробно в гл. VII (см. стр. 272).

Существуют прямые доказательства того, что ионы металла способны связывать молекулы органических соединений с белками. Клотц и Минг [1401] изучали влияние ионов металлов на связывание азокрасителей некоторыми белками, включая сывороточный альбумин и пепсин, и обнаружили заметное усиление связывания в присутствии таких ионов, как Zn^{2+}, причем это усиление зависело от pH. Клотц и Минг считают, что наблюдавшееся влияние металла может быть удовлетворительно объяснено образованием координационных связей (без допущения об образовании хелатов), и рассматривают данную систему как модель активации ферментов металлами.

Другой путь, посредством которого ионы металлов могут оказывать активирующее влияние на фермент (хотя влияние в этом случае следует считать скорее «кажущимся», нежели реальным),— это изменение константы равновесия ферментативной реакции. Подобный сдвиг равновесия встречается часто, и далее в этой главе мы обсудим его более подробно. Если какая-либо реакция не идет из-за того, что константа равновесия неблагоприятна для ее протекания, то изменение константы равновесия в благоприятную сторону может дать реакции возможность осуществиться, и это будет воспринято нами как активация.

В подобных условиях возможны два случая. В первом случае истинным субстратом служит комплекс металла с субстратом; добавление металла увеличивает концентрацию этого комплекса и таким образом смещает равновесие в благоприятном направлении. Во втором случае металл образует комплекс с продуктом реакции, т. е. удаляет продукт из сферы реакции, и это также смещает равновесие, а следовательно, приводит к кажущейся активации, хотя при этом металл даже и не участвует во взаимодействии фермента и субстрата и сам субстрат *не* образует комплекса с металлом. Примером последнего типа может служить действие глюкозо-1-фосфат-фосфодисмутазы (2.7.1.41) из мышцы кролика. В данном случае реакция дисмутации ускоряется ионами Mg^{2+}, хотя обратную реакцию они тормозят. Это было объяснено [2399] образованием магниевого комплекса глюкозо-1,6-дифосфата, т. е. смещением равновесия вследствие удаления продукта реакции. Ускоряющее влияние Ca^{2+} на гидролиз, осуществляемый липазами, также, вероятно, связано с образованием комплексов или даже с выпадением осадков в результате взаимодействия металла с продуктами реакции.

Существуют, вероятно, и некоторые другие механизмы для непосредственной активации ферментов ионами металлов. Возможно, например, что на ход реакции влияет изменение поверхностного заряда белковой части молекулы фермента; хорошо известно, что катионы, особенно поливалентные катионы, такие, как Al^{3+}, могут вызывать резко выраженные изменения электрокинетического потенциала белков.

Имеется также ряд косвенных путей для активации ферментативных реакций ионами металлов. Ионы металлов могут удалять ингибитор, при-

сутствующий в ферментном препарате, связывая его в виде комплекса или вызывая выпадение его в осадок. Они могут вытеснять неэффективный ион металла из его соединения с активным центром фермента или с функциональными группами субстрата. Металл, сам по себе неспособный активировать фермент, может вызывать активацию, вытесняя истинный активатор, уже имеющийся в препарате фермента, из его соединения с группами, не входящими в состав активного центра, и таким образом высвобождая активатор для взаимодействия с активным центром. Может быть, именно по этой причине частично очищенная аргиназа активируется ионами многих металлов, тогда как высокоочищенный фермент активируется только ионами Mn^{2+}.

Если фермент существует в двух формах, обладающих различной активностью и находящихся в равновесии друг с другом, и если добавление иона металла смещает равновесие в пользу более активной формы, то такой металл будет действовать как активатор. Способность ионов металлов оказывать подобное влияние, т. е. смещать равновесие между двумя формами фермента, была продемонстрирована на примере фосфопируват-гидратазы [1696, 2846]; правда, в этом случае добавление металла стабилизировало менее активную форму. Установлено также, что Mg^{2+} стабилизирует более активную форму фосфопротеинфосфатазы (3.1.3.16) [2041], а Zn^{2+} стабилизирует активную тетрамерную форму дрожжевой алкогольдегидрогеназы [1281].

Кинетика активации ионами металлов

Соединение иона металла с ферментом или субстратом может оказывать влияние либо на скорость ферментативной реакции, либо на положение устанавливающегося равновесия, либо, наконец, на то и другое одновременно. Вначале мы рассмотрим влияние на скорость реакции.

Влияние на скорость реакции. Как мы уже упоминали, график, описывающий зависимость между скоростью реакции и концентрацией добавленного иона металла, представляет собой равнобочную гиперболу, похожую на обычную кривую зависимости скорости реакции от концентрации субстрата; данные такого рода могут быть обработаны любым из обычных графических методов (фиг. 18). Полученная таким путем величина «K_m» для металла рассматривается многими авторами просто как константа диссоциации комплекса фермент — металл. Простой расчет показывает, однако, что это вряд ли справедливо, так как такая «константа» имеет различный смысл в зависимости от механизма действия активирующего металла и от условий опыта.

Случай 1. Если металл действует, соединяясь с ферментом независимо от соединения последнего с субстратом (ср. уравнение IX.29), то можно рассмотреть следующие реакции:

$$E + M \rightleftarrows EM, \qquad (IX.31)$$

$$E + S \rightleftarrows ES, \qquad (IX.32)$$

$$EM + S \rightleftarrows EMS, \qquad (IX.33)$$

$$ES + M \rightleftarrows EMS, \qquad (IX.34)$$

$$EMS \rightarrow EM + \text{Продукты}. \qquad (IX.35)$$

Уравнение (IX.34) не является необходимым, так как первые три уравнения достаточны для определения равновесия между компонентами. В целях упрощения мы принимаем, что между ферментом, активатором и субстратом существует равновесие, т. е. что система подчиняется условиям кинетики Михаэлиса; тот же результат с обычной заменой K на K_m

получается и при анализе для условий стационарного состояния. Исходя из закона действия масс, можно написать следующие уравнения:

$$K_A q = (e - p - q - r)\, a, \tag{IX.36}$$

$$K_s r = (e - p - q - r)\, s, \tag{IX.37}$$

$$K_s p = qs, \tag{IX.38}$$

$$v = kp, \tag{IX.39}$$

где e — общая концентрация фермента; a и s — концентрации свободных форм активирующего иона и субстрата, которые будут равны общим концентрациям до тех пор, пока концентрация фермента относительно мала; p, q и r — концентрации EMS, EM и ES; K_A и K_s — константы диссоциации комплексов фермента соответственно с активирующим металлом и субстратом. Если соединение фермента с субстратом действительно не зависит от его соединения с металлом, то K_A будет одинаковым для реакций (IX.31) и (IX.34), а K_s будет относиться к обеим реакциям — (IX.32) и (IX.33). Необходимо постулировать образование комплекса ES; в противном случае мы должны допустить влияние иона металла на соединение фермента с субстратом. При составлении приведенных уравнений предполагалось, что металл не соединяется с субстратом и что в образовании продуктов участвует только комплекс EMS.

Решая эти уравнения относительно v обычными методами, получаем

$$v = \frac{ke}{\left(1+\frac{K_s}{s}\right)\left(1+\frac{K_A}{a}\right)}. \tag{IX.40}$$

При постоянной концентрации субстрата это выражение может быть представлено в виде

$$v = \frac{V_a}{1+\frac{K_A}{a}}, \tag{IX.41}$$

где V_a — максимальная скорость при избытке M и при данном значении концентрации субстрата, определяемая выражением

$$V_a = \frac{ke}{1+\frac{K_s}{s}}. \tag{IX.42}$$

В этом случае на графике зависимости $1/v$ от $1/a$ получают одинаковую величину K_A при всех концентрациях субстрата, и эта величина будет представлять собой истинную константу диссоциации EM. Так как уравнение (IX.40) симметрично относительно s и a, то графически определенная величина K_m не будет зависеть от концентрации активирующего иона.

Случай 2. Если соединение фермента с субстратом зависит от его соединения с металлом, т. е. если E и EM обладают различным сродством к субстрату, то константы диссоциации для реакций (IX.32) и (IX.33) не будут равны. Обозначим их соответственно через K_s и K'_s. Уравнение для скорости реакции будет в этом случае иметь следующий вид:

$$v = \frac{ke}{\left(1+\frac{K'_s}{s}\right)\left[1+\frac{K_A\left(1+\frac{s}{K_s}\right)}{a\left(1+\frac{s}{K'_s}\right)}\right]}. \tag{IX.43}$$

Это общее уравнение справедливо для всех степеней взаимодействия, но интерес представляют два крайних случая. Один из них, при котором

$K_s = K'_s$, мы уже рассмотрели как случай 1. Другой случай — это тот, при котором с субстратом может соединяться только комплекс фермент — металл, так что ES не образуется вообще и, следовательно, $K_s \to \infty$. В этом случае уравнение (IX.43) сокращается до

$$v = \frac{ke}{\left(1+\frac{K'_s}{s}\right)\left(1+\frac{K_A}{a\left(1+\frac{s}{K'_s}\right)}\right)}. \qquad \text{(IX.44)}$$

Подобное же уравнение для этого крайнего случая было выведено Олберти [33].

Уравнение (IX.44) может быть представлено в форме

$$v = \frac{V_a}{1+\frac{K_{Ap}}{a}}, \qquad \text{(IX.45)}$$

(ср. IX.41)

где V_a, как и раньше, определяется уравнением (IX.42) (с заменой K_s на K'_s) а K_{Ap} — кажущаяся константа диссоциации комплекса EM — определяется выражением

$$K_{Ap} = \frac{K_A}{1+\frac{s}{K'_s}}. \qquad \text{(IX.46)}$$

Таким образом, определенная графически константа диссоциации для металла (K_{Ap}) будет равна истинной константе диссоциации K_A только при относительно низкой концентрации субстрата (по сравнению с величиной K'_s). *При более высокой концентрации субстрата «кажущееся» сродство* фермента к металлу будет увеличенным, потому что концентрация EM будет уменьшаться в результате превращения в EMS, так что реакция (IX.31) будет продолжать идти вправо.

Точно так же как концентрация субстрата оказывает влияние на величину «кажущегося» сродства фермента к иону металла, так и концентрация иона металла оказывает влияние на величину «кажущегося» сродства фермента к субстрату. Преобразуя уравнение (IX.43), получаем величину «кажущейся» константы диссоциации субстрата

$$K_{sp} = K'_s \frac{\left(1+\frac{K_A}{a}\right)}{\left(1+\frac{K'_s}{K_s}\cdot\frac{K_A}{a}\right)}. \qquad \text{(IX.47)}$$

В одном из крайних случаев, которые мы рассмотрели выше, а именно в том случае, когда $K_s \to \infty$, это выражение сокращается до

$$K_{sp} = K'_s\left(1+\frac{K_A}{a}\right). \qquad \text{(IX.48)}$$

Следовательно, обычные методы графического анализа дают возможность определить истинную константу диссоциации субстрата из его комплекса с активированным под действием металла ферментом (K'_s) только при высоких концентрациях активатора, когда фермент фактически полностью переведен в активную форму EM.

С л у ч а й 3. Данный случай представлен уравнением (IX.30), согласно которому *металл соединяется с субстратом, а не с ферментом*. Это наиболее трудный для математической обработки случай, и его полный анализ еще не был опубликован. Трудности связаны с тем обстоятельством, что, в то время как в случаях 1 и 2, т. е. при соединении металла с ферментом, концентрация свободных ионов металла практически не изменяется (напомним,

что количество присутствующего фермента относительно очень мало), в данном случае, т. е. при соединении металла с субстратом, значительная часть ионов металла может оказаться связанной. И наоборот, ион металла может связать значительную часть субстрата. Поэтому ни концентрация свободного иона металла, ни концентрация свободного субстрата не будут соответствовать исходной величине. Необходимо, следовательно, перейти от простых уравнений для равновесных реакций, т. е. от уравнений, в которых участвуют *свободные* формы, к уравнениям, содержащим только *общие* концентрации, а такие уравнения оказываются весьма сложными. Как отмечают Рэбин и Крук [2138], в первую очередь необходимо определить концентрацию свободных ионов металла. Это до сих пор не было сделано, и авторы довольствовались определением общей концентрации металла. То же самое справедливо и в отношении концентрации субстрата в тех случаях, когда субстрат соединяется с ионом металла.

Выводя уравнения, содержащие концентрации свободных компонентов, мы исходим из допущения, что субстрат не соединяется с ферментом и продукт не соединяется с металлом (хотя это и не имеет значения, если рассматривать только начальные скорости реакций). При этом мы получаем

$$M + S \rightleftarrows MS, \tag{IX.49}$$

$$E + MS \rightleftarrows EMS, \tag{IX.50}$$

$$EMS \longrightarrow E + M + \text{Продукты}. \tag{IX.51}$$

Соответствующие уравнения, вытекающие из закона действия масс, имеют следующий вид:

$$K_0 q = as, \tag{IX.52}$$

$$K_{AS} p = (e - p)\, q, \tag{IX.53}$$

$$v = kp, \tag{IX.54}$$

где e — общая концентрация фермента; a и s — концентрация *свободных* форм активирующего иона и субстрата; p и q — концентрация EMS и MS; K_0 и K_{AS} — константы диссоциации соответственно для реакций (IX.49) и (IX.50). Из этих уравнений получаем

$$v = \frac{ke}{1 + \dfrac{K_0 K_{AS}}{as}}. \tag{IX.55}$$

Это приводит к довольно неожиданному результату, ибо указывает, что максимальная скорость, достигаемая при увеличении a или s, оказывается одной и той же:

$$V_a = V_s = ke, \tag{IX.56}$$

при условии, что s или a соответственно сохраняются постоянными. Следовательно, создается впечатление, что фермент может быть насыщен субстратом даже при низкой концентрации субстрата, если мы повысим концентрацию металла. В действительности, однако, это не так. Дело в том, что приведенные выше уравнения включают концентрацию *свободных* ионов металла и свободного субстрата, и для того, чтобы при увеличении концентрации металла поддерживать постоянной концентрацию свободного субстрата (s), необходимо значительно увеличить *общую* концентрацию субстрата, а это равнозначно насыщению фермента его истинным субстратом путем увеличения концентрации комплекса металл — субстрат.

Уравнение (IX.55) симметрично относительно a и s, и обе константы K_0 и K_{AS} можно было бы считать аналогичными, т. е. можно было бы полагать, что они определяют влияние концентрации соответственно активатора

и субстрата на скорость ферментативной реакции. Однако из вывода уравнения видно, что эти константы имеют совершенно различный смысл. K_{AS} есть константа сродства фермента к субстрату MS, тогда как K_0 характеризует не сродство фермента, а процесс соединения активатора с субстратом. В уравнении (IX.55) произведение K_0K_{AS} является фактически одной константой, которую можно определить графически путем построения графика зависимости между скоростью ферментативной реакции и концентрацией либо свободного субстрата, либо свободного активирующего иона. Полученные таким путем «кажущиеся» константы Михаэлиса будут определяться следующими выражениями:

$$K_{sp} = \frac{K_0K_{AS}}{a}, \tag{IX.57}$$

$$K_{Ap} = \frac{K_0K_{AS}}{s}. \tag{IX.58}$$

Не существует способа для определения величин K_0 или K_{AS} в отдельности. Следует отметить, что «кажущаяся» константа сродства фермента к субстрату при определенной концентрации металла равна «кажущейся» константе сродства фермента к металлу при той же концентрации субстрата, какой была в первом случае концентрация металла.

Скорость реакции можно выразить через общие концентрации субстрата и активатора (s_t и a_t соответственно), подставляя следующие значения s и a:

$$s = s_t - q, \tag{IX.59}$$

$$a = a_t - q, \tag{IX.60}$$

в уравнения (IX.52) и (IX.53). Отсюда получаем (поскольку q не может быть больше a_t или s_t, какая бы из этих величин ни была меньшей)

$$v = \frac{ke}{1 + \dfrac{2K_{AS}}{(K_0 + a_t + s_t) - \sqrt{\{(K_0 + a_t + s_t)^2 - 4a_ts_t\}}}}. \tag{IX.61}$$

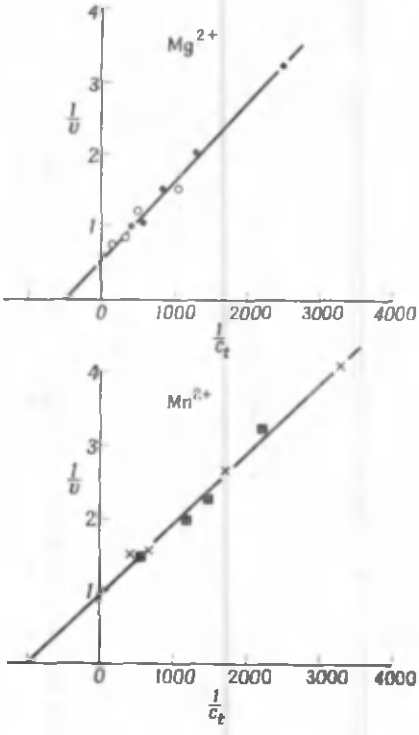
Из уравнения (IX.61) для данных значений констант и общих концентраций легко может быть рассчитано v; однако это уравнение нельзя преобразовать в обычную форму, с тем чтобы получить простые алгебраические выражения, определяющие эффективные значения констант Михаэлиса для субстрата и активатора.

Ясно, что в этом случае, как и в более простом выражении (IX.55), замена a_t на s_t или s_t на a_t не изменяет выражения. Следовательно, сделанное выше заключение о тождестве «кажущихся» констант Михаэлиса для активатора и субстрата (см. уравнения IX.57 и IX.58) будет приложимо также и при использовании общих концентраций. Такого рода данные были получены экспериментально в опытах с креатинкиназой. Асконас [93] и Кьюби и др. [1480] нашли, что величина «кажущегося» сродства фермента к данному иону металла при определенной концентрации АДФ была такой же, как и величина сродства фермента к АДФ при концентрации металла, равной концентрации АДФ в первом случае. На фиг. 122 приведены результаты опытов Асконаса, характеризующие зависимость скорости реакции от общей концентрации Mg^{2+} и Mn^{2+} в присутствии 0,003 M АДФ или от общей концентрации АДФ в присутствии 0,005 M Mg^{2+} или Mn^{2+}. Из этих графиков видно, что K_m для АДФ в присутствии Mg^{2+} отличается от K_m для АДФ в присутствии Mn^{2+}, но каждая из этих величин хорошо совпадает с величиной K_m для соответствующего металла. Эти экспериментально полученные константы Михаэлиса являются, вероятно, сложными функциями K_0 и K_{AS}, о чем можно судить по уравнению (IX.61); однако если

a и s достаточно велики по сравнению с K_0, то уравнение (IX.61), упрощается до

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_{AS}}{s}}. \qquad (IX.62)$$

Следовательно, константа Михаэлиса для истинного субстрата может быть определена по зависимости скорости реакции от концентрации добавленного субстрата при достаточно высокой концентрации активатора.



Фиг. 122. Эквивалентность «кажущихся» величин сродства креатинкиназы (2.7.3.2) к активирующему металлу и субстрату [93].

Реакции между АДФ и креатинфосфатом; c_t — общая молярная концентрация:
● АДФ (+ 0,005 M Mg^{2+}),
○ Mg^{2+} (+ 0,003 M АДФ),
■ АДФ (+ 0,005 M Mn^{2+}),
× Mn^{2+} (+ 0,003 M АДФ).

С л у ч а й 4. В предыдущем случае было сделано предположение, что фермент способен соединяться с субстратом только в присутствии металла; другими словами, константа диссоциации комплекса ES принималась равной бесконечно большой величине. Рассмотрим теперь более общий случай, а именно тот случай, когда фермент может соединяться и с S и с MS, но величины сродства при этом различны; металл оказывает в этом случае влияние на соединение фермента с субстратом, но это влияние не столь сильно выражено, как в случае 3. В дополнение к уравнениям (IX.49—IX.51) мы должны теперь ввести равновесие

$$E + S \rightleftharpoons ES \qquad (IX.63)$$

с константой диссоциации K_s. Тогда получаем

$$K_0 q = as, \qquad (IX.64)$$

$$K_{AS} p = (e - p - r)\, q, \qquad (IX.65)$$

$$K_s r = (e - p - r)\, s, \qquad (IX.66)$$

$$v = kp, \qquad (IX.67)$$

где r — концентрация ES. Отсюда находим

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_0 K_{AS}}{as}\left(1 + \frac{s}{K_s}\right)}. \qquad (IX.68)$$

Это уравнение больше уже не является симметричным относительно концентраций активатора и субстрата. «Кажущиеся» константы Михаэлиса будут определяться следующими выражениями:

$$K_{sp} = \frac{K_{AS}}{\frac{a}{K_0} + \frac{K_{AS}}{K_s}}, \qquad (IX.69)$$

$$K_{Ap} = K_0 \left(\frac{K_{AS}}{s} + \frac{K_{AS}}{K_s}\right). \qquad (IX.70)$$

Представляют интерес два крайних случая. Если фермент совсем не соединяется со свободным субстратом, то величина K_s будет бесконечно большой и уравнение (IX.68) сократится до (IX.55), т. е. мы получим случай 3. Если же фермент обладает одинаковым сродством к S и MS, другими

словами, если металл не оказывает влияния на соединение фермента с субстратом, то $K_{AS} = K_s$ и уравнение (IX.68) принимает вид

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_0}{a}\left(1 + \frac{K_{AS}}{s}\right)}. \qquad \text{(IX.71)}$$

В рассматриваемые выражения входят концентрации *свободных* компонентов; если выразить скорость через общие концентрации, то уравнение (IX.68) переходит в

$$v = \frac{ke}{\left(1 - \frac{K_{AS}}{K_s}\right) + \left(1 + \frac{s_t}{K_s}\right)\frac{2K_{AS}}{(K_0 + a_t + s_t) - \sqrt{\{(K_0 + a_t + s_t)^2 - 4a_t s_t\}}}}. \qquad \text{(IX.72)}$$

Если $K_s \to \infty$, то уравнение сокращается до выражения (IX.61). Если же мы примем $K_{AS} = K_s$, то получим уравнение, соответствующее уравнению (IX.71), выраженному через общие концентрации, а именно

$$v = \frac{ke}{\frac{2(K_{AS} + s_t)}{(K_0 + a_t + s_t) - \sqrt{\{(K_0 + a_t + s_t)^2 - 4a_t s_t\}}}}. \qquad \text{(IX.73)}$$

Случай 5. Если металл, играющий роль активатора, соединяется с добавленным субстратом, образуя комплекс, который и служит истинным субстратом, как в случае 3, то весьма возможно, что соединение E с MS будет осуществляться именно через атом металла. В таком случае не исключено, что активный центр фермента может соединяться как со свободным металлом, так и с металлом, присоединенным к субстрату, хотя и не обязательно оба эти взаимодействия будут характеризоваться одной и той же величиной сродства. Мы должны в таком случае рассмотреть помимо реакций (IX.49 — IX.51) еще и равновесие

$$\mathrm{E} + \mathrm{M} = \mathrm{EM} \qquad \text{(IX.74)}$$

с константой диссоциации K_A. Это приводит к уравнениям

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_0 K_{AS}}{as}\left(1 + \frac{a}{K_A}\right)} \qquad \text{(IX.75)}$$

и

$$v = \frac{ke}{\left(1 - \frac{K_{AS}}{K_A}\right) + \left(1 + \frac{a_t}{K_A}\right)\frac{2K_{AS}}{(K_0 + a_t + s_t) - \sqrt{\{(K_0 + a_t + s_t)^2 - 4a_t s_t\}}}}. \qquad \text{(IX.76)}$$

Подобно уравнениям, выведенным для случая 4, уравнения (IX.75) и (IX.76) уже не симметричны относительно a и s, и «кажущиеся» константы Михаэлиса, представляющие собой сложные функции констант равновесия и общих концентраций, оказываются различными для субстрата и активатора.

В допущениях, сделанных при рассмотрении случая 5, подразумевается, что M и MS конкурируют друг с другом за фермент. Поэтому избыток металла, добавленный после того, как весь субстрат превратится в MS, будет действовать как конкурентный ингибитор. Действительно, часто наблюдается, что с увеличением концентрации металла-активатора скорость реакции сначала достигает максимума, а затем начинает падать. Чтобы отразить это явление, в уравнение (IX.76) введен конкурентный член $\left(1 + \frac{a_t}{K_A}\right)$, который стремится уменьшить скорость реакции при уве-

личении a_t (ср. с уравнением IX.72, в котором конкуренция между S и MS отражена присутствием конкурентного члена $\left(1+\frac{s_t}{K_s}\right)$).

Случай 6. Наиболее общий случай, на основе которого могут быть выведены уравнения для всех других случаев активации ионами металла, это такой, когда и свободный субстрат и свободный металл соединяются с ферментом, а также друг с другом, так что равновесия (с соответствующими константами) имеют следующий вид:

$$E+M=EM \quad (K_A) \tag{IX.77}$$

$$EM+S=EMS \quad (K'_s) \tag{IX.78}$$

$$E+S=ES \quad (K_s) \tag{IX.79}$$

$$ES+M=EMS \quad (K'_A) \tag{IX.80}$$

$$M+S=MS \quad (K_0) \tag{IX.81}$$

$$E+MS=EMS \quad (K_{AS}) \tag{IX.82}$$

Перед нами три пары реакций, в результате которых путем превращений, происходящих в различной последовательности, из E, M и S образуется EMS.

Конечно, весьма маловероятно, чтобы в каком-либо частном случае все приведенные реакции играли одинаково важную роль. EMS обозначает активный комплекс, но такой комплекс может иметь четыре различные структуры, а именно E — M — S, E — S — M, M — E — S и $E\begin{matrix}S\\|\\M\end{matrix}$. В первом случае, когда металл действует как связующее звено между E и S, комплекс может образоваться в результате реакций (IX.78) или (IX.82), но маловероятно, чтобы он образовывался путем реакции (IX.80). Во втором случае комплекс E — S — M вряд ли может образоваться в результате реакции (IX.78). В первом случае E не соединяется с S, во втором — E не соединяется с M и в третьем — M не соединяется с S. Только для четвертой структуры все реакции оказываются с химической точки зрения вероятными. Эти соображения, однако, не влияют на последующий анализ. Они просто указывают на вероятность того, что некоторые из констант будут приближаться к бесконечности.

Из определений констант равновесия получаем

$$K_A K'_s = K_s K'_A = K_0 K_{AS}. \tag{IX.83}$$

Любых четырех из приведенных выше равновесий достаточно для выведения уравнения скорости, выраженного через концентрации *свободных* компонентов:

$$v=\frac{ke}{1+\frac{K_0K_{AS}}{as}\left(1+\frac{a}{K_A}+\frac{s}{K_s}\right)}. \tag{IX.84}$$

Комбинируя это уравнение с уравнениями (IX.83), его можно представить в различных других формах. Так, уравнение (IX.40) для случая 1 может быть получено путем подстановки $K_0K_{AS}=K_AK'_s$ и $K'_s=K_s$; уравнение (IX.43) для случая 2 — подстановкой $K_0K_{AS}=K_AK'_s$; уравнение (IX.55) для случая 3 — подстановкой $K_A=K_s\to\infty$; уравнение (IX.68) для случая 4 — подстановкой $K_A\to\infty$; уравнение (IX.75) для случая 5 — подстановкой $K_s\to\infty$.

Соответствующее уравнение, выраженное через *общие* концентрации, к сожалению, слишком сложно для практического использования, и экспериментальные данные, основывающиеся на общих концентрациях, могут

быть проанализированы только с помощью уравнений, приведенных для специальных случаев 1—5.

Критерии для определения механизма активации. Общее заключение, вытекающее из приведенных выше рассуждений по кинетике активации ионами металлов, сводится к тому, что предположение, согласно которому «кажущаяся» константа Михаэлиса для активирующего иона представляет собой величину, обратную величине сродства данного иона к ферменту, обычно оказывается неправильным. Кроме того, определяемая в этих условиях константа Михаэлиса для субстрата может включать функции сродства активирующего иона к субстрату и ферменту. Рассматриваемый вопрос имеет совершенно самостоятельное значение и не связан с тем обстоятельством, что константы Михаэлиса могут в известной степени отражать кинетику реакции, как отмечено на стр. 87 в гл. IV.

Для того чтобы исследовать действие активирующего иона в каком-либо определенном случае, желательно иметь дополнительные данные, помимо тех, которые можно получить из измерений скорости реакции при различных концентрациях субстрата и иона металла. В настоящее время мы располагаем физическими методами измерения концентрации свободного Mg^{2+} и других ионов в присутствии недиссоциированных комплексов металлов. В некоторых случаях константы сродства при соединении металла с субстратом могут быть определены независимо от опытов с участием фермента.

Определение механизма действия металла-активатора значительно облегчается, если активация фермента зависит от времени. Во многих случаях активация достигает максимума только через несколько часов. В таких случаях для определения активности требуется предварительная инкубация металла с ферментом, так как взаимодействие металла с белком (для которого присутствие субстрата не обязательно) осуществляется относительно медленно. Предварительная инкубация металла с субстратом в отсутствие фермента не дает эффекта. Ферменты, ведущие себя подобным образом, например аргиназа, активируются, следовательно, по механизму, приведенному в уравнении (IX.29); активной формой фермента при этом оказывается EM (случаи 1 или 2). Такого рода временные эффекты, видимо, обычны для активации ионами Mn^{2+} или Co^{2+} пептидаз и некоторых сходных ферментов, действующих на азотсодержащие группировки; у ферментов, активируемых ионами Mg^{2+}, эти эффекты обычно не наблюдаются.

Если константа Михаэлиса для субстрата при определенной концентрации активатора равна константе Михаэлиса для активатора при определенной концентрации субстрата (которая совпадает с использовавшейся в первом случае концентрацией активатора), то весьма вероятно, что металл и субстрат соединяются в комплекс, который и служит истинным субстратом фермента, и что только этот комплекс соединяется с ферментом в сколько-нибудь значительной степени (случай 3). Это заключение основывается на том соображении, что если свободный металл или свободный субстрат соединяются с ферментом столь же эффективно, как MS, то величины K_m, определенные в указанных выше условиях, не могут быть одинаковыми (случаи 4 и 5). Если же с ферментом могут соединяться и свободный металл, и свободный субстрат, и MS (случай 6) и если при этом величины сродства фермента к металлу и к субстрату равны, то для скорости реакции также может быть получено выражение, симметричное относительно концентраций активатора и субстрата. Эта последняя возможность представляется, однако, весьма маловероятной.

Основывающееся на кинетических данных заключение о том, что активация обусловлена взаимодействием металла и субстрата, значительно подкрепляется, если независимым путем удастся показать, что такое взаимодействие имеет место, и измерить величину K_0. Например, эффективность взаимодействия Mg^{2+} с АТФ была определена Хёрсом [1084] и Асконасом [93]

по результатам титрования АТФ в присутствии и в отсутствие металла. Был сделан ряд попыток определить константы диссоциации комплексов Mg—АТФ на Mg^{2+} и АТФ; однако при этом были получены значения, отличающиеся друг от друга иногда почти в 50 раз. Судя по последним данным [2035], $K_0 = [Mg^{2+}]\,[АТФ^{4-}]/[Mg - АТФ^{2-}] = 10^{-5}\ M$, что достаточно хорошо согласуется с величиной $1{,}1 \cdot 10^{-5}\ M$, рассчитанной по кинетическим данным, полученным в опытах с креатинкиназой [1983]. Это говорит в пользу предположения о том, что комплекс (Mg — $АТФ^{2-}$) является субстратом креатинкиназы. Моррисон и др. [1869] считают, что поскольку взаимодействие Mg^{2+} с АДФ относительно невелико, то при осуществлении обратной реакции комплекс E — Mg — АДФ может образовываться в результате соединения компонентов в любой последовательности.

Существование металл-субстратных комплексов (не обязательно являющихся субстратом ферментативной реакции) обнаруживается по изменению константы равновесия катализируемой ферментом реакции при изменении природы или концентрации активирующего металла. Ниже мы рассмотрим такого рода изменения.

Влияние на константу равновесия. Предположим, что протекает обратимая ферментативная реакция $S_f \rightleftarrows S_b$ с константой равновесия

$$K = \frac{s_b}{s_f}, \tag{IX.85}$$

и допустим также, что и S_f и S_b образуют комплексы с металлом M; обозначим при этом константы диссоциации соответственно через K_{0f} и K_{0b}. Тогда

$$K_{0f} = \frac{s_f a}{q_f}, \tag{IX.86}$$

$$K_{0b} = \frac{s_b a}{q_b}, \tag{IX.87}$$

где a — концентрация *свободных* ионов металла; s_f и s_b — концентрации свободных S_f и S_b; q_f и q_b — концентрации соответственно MS_f и MS_b.

Общие концентрации субстратов будут равны

$$s_{ft} = s_f + q_f, \tag{IX.88}$$

$$s_{bt} = s_b + q_b. \tag{IX.89}$$

K_t — «кажущаяся» константа равновесия, выраженная через *общие* концентрации добавленных субстратов, — по определению равна

$$K_t = \frac{s_{bt}}{s_{ft}}. \tag{IX.90}$$

Подставляя в это выражение уравнения (IX.85)—(IX.89), получаем

$$K_t = K \frac{\left(1 + \frac{a}{K_{0b}}\right)}{\left(1 + \frac{a}{K_{0f}}\right)}. \tag{IX.91}$$

Это уравнение показывает, как изменяется константа равновесия при изменении концентрации свободного иона металла; оно показывает, что если K_{0f} отличается от K_{0b}, то «кажущаяся» константа равновесия будет отличаться от истинной константы, определяемой в отсутствие металла. Экстраполируя K_t до $a = 0$, можно определить величину K. Для этого строят график зависимости между определенными экспериментально значениями константы равновесия и *общей* концентрацией добавленного металла a_t. Из уравнения

$$a_t = a + q_f + q_b \tag{IX.92}$$

и предыдущих уравнений находим следующее кубическое уравнение, из которого может быть определено значение a:

$$a^3 + a^2(K_{0f} + K_{0b} + s_{ft} + s_{bt} - a_t) + a(K_{0f}K_{0b} + K_{0f}s_{bt} + K_{0b}s_{ft} - K_{0f}a_t - K_{0b}a_t) - K_{0f}K_{0b}a_t = 0. \quad \text{(IX.93)}$$

Решив это уравнение, можно подставить полученное значение a в уравнение (IX.91).

Уравнения значительно упрощаются в том случае, если только s_f соединяется с металлом, так что K_{0b} можно принять равным бесконечности. Тогда уравнение (IX.91) принимает вид

$$K_t = \frac{K}{\left(1 + \frac{a}{K_{0f}}\right)} \quad \text{(IX.94)}$$

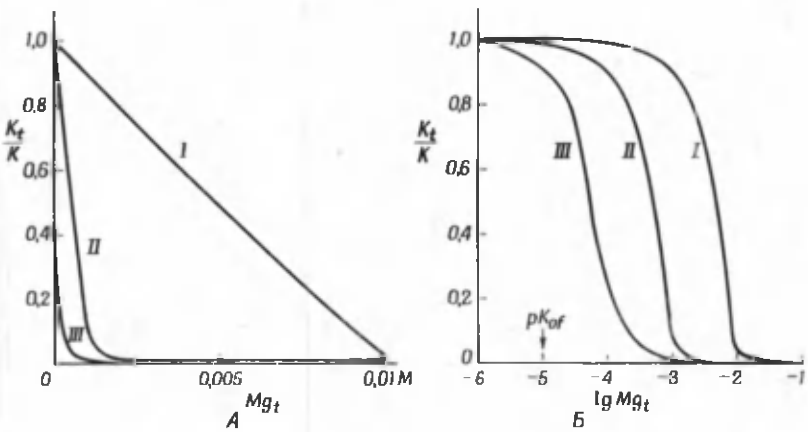
и (IX.93) сокращается до квадратного уравнения

$$a^2 + a(K_{0f} + s_{ft} - a_t) - K_{0f}a_t = 0, \quad \text{(IX.95)}$$

следовательно,

$$K_t = K \cdot \frac{2K_{0f}}{K_{0f} + a_t - s_{ft} + \sqrt{\{(K_{0f} + s_{ft} - a_t)^2 + 4K_{0f}a_t\}}}. \quad \text{(IX.96)}$$

Можно ожидать, что это уравнение будет удовлетворительно характеризовать действие многих киназ. Например, в опытах с креатинкиназой определения величин сродства, проведенные Олберти, показали, что АТФ имеет



Фиг. 123. Теоретические кривые, характеризующие зависимость между концентрацией добавленных ионов магния (A) или логарифмом этой концентрации ($Б$) и константой равновесия при различных концентрациях субстрата.

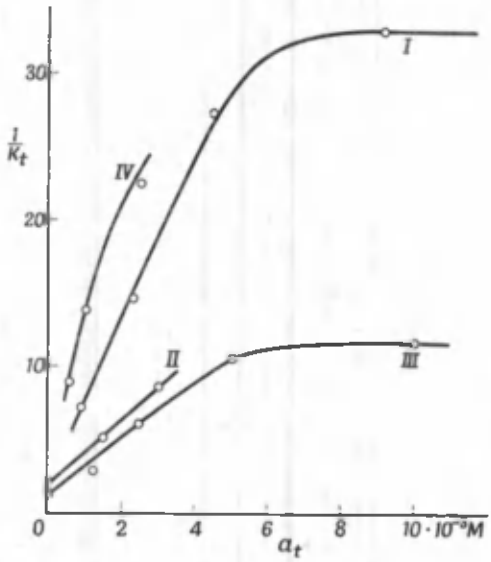
Графики построены по уравнению (IX. 96). K_{of} принято равным 10^{-5} M. I — $s_{ft} = 0{,}01\ M$; II — $s_{ft} = 0{,}001\ M$; III — $s_{ft} = 0{,}0001\ M$.

значительно большее сродство к Mg^{2+}, чем какой-либо другой компонент системы (хотя при точных расчетах величиной сродства АДФ также нельзя пренебречь). Соединением с другими компонентами, например с креатинфосфатом, можно обычно полностью пренебречь. Имея в виду киназы, мы построили, согласно уравнению (IX.96), кривые, приведенные на фиг. 123; K_{of} в этом случае принято равным 10^{-5} M, что соответствует последним полученным данным.

Из фиг. 123 видно, что влияние умеренных концентраций Mg^{2+} на K_t очень велико и такого рода эффекты играют весьма важную роль в подобных

системах. Влияние данной концентрации металла зависит от концентрации субстрата и уменьшается с повышением этой последней. При низкой концентрации субстрата график, на котором по оси абсцисс отложены логарифмы концентрации металла, представляет собой обычную S-образную кривую, точка перегиба которой соответствует pK_{0f}. При более высоких концентрациях субстрата форма кривой искажается, потому что субстрат более эффективно противодействует влиянию металла при относительно низких концентрациях последнего и точка перегиба кривой значительно смещается.

Подобные кривые, которые следует рассматривать только как первое приближение, можно сопоставить с экспериментальными кривыми, получен-



Фиг. 124. Зависимость константы равновесия реакции, катализируемой креатинкиназой, от общей концентрации активирующего металла (a_t) [93].
I — Mg^{2+} при pH 8,45 в глициновом буфере; *II* — Mg^{2+} при pH 8,8 в глициновом буфере; *III* — Mg^{2+} при pH 8,8 в этаноламиновом буфере; *IV* — Mn^{2+} при pH 8,45 в глициновом буфере.

$$K_t = \frac{[\text{АТФ}]_t\,[\text{Креатин}]_t}{[\text{АДФ}]_t\,[\text{Креатинфосфат}]_t}.$$

ными для системы креатинкиназы Нода и др. [1982] и Асконасом [93]. Данные Асконаса приведены на фиг. 124. Характер полученных в эксперименте кривых в общем согласуется с нашими теоретическими кривыми, если не считать того, что при увеличении концентрации металла величина $1/K_t$ становится постоянной, а не возрастает до бесконечности, как предсказывается простой теорией. Этого, впрочем, и следовало ожидать, потому что при высоких концентрациях металла не только АТФ, но и АДФ соединяется с Mg^{2+}. Когда концентрация металла становится достаточно большой для насыщения и АТФ и АДФ, дальнейшее повышение его концентрации уже не оказывает влияния на константу равновесия.

Неспецифическое влияние анионов

Как впервые показал Кол [478] в 1904 г., значительное влияние на активность ряда ферментов оказывает присутствие анионов; например, влияние хлорид-иона на α-амилазы животных тканей столь велико, что этот ион рассматривается как естественный активатор данной группы ферментов.

Другие одновалентные (но не двухвалентные) анионы также оказывают некоторое влияние на активность амилаз, причем параллельно изменяются и физические свойства чистого фермента, например растворимость и электрофоретическая подвижность [1905]. Другим классическим примером фермента, чувствительного к анионам, может служить фумаратгидратаза, как это впервые показали Манн и Вулф [1706]; этот фермент активируется, однако, только двухвалентными и трехвалентными анионами. При обычных концентрациях влияние анионов на большинство ферментов незначительно.

Исследование влияния анионов при различных значениях pH показывает, что оно может сводиться к смещению одной или обеих ветвей кривой зависимости скорости реакции от pH, другими словами — к действительному или «кажущемуся» изменению величин констант ионизации K_{es1} и K_{es2} (см. гл. IV, раздел В), которые определяют форму обеих ветвей этой кривой.

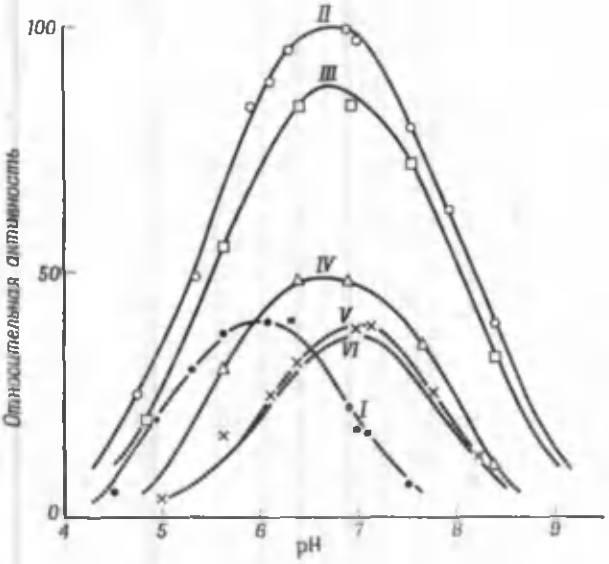
Фиг. 125 показывает результаты, полученные Мирбеком [1912] в опытах с амилазой слюны, а фиг. 126— результаты Массей [1744], полученные с кристаллической фумаратгидратазой. Как и следовало ожидать, соединение фермента с отрицательно заряженными ионами всегда приводит к смещению кривой вправо; при этом может изменяться форма либо одной из ветвей pH-кривой, либо обеих ее ветвей.

При действии ионов хлора и брома на амилазу и ионов фосфата, арсената, цитрата и некоторых других ионов на фумаратгидратазу изменяется только K_{es2}, так что влияние сказывается только на правой ветви кривой. Это означает активацию процесса, в особенности при щелочных значениях pH, и сдвиг оптимума pH в щелочную сторону. В то же время действие ионов хлора на фумаратгидратазу отражается только на левой ветви кривой; реакция тормозится при кислых значениях pH и сниженный оптимум pH также смещается, однако по-прежнему в щелочную сторону. Действие ионов иода, нитрата и хлората отражается на обеих ветвях pH-кривой для амилазы, так что смещается вся кривая целиком; это эквивалентно торможению процесса в кислой зоне и активации в щелочной зоне, вследствие чего максимальная скорость изменяется лишь незначительно.

Результаты, полученные в опытах с фумаратгидратазой, Массей объясняет присоединением аниона к основной группе, расположенной рядом с одной из двух ионизирующихся групп в активном центре, которые определяют форму pH-кривой. Не имеет значения, какова природа этой ионизирующейся группы активного центра, т. е. является ли она кислой или основной, так как уменьшение положительного заряда соседнего участка и в том и в другом случае будет увеличивать pK ионизирующейся группы и сдвигать кривую титрования в щелочную сторону.

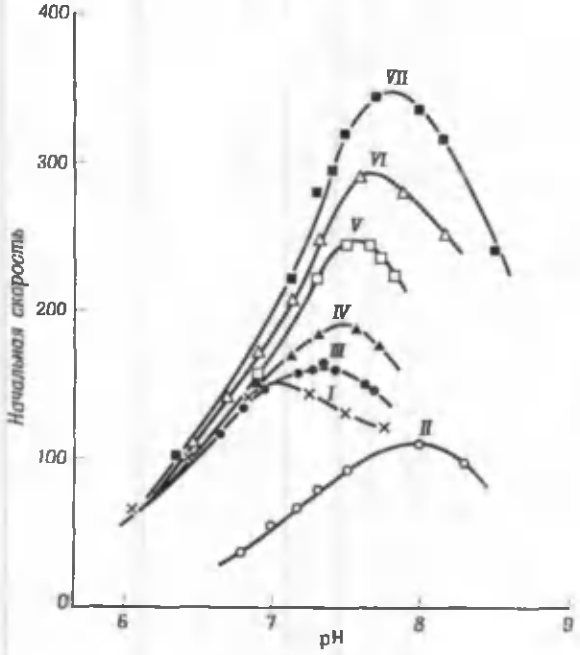
Не все случаи активации анионами можно объяснить влиянием анионов на зависимость скорости реакции от pH. Так, например, Уэбб и Морроу [2809] показали, что хлорид-ион и некоторые другие одновалентные ионы резко стимулируют катализируемый арилсульфатазой B гидролиз *n*-нитрофенилацетата (однако не со всеми субстратами наблюдается такой эффект). Графики зависимости скорости реакции от pH в присутствии и в отсутствие хлорида идентичны по своей форме и положению и отличаются только высотой. Хлорид не оказывает влияния на сродство фермента к *n*-нитрофенилацетату, так что, по всей вероятности, в данном случае он влияет непосредственно на k_{+2}.

Олберти [32] предложил общую математическую теорию влияния солей, входящих в состав буферных растворов, на зависимость максимальной скорости реакции и эффективной константы Михаэлиса от pH. Этот анализ был проведен при допущении, что все виды взаимодействия с ферментом *осуществляются достаточно быстро по сравнению с образованием продукта*. Равновесия, рассмотренные Олберти, могут быть представлены следующими



Фиг. 125. Активация α-амилазы слюны (3.2.1.1) анионами как функция pH [1912].

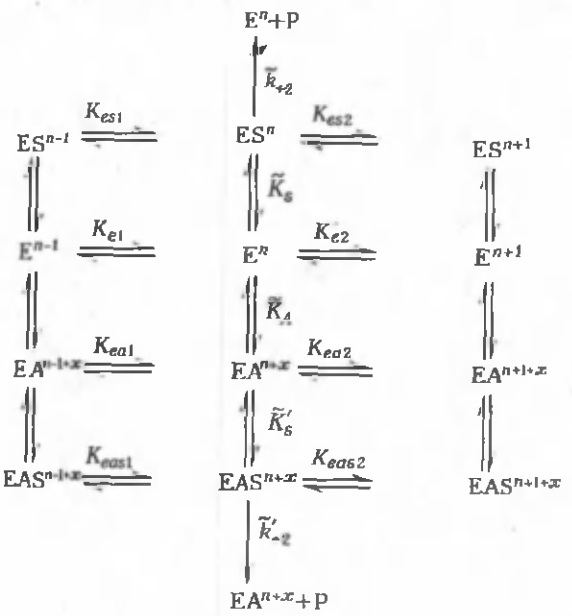
I — без добавления анионов (за исключением фосфата); *II* — ион хлора (0,005 *M* или 0,04 *M*); *III* — ион брома (0,04 *M*); *IV* — ион иода (0,04 *M*); *V* — ион нитрата (0,1 *M*); *VI* — ион хлората (0,1 *M*). Во всех случаях концентрация фосфата 0,03 *M*.



Фиг. 126. Активация фумаратгидратазы (4.2.1.2) анионами как функция pH [1744].

I — без добавления анионов; *II* — ион хлора (0,1 *M*); *III* — ион селената (0,03 *M*) или сульфата (0,025 *M*); *IV* — ион арсенита (0,01 *M*); *V* — ион цитрата (0,01 *M*); *VI* — ион фосфата (0,06 *M*); *VII* — ион арсената (0,05 *M*).

уравнениями (обозначения те же, какие мы использовали выше):



(IX.97)

где K_s, как и в гл. IV,— не зависящая от pH константа равновесия, определяемая уравнением (IV.169); $\tilde{K}'_s$ — соответствующая константа для соединения с субстратом комплекса EA; n, как и раньше,— число отрицательных зарядов активной формы фермента; x — число отрицательных зарядов аниона. Параметр x введен для того, чтобы показать истинную величину заряда комплексов, но эта величина не участвует в расчетах. Нет необходимости обсуждать равновесия, для которых на схеме не указаны константы равновесия, так как последние являются производными констант, приведенных на схеме.

Олберти получил выражения для V и K_m в присутствии аниона, концентрация которого равна a.

Выражение для V имеет следующий вид:

$$V = \frac{\tilde{k}_{+2}e + \tilde{k}'_{+2}e \cdot \frac{a\tilde{K}_s}{\tilde{K}_A\tilde{K}'_s}}{\left(1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}\right) + \frac{a\tilde{K}_s}{\tilde{K}_A\tilde{K}'_s}\left(1 + \frac{H}{K_{eas1}} + \frac{K_{eas2}}{H}\right)}. \qquad (IX.98)$$

В отсутствие аниона ($a=0$) приведенное выше уравнение сокращается до

$$V = \frac{\tilde{k}_{+2}e}{1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}}. \qquad (IX.99)$$

Это последнее уравнение идентично уравнению (IV.159), рассмотренному при анализе влияния pH на ферментативную реакцию.

В то же время при очень высокой концентрации аниона уравнение (IX.98) сокращается до

$$V = \frac{\tilde{k}'_{+2}e}{1 + \frac{H}{K_{eas1}} + \frac{K_{eas2}}{H}}. \qquad (IX.100)$$

Следовательно, когда фермент насыщен анионом, получается новая кривая зависимости скорости реакции от pH, определяемая константами комплекса EAS.

Уравнение (IX.98) удобно выразить через pH-функцию f^- (уравнение IV.133), относительные концентрации (ср. с уравнением IV.13) и относительную константу активации $\tilde{r} = \frac{\tilde{K}_s}{K_s'}$ (ср. с уравнением IV.49). При этом получаем

$$V = \frac{\bar{k}_{+2e} + \bar{k}_{+2ea}\tilde{r}}{f_{es}^- + \alpha \tilde{r} f_{eas}^-}. \qquad \text{(IX.101)}$$

Выражение Олберти для K_s эквивалентно следующему выражению:

$$K_s = \tilde{K}_s \cdot \frac{\left(1 + \frac{H}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{H}\right) + \frac{a}{\tilde{K}_A}\left(1 + \frac{H}{K_{ea1}} + \frac{K_{ea2}}{H}\right)}{\left(1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}\right) + \frac{a\tilde{K}_s}{\tilde{K}_A \tilde{K}_s'}\left(1 + \frac{H}{K_{eas1}} + \frac{K_{eas2}}{H}\right)}. \qquad \text{(IX.102)}$$

Если ввести f^- и α, то получим

$$K_s = \tilde{K}_s \frac{f_e^- + \alpha f_{ea}^-}{f_{es}^- + \alpha \tilde{r} f_{eas}^-}. \qquad \text{(IX.103)}$$

В отсутствие аниона, когда $\alpha = 0$,

$$K_s = \tilde{K}_s \frac{f_e^-}{f_{es}^-}. \qquad \text{(IX.104)}$$

Если $f_s = 1$, то уравнение (IX. 104) оказывается тождественным уравнению (IV.170), поскольку сделано допущение, что субстрат не ионизируется. При высокой концентрации аниона K_s достигает предельного значения, определяемого выражением

$$K_s = \tilde{K}_s \frac{f_{ea}^-}{\tilde{r} f_{eas}^-}. \qquad \text{(IX.105)}$$

Олберти рассмотрел некоторые дополнительные осложнения, возникающие в том случае, когда анион конкурирует с субстратом и одновременно активирует фермент или когда помимо аниона присутствует еще и конкурентный ингибитор. Полученные им уравнения в общем согласуются с данными по влиянию фосфата на фумаратгидратазу, приведенными в более ранней работе.

Теорелл и др. [3000] определили влияние анионов на шесть констант скорости, соответствующих отдельным стадиям реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой печени. Они нашли, например, что Cl^- в концентрации 0,15 *M* понижает скорость соединения фермента с окисленным и восстановленным НАД примерно наполовину, удваивает скорость диссоциации комплекса фермента с восстановленным коферментом и в 2 раза снижает скорость диссоциации комплекса фермента с окисленным коферментом.

ЛИПОФИЛЬНЫЕ ИОНЫ

Некоторые ферменты, действующие на водонерастворимые нейтральные вещества, активируются отрицательно заряженными липофильными молекулами. Наиболее хорошо изучена в этом отношении лизофосфолипаза из *Penicillium* (3.1.1.5). Она эффективно действует на лизофосфоглицериды, но не действует на лецитин, если только не добавлен фосфатидилинозит или анионные детергенты, например додецилсульфат натрия или же дицетилфосфат натрия [155]. Влияние анионных детергентов не обусловлено увеличением поверхности вследствие образования эмульсии, так как аналогичное влияние наблюдается и при действии фермента на монослои субстрата [156].

Присутствие поливалентных катионов и катионных детергентов предотвращает активацию. Было показано, что фермент атакует субстрат только в том случае, если отрицательный электрокинетический потенциал его мицелл превосходит определенную критическую величину.

Полинуклеотидные матрицы

Ряд ферментов, катализирующих синтез белков или нуклеиновых кислот, нуждается в кофакторах другого типа, а именно в матрицах, определяющих последовательность чередования единиц в образующейся цепи. В системах, синтезирующих нуклеиновые кислоты (детально эти системы рассматриваются в гл. XI), полинуклеотидные цепи синтезируются ферментом из смеси нуклеозидтрифосфатов, так что в процессе синтеза освобождается пирофосфат. Последовательность, в которой различные нуклеотиды соединяются друг с другом, определяется последовательностью нуклеотидов в матрице, и образующаяся цепь оказывается комплементарной по отношению к матричной цепи. В системах этого типа кофактор-матрица обусловливает специфичность по отношению к нереагирующей части молекулы субстрата, т. е. к тем или иным пуринам и пиримидинам, а фермент определяет характер синтезируемой цепи.

Различие между простетической группой, коферментом и субстратом

От внимания читателя, вероятно, не ускользнуло то обстоятельство, что не всегда мы имеем возможность провести четкое различие между простетической группой, образующей часть фермента, коферментом, существующим самостоятельно, но вместе с тем образующим часть каталитического механизма, и субстратом, который есть не что иное, как просто реагент в катализируемой ферментом реакции. Можно сослаться на целый ряд случаев, в которых обнаруживается постепенный переход от простетической группы в строгом смысле слова через коферменты к истинным субстратам. У пероксидазы (1.11.1.7), например, гем-группа, несомненно, является простетической; такое же место эта группа занимает и у дрожжевой лактатдегидрогеназы (1.1.2.3), где она действует как переносчик, подвергаясь восстановлению и окислению. По-видимому, не имеется оснований для проведения различия между такими группами и прочно связанной флавиновой группой флавопротеидных ферментов (например, липоамиддегидрогеназы (1.6.4.3)), которая также действует как переносчик. Та же самая группа (ФАД) имеется и у оксидазы D-аминокислот (1.4.3.3), у которой она тоже выполняет функцию переносчика; но здесь она менее прочно связана с белком, и потому ее иногда называют коферментом. Различие, однако, определяется только величиной константы диссоциации и не является принципиальным; среди флавопротеидных ферментов имеется много таких, у которых константа диссоциации занимает промежуточное положение между очень низкой константой липоамиддегидрогеназы и достаточно высокой константой оксидазы D-аминокислот. Последний фермент подобен глутаматдегидрогеназе (1.4.1.2), при действии которой аминокислота окисляется не флавинадениндинуклеотидом, а НАД. Сходство в особенности велико потому, что оба непосредственных окислителя очень близки по химическому строению; вместо изоаллоксазиновой группы в качестве окислителя выступает никотинамидная группа.

При рассмотрении действия дегидрогеназ становится совершенно ясным, что каждый из ферментов этой группы катализирует бимолекулярную реак-

цию между аминокислотой или другим субстратом и НАД и что НАД в этой реакции, по существу, является таким же субстратом, как аминокислота или другое соответствующее соединение, участвующее в реакции. Существование других ферментов, окисляющих НАД·H_2, что дает уже систему, в которой НАД действует как кофермент, не влияет на сделанный выше вывод, пока мы рассматриваем отдельные дегидрогеназы. Следовательно, НАД может считаться субстратом фермента с ничуть не меньшим основанием, чем любой другой субстрат, действующий как переносчик. В табл. 46, например, глиоксилат и НАД выполняют совершенно одинаковую функцию, и проводить между ними различие, в сущности, нет никаких оснований. Так же обстоит дело и с глутаматом в реакции переаминирования; он, несомненно, играет здесь роль субстрата.

Таким образом, существует ряд переходов, и провести какую-либо четкую границу оказывается очень трудно.

Высказывалось предположение, что прочность соединения с ферментом могла бы быть использована в качестве критерия при решении вопроса о том, можно ли приписать данному веществу функцию простетической группы. Это, однако, вряд ли осуществимо. У многих субстратов сродство по отношению к их ферментам значительно выше, нежели у ряда веществ, которые рассматриваются как простетические группы ферментов. В серии флавопротеидов было бы трудно решить, где именно следует провести разграничительную линию; было бы, например, совершенно нелогично установить произвольную границу и считать, что ФАД во флавопротеиде ведет себя как простетическая группа, если его константа диссоциации равна $0{,}8 \cdot 10^{-3}$ M, и как кофермент, если она равна $1{,}2 \cdot 10^{-3}$ M!

Имеется, однако, одно определенное различие между типичными простетическими группами и переносчиками, такими, как НАД. Истинная простетическая группа осуществляет весь цикл, будучи присоединенной к одной и той же молекуле фермента; переносчик же типа НАД должен мигрировать от одного фермента к другому, для того чтобы выполнить свою каталитическую функцию. Если НАД соединится с глутаматдегидрогеназой, то он может быть восстановлен глутаматом, однако до тех пор, пока он остается присоединенным к молекуле этого фермента, с ним больше ничего не может произойти. Он должен покинуть этот фермент и перейти на другой, где он будет окислен, и только таким путем он может осуществить свою каталитическую функцию. Простетическая же группа, такая, как в глюкозооксидазе (1.1.3.4), восстанавливается и окисляется, будучи присоединенной к одной и той же молекуле фермента.

Если по этому принципу провести различие между простетическими группами и субстратами, то, исходя из тех сведений, которыми мы располагаем в настоящее время, гемы, флавины, биотин и пиридоксальфосфат придется отнести к простетическим группам, а НАД, НАДФ и т. д.— к субстратам-переносчикам.

ГЛАВА X

СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты могут быть в общем виде охарактеризованы как белковые вещества, имеющие в своем составе особую структуру — так называемый *активный центр*, а в некоторых случаях еще дополнительно и *простетическую группу*. Поэтому вопрос о строении ферментов тесно связан с вопросом о строении самого белка, и складывается он из нескольких основных пунктов, каждый из которых включает ряд частных вопросов:

1. Строение белка:

а) размер (молекулярный вес);

б) число пептидных цепей и последовательность аминокислот;

в) упаковка и расположение пептидных цепей в молекуле фермента (третичная структура).

2. Природа активного центра:

а) число активных центров в молекуле;

б) химическая природа субстратсвязывающих и активирующих групп, присутствующих в активном центре.

3. Структура простетической группы (в том случае, если она имеется) и способ присоединения этой группы к белку.

Структура известных простетических групп уже рассматривалась в предшествующей главе.

Молекулярный вес

Молекулярные веса чистых ферментов могут быть определены теми же физическими методами, которые были разработаны для определения молекулярного веса белков вообще. Мы не будем описывать эти методы подробно, поскольку соответствующие данные читатель может найти в другом месте [481]. В табл. 30 приведен довольно полный перечень тех ферментов, для которых известен молекулярный вес. По большей части в литературе указывается только одно значение молекулярного веса, и мы его приводим. В ряде случаев, однако, опубликовано несколько несовпадающих значений, и, вместо того чтобы приводить их все, мы даем только наиболее характерные, учитывая при этом достоверность метода, с помощью которого эти величины были получены, и отдавая предпочтение величинам, рассчитанным на основании констант седиментации и диффузии. При использовании разных методов часто получают несовпадающие результаты. То же получается, когда разные исследователи используют один и то же метод и даже когда один исследователь, пользующийся все время только одной методикой, работает с разными приборами. Укажем, например, что значения констант седиментации, полученные в ультрацентрифуге типа Сведберга, приблизительно на 10% выше значений, полученных в ультрацентрифуге системы Спинко, вследствие того, что в первой из этих ультрацентрифуг трудно контролировать температуру [1675]; между тем это различие во многих случаях не учи-

Таблица 30

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕСА ФЕРМЕНТОВ

Фермент	Молекулярный вес
Гидрогеназа (1.98.1.1) (*Desulphovibrio*)	9 000
Рибонуклеаза *Aspergillus oryzae* (3.1.4.8)	11 000
Целлюлаза (3.2.1.4) (*Polyporus*)	11 400
Рибонуклеаза (2.7.7.16)	12 700
Ацилфосфатаза (3.6.1.7) (мозг быка)	13 000
γ-Химотрипсин (3.4.4.5)	15 000—25 000
α-Амилаза (3.2.1.1) (*B. stearothermophilus*)	15 500
Мурамидаза (3.2.1.17) (яичный белок)	17 000
Папаин (3.4.4.10)	20 700
Аденилаткиназа (2.7.4.3)	21 000
α-Химотрипсин (3.4.4.5)	23 000
Химотрипсин B (3.4.4.6)	22 500
β-Химотрипсин (3.4.4.5)	23 000
Трипсин (3.4.4.4)	23 800
Фосфоглицерат-фосфомутаза (5.4.2.1) (зародыши пшеницы и риса)	~30 000
Полиметафосфатаза (3.6.1.10)	33 000
Карбоангидраза (4.2.1.1) (эритроциты человека)	34 000
Пероксидаза (1.11.1.7) (репа)	34 000—41 000
Карбоксипептидаза A (3.4.2.1)	34 300
Карбоксипептидаза B (3.4.2.2) (ткани свиньи)	34 300
Пепсин (3.4.4.1)	35 000
Тиосульфат-сульфидтрансфераза (2.8.1.1)	37 000
Пероксидаза (1.11.1.7) (хрен)	40 000
Ренин (3.4.4.3)	40 000
НАД-H_2 : цитохром-b_5-редуктаза (1.6.2.2) (печень теленка)	40 000
Стероид-Δ-изомераза (5.3.3.1) (*Pseudomonas*)	40 800
α-Химотрипсин (3.4.4.5) (димер)	42 900
Химопапаин (3.4.4.11)	45 000
α-Амилаза (3.2.1.1) (поджелудочная железа)	45 000
Глюкозофосфат-изомераза (5.3.1.9) (молочная железа коровы)	48 000
α-Амилаза (3.2.1.1) (*Bacillus subtilis*)	48 700
Менадионредуктаза (1.6.5.2) (печень быка)	52 000
Малатдегидрогеназа (1.1.1.37) (гомогенат сердца быка, надосадочная жидкость)	52 000
Пероксидаза (1.11.1.7) (редька японская)	55 000
Цитрат-синтаза (4.1.3.7) (сердце свиньи)	56 000
Катепсин D (3.4.4.b) (селезенка быка)	56 000
Фосфоглицеромутаза (2.7.5.3) (мышца кролика)	57 000
α-Амилаза (3.2.1.1) (солод)	59 000
Глутатионредуктаза (1.6.4.2) (горох)	60 000
Оксидаза L-аминокислот (1.4.3.2) (змеиный яд)	61 600
Малатдегидрогеназа (1.1.1.37) (митохондрии сердца быка)	62 000
Дезоксирибонуклеаза (3.1.4.5)	63 000
Неорганическая пирофосфатаза (3.6.1.1)	63 000
Фосфопируват-гидратаза (4.2.1.11) (дрожжи)	64 000
Изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42) (сердце)	64 000
Мио-инозитол-оксигеназа (1.99.2.6) (почка крысы)	68 000
Фосфоглюкомутаза (2.7.5.1)	74 000—78 000

Продолжение табл. 30

Фермент	Молекулярный вес
НАДФ·H_2-цитрохром-*c*-редуктаза (1.6.2.3) (дрожжи)	75 000
НАД·H_2-цитрохром-*c*-редуктаза (1.6.2.1) (ткани животных)	75 000—80 000
Фосфопируват-гидратаза (4.2.1.11) (мышца кролика)	80 000
Катехол-1,2-оксигеназа (1.99.2.2) (*Pseudomonas*)	~80 000
Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1)	75 000—80 000
Креатинкиназа (2.7.3.2)	81 000
Пероксидаза (1.11.1.7) (молоко)	82 000
Алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) (печень)	84 000
Гексокиназа (2.7.1.1) (дрожжи)	96 600
Уратоксидаза (1.7.3.3)	100 000
Катехолоксидаза (1.10.3.1)	100 000
Люцифераза (светляки)	100 000
Липоамиддегидрогеназа (1.6.4.3) (сердце свиньи)	100 000
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1) (кишечник теленка)	~100 000
Липоксигеназа (1.99.2.1) (соя)	102 000
Плазмин (3.4.4.14) (активируется глицерином; кровь человека)	108 000
Клостридиопептидаза А (3.4.4.19) (*Clostridium*)	109 000
Аспартат-аминотрансфераза (2.6.1.1) (сердце свиньи)	110 000
Липоамиддегидрогеназа (1.6.4.3) (*E. coli*)	112 000
Фосфоглицеромутаза (2.7.5.3) (дрожжи)	112 000
n-Дифенолоксидаза (1.10.3.2) (*Rhus vernicifera*)	120 000
Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12) (дрожжи)	122 000
Оксидаза L-аминокислот (1.4.3.2) (животные)	130 000
Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27) (сердце)	135 000
Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12) (мышца)	137 000
Гликолатоксидаза (1.1.3.1) (шпинат)	140 000
Транскетолаза (2.2.1.1) (дрожжи)	140 000
Аргиназа (3.5.3.1)	~140 000
Глюкозофосфат-изомераза (5.3.1.9) (дрожжи)	145 000
Аскорбатоксидаза (1.10.3.3)	146 000—150 000
Альдолаза (4.1.2.b) (мышца)	147 000—180 000
Бутирил-КоА-дегидрогеназа (1.3.2.1)	150 000—200 000
Глюкозооксидаза (1.1.3.4) (*Penicillium*)	150 000—152 000
β-Амилаза (3.2.1.2) (батат)	152 000
Алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) (дрожжи)	151 000
Альдолаза (4.1.2.7) (печень)	159 000
Лактатдегидрогеназа (1.1.2.3) (дрожжи)	170 000
Оксидаза D-аминокислот (1.4.3.3) (почки свиньи)	182 000
Гомосериндегидратаза (4.2.1.15) (печень крысы)	~200 000
Сукцинатдегидрогеназа (1.3.99.1) (сердце)	~200 000
Фумаратгидратаза (4.2.1.2) (сердце)	204 000
Еноил-КоА — гидратаза (4.2.1.17) (печень)	210 000
Аспартат-карбамоилтрансфераза (2.1.3.2) (*E. coli*)	220 000
Каталаза (1.11.1.6) (печень лошади)	225 000
АТФ-аза (3.6.1.3) (миозин, сердце собаки)	230 000
Каталаза (1.11.1.6) (бактерии)	232 000
α-Глюканфосфорилаза (2.4.1.1) (печень)	237 000
Пируваткиназа (2.7.1.40)	237 000
Каталаза (1.11.1.6) (печень быка)	248 000

Продолжение табл. 30

Фермент	Молекулярный вес
α-Глюканфосфорилаза *b* (мышца)	250 000
Глицеролкиназа (2.7.1.30) (дрожжи)	251 000
Пируватдегидрогеназа (1.2.4.1) (*E. coli*)	265 000
Ксантиноксидаза (1.2.3.2) (молоко)	290 000
АМФ-дезаминаза (3.5.4.6) (мышца кролика)	320 000
Уреаза (3.5.1.5) (бобы сои)	480 000
α-Глюканфосфорилаза *a* (2.4.1.1) (мышца)	495 000
АТФ-аза (3.6.1.3) (миозин, мышца кролика)	540 000
Фосфокетолаза (4.1.2.9) (*Lactobacillus*)	550 000
Пропионил-КоА—карбоксилаза (6.4.1.3) (сердце свиньи)	700 000
Глутаматдегидрогеназа (1.4.1.3) (печень)	1 000 000
Пируватдекарбоксилаза (4.1.1.1) (зародыш пшеницы)	>1 000 000

тывается. Таким образом, читатель должен помнить, что данные, приведенные в табл. 30, отнюдь не одинаковы по степени своей точности.

Значения молекулярных весов ферментов колеблются в широких пределах: от 10 000 до 1 000 000; самые мелкие молекулы активных ферментов, найденные в живой природе, имеют молекулярный вес не менее 9000. Мелкие молекулы относительно термостабильны; рибонуклеазу с молекулярным весом 12 700 можно, например, кипятить в кислом растворе и при этом она не теряет своей активности.

Большинство ферментов, перечисленных в табл. 30, образуют монодисперсные растворы, если судить по результатам их анализа в ультрацентрифуге. Однако иногда молекулы фермента с большим молекулярным весом спонтанно (и обратимо) диссоциируют на две или четыре равные части; такое же превращение могут испытывать и некоторые белки, не обладающие ферментативными свойствами. Присутствие в белковом растворе двух разных форм белковых молекул может быть продемонстрировано с помощью ультрацентрифуги; они обнаруживаются по наличию двух пиков или одного асимметрического пика, а также по зависимости, которая существует между константой седиментации и концентрацией белка [834].

В природе довольно обычны такие формы ферментов, у которых молекулы состоят из небольшого числа одинаковых субъединиц, часто из двух, трех или четырех. В некоторых случаях эти молекулы спонтанно диссоциируют при разбавлении; в других случаях они удерживаются вместе с помощью малых молекул (простетические группы, коферменты или субстраты) и распадаются только после удаления этих последних. Иногда разделение субъединиц оказывается возможным лишь при каком-нибудь более сильном воздействии, например в концентрированных растворах мочевины. Мономерные формы могут обладать ферментативной активностью, но могут быть и неактивными.

Сказанное можно проиллюстрировать несколькими примерами. α-Химотрипсин при определенных концентрациях присутствует в растворе в виде димера, но при разбавлении раствора он обратимо диссоциирует и переходит в активную мономерную форму с молекулярным весом 23 000. При высоких концентрациях фермента в растворе образуется тример [2170]. Гликолатоксидаза из шпината существует в растворе в двух формах, имеющих молекулярный вес 140 000 и 270 000. Эти две формы в растворах с низкой ионной силой быстро переходят одна в другую, но в растворах с высокой ионной силой их можно отделить друг от друга. Форма, имеющая меньший молекулярный вес, не содержит флавина и не обладает ферментативной активностью, однако ее можно реактивировать добавлением ФМН. Форма с более

высоким молекулярным весом содержит флавин (по четыре группы на молекулу) и обнаруживает значительную активность (без добавления ФМН). Удельная активность первой формы (после добавления ФМН) едва достигает $^1/_3$ удельной активности второй формы. Оксидаза D-аминокислот — флавопротеид, характеризующийся сравнительно низким сродством к ФАД, — существует в виде ряда полимерных форм, состоящих из единиц с молекулярным весом 45 700; каждая из этих единиц может соединяться с одной флавиновой группой. Разбавление раствора вызывает диссоциацию молекул фермента на мономеры. При определенных (средних) концентрациях белка ФАД благоприятствует образованию тетрамера [437].

Пример с дрожжевой алкогольдегидрогеназой, которая диссоциирует на четыре субъединицы при удалении четырех атомов цинка, уже обсуждался на стр. 274. α-Глюканфосфорилазы *a* и *b* из мышц образуют пару взаимопревращающихся белков. Активная фосфорилаза *a* имеет молекулярный вес 495 000, содержит четыре молекулы пиридоксальфосфата и может связать четыре молекулы АМФ на одну молекулу фермента. Фосфорилаза *b* неактивна, имеет молекулярный вес 242 000 и может связать две молекулы АМФ; в присутствии избытка Mg^{2+} она образует димер, способный кристаллизоваться [1362]. Превращение одной формы в другую происходит в результате химической реакции, катализируемой определенным ферментом; специфическая киназа катализирует присоединение двух фосфатных групп к молекуле фосфорилазы *b*, а фосфатаза — отщепление четырех фосфатных групп от молекулы фосфорилазы *a* [1459, 1460, 3003]. *n*-Хлормеркурибензоат также может вызвать диссоциацию фосфорилазы *a* [1674]. Глутаматдегидрогеназа печени при разбавлении диссоциирует на неактивные субъединицы; диссоциация усиливается при высоких концентрациях НАД·H_2, который связывается с некаталитическим участком. НАДФ·H_2, также играющий роль субстрата данного фермента, не связывается с этим участком молекулы и не вызывает диссоциации. Низкие концентрации окисленной и восстановленной форм любого из этих коферментов способствуют ассоциации, в результате которой образуется активная форма фермента [780]. Пропионил-КоА — карбоксилаза из сердца свиньи имеет молекулярный вес 700 000 и содержит четыре связанные молекулы биотина на одну молекулу фермента. В концентрированных растворах мочевины фермент диссоциирует на четыре неактивные субъединицы [1326].

Иногда между препаратами ферментов, выделенными из двух разных источников, существуют аналогичные соотношения, хотя здесь и не происходит взаимопревращения. Так, например, дрожжевую алкогольдегидрогеназу (молекулярный вес 151 000; четыре атома цинка на молекулу) можно сопоставить с алкогольдегидрогеназой печени (молекулярный вес 73 000; два атома цинка на молекулу). Подобное же явление встречается и у неферментных белков, например у таких хорошо известных белков, как гемоглобин (молекулярный вес 68 000; в составе молекулы четыре гема) и миоглобин (молекулярный вес 17 000; в составе молекулы один гем). Из числа ферментов можно еще указать фосфоглицеромутазу; фермент из дрожжей имеет молекулярный вес вдвое больше, чем фермент из мышц кролика, хотя удельная активность этих двух ферментов (на 1 *мг* белка) приблизительно одинакова [669].

Строение белка

ЧИСЛО ПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Имеется мало данных о том, сколько пептидных цепей со свободными концевыми группами содержится в молекулах различных ферментов. Концевые α-аминогруппы можно определить методом Сэнгера с помощью фтор-

динитробензола. Иногда аминокислоту, находящуюся на С-концевом участке цепи, можно идентифицировать, предварительно отщепив ее с помощью карбоксипептидазы; этот метод, однако, не так надежен, как метод Сэнгера: вследствие ограниченной специфичности карбоксипептидазы С-концевая аминокислота не во всех случаях отщепляется.

По-видимому, у большинства исследованных ферментов молекула состоит из одной пептидной цепи. Это справедливо для пепсина, трипсина, папаина, карбоксипептидазы А, мурамидазы, панкреатической α-амилазы и рибонуклеазы. Было, однако, показано, что молекулы двух ферментов, а именно α-химотрипсина и альдолазы из мышц кролика, содержат две пептидные цепи. У миозина концевые группы не были обнаружены. Ясно, что в описанных выше случаях, когда молекулы фермента обратимо диссоциируют на две или четыре части, более крупная молекула должна состоять по крайней мере из двух или четырех пептидных цепей.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ

До недавнего времени для анализа белков требовались относительно большие количества материала, в силу чего анализировались в основном неферментные белки. Поскольку чистые ферменты доступны лишь в относительно малых количествах, были разработаны микрометоды для определения аминокислотного состава белков. Однако детально проанализировано только небольшое число ферментов, полученных в кристаллическом состоянии. В табл. 31 представлены результаты полного анализа двадцати двух ферментов.

Эти анализы обнаруживают, что все представленные в таблице ферменты состоят только из аминокислот, обычных и для неферментных белков; исключение составляют ферменты, имеющие простетическую группу. Сумма значений аналитических данных для отдельных аминокислот соответствует (в пределах ошибки опыта) количеству исходного белка; таким образом, не остается места для каких-либо других компонентов, которым можно было бы приписать специфическую активность фермента. Не было обнаружено никаких особенностей, которые отличали бы ферменты от других белков, не обладающих ферментными свойствами. Фактически ферменты представляют собой смешанную группу типичных белков. Подобно любой другой случайно составленной группе белков, они заметно отличаются друг от друга, а это свидетельствует о том, что ферментативная активность не связана с какой-то особенностью аминокислотного состава, а также о том, что все ферменты не могут происходить от одного общего белкового предшественника.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АМИНОКИСЛОТ

Метод Сэнгера [2283, 2297], давший возможность полностью расшифровать структуру молекулы инсулина, может быть использован также и для определения последовательности аминокислот в молекулах различных ферментов. Однако установление последовательности аминокислот в молекуле фермента со средним молекулярным весом требует очень большой затраты труда. Поэтому из ферментов наиболее полно изучена рибонуклеаза — фермент со сравнительно небольшим молекулярным весом (12 700). В настоящее время последовательность аминокислот в молекуле рибонуклеазы окончательно выяснена [1109, 2458, 2479]. На фиг. 127 схематически изображена химическая структура рибонуклеазы, установленная в результате исследований Анфинсена и его группы, а также Хирса, Мура и Штейна. Вопрос о связи между структурой активного центра фермента и указанной последовательностью аминокислот будет обсуждаться на стр. 411.

Таблица 31

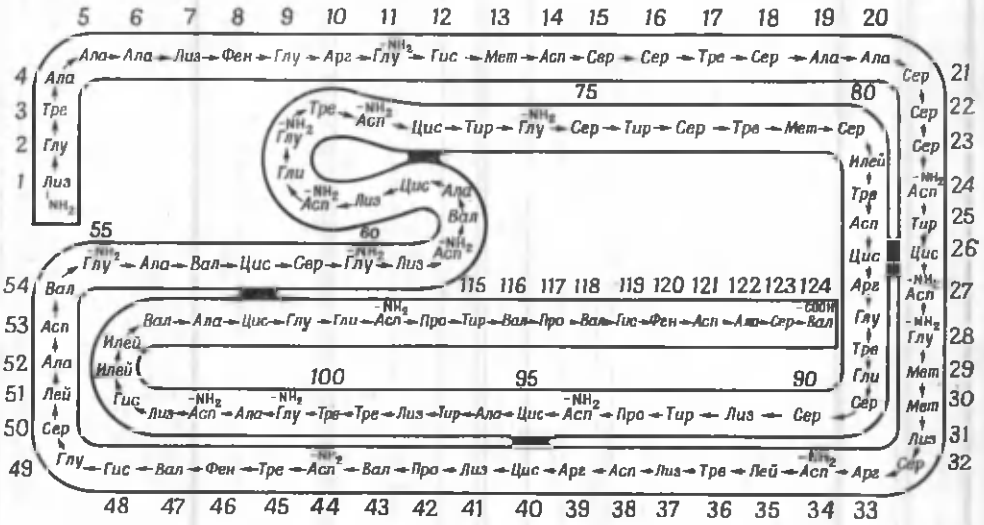
АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ [1])

	Алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) (дрожжи) [1513]	Лактатдегидрогеназа (1.1.2.3) (дрожжи) [84]	Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12) (мышцы кролика) [2727]	Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12) (дрожжи) [2729]	Каталаза (1.11.1.6) (печень быка) [2339]	Пероксидаза (1.11.1.7) (редька японская) [1882]	α-Глюкантрансфосфорилаза (2.4.1.1) (мышца кролика) [2730]	Креатинкиназа (2.7.3.2) (мышца кролика) [777]	Рибонуклеаза (2.7.7.16) (поджелудочная железа быка) [1110]	Дезоксирибонуклеаза (3.1.4.5) (поджелудочная железа быка) [819]	α-Амилаза (3.2.1.1) (слюна человека) [1906]	α-Амилаза (3.2.1.1) (*Aspergillus oryzae*) [2509]	α-Амилаза (3.2.1.1) (*Bacillus subtilis*) [1277]	α-Амилаза (3.2.1.1) (*B. stearothermophilus*) [389]	Мурамидаза (3.2.1.17) (белок яйца) [1578]	Мурамидаза (3.2.1.17) (селезенка кролика) [1282]	β-Галактозидаза (3.2.1.23) *E. coli* [2774]	Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) (ткани быка) [2449]	Пепсин (3.4.4.1) [3002]	Ренин (3.4.4.3) [2367]	Папаин (3.4.4.10) [2450]	Миозин (3.6.1.3) (мышцы кролика) [136]
Ала	6,6	4,6	6,7	7,3	4,3	10,4	4,9	3,2	7,7	4,9	4,4	5,9	5,3	4,8	5,8	8,3	5,4	5,2		3,1	5,6	6,5
Гли	5,9	4,1	6,1	4,9	3,3	0,8	3,8	5,4	1,6	3,1	6,8	5,7	6,0	4,2	5,7	6,0	4,4	5,1	6,4	5,2	8,4	1,9
Вал	6,9	6,5	12,0	10,3	6,1	4,3	7,3	6,9	7,5	7,7	6,9	6,0	6,1	8,5	4,8	4,8	6,1	5,6	7,1	11,5	8,4	2,6
Лей	7,1	9,5	6,8		8,6	8,6	10,5	10,4	2,0	8,6	5,8	7,6	6,1	7,2	6,9	9,4	} 15,9	9,4	10,4	} 15,5	6,1	} 15,6
Илей	7,0	4,8	9,1		3,8	3,6	6,5	3,3	2,7	4,3	5,8	6,3	4,5	6,0	5,2	6,7		7,6	10,8		6,0	
Про	4,8	4,9	3,7	3,8	4,5	3,7	4,7	5,7	3,9	3,5	3,6	4,2	3,4	16,3	1,4	4,2	5,5	3,7	5,0	5,3	5,1	1,9
Фен	5,7	3,1	5,5	4,9	7,6	5,5	6,2	3,9	3,5	5,2	7,2	4,0	6,0	6,4	3,1	3,6	5,3	7,2	6,4	7,8	3,2	4,3
Тир	6,0	3,3	4,6	5,2	6,8	1,1	5,9	3,7	7,6	8,3	5,5	10,9	9,0	3,0	3,6	4,1	3,1	10,3	8,5	7,6	14,7	3,4
Три	1,7	0,9	2,0	2,2	3,6	0,9	2,0	2,7	0	1,6	7,2	3,8	6,2	0	10,6	2,7	6,6	3,6	2,4	1,6	4,7	0,8
Сер	5,8	3,7	7,5	4,7	3,1	9,8	3,0	4,9	11,4	10,3	7,8	6,0	5,2	4,2	6,7	6,6	3,9	10,1	12,2	9,0	5,9	4,3
Тре	6,6	3,5	7,3	6,0	3,3	5,9	4,2	4,9	8,9	6,9	4,5	8,4	5,6	6,2	5,5	5,9	5,5	9,2	9,6	6,5	3,9	5,1
Цис [2])	4,4	2,9	1,1		1,1	2,2	0,4	0,8	7,0	1,3	4,4	2,1	0	3,4	6,8	4,1	2,0	1,4	1,6	0,9	4,6	1,4
Мет	5,1	<0,3	2,7	2,8	2,8	1,0	2,7	3,1	4,0	2,8	2,4	2,1	1,5	2,7	2,1	1,8	3,0	0,4	1,7	1,0	0	3,4
Арг	4,9	4,8	5,2	6,0	7,9	3,4	11,6	7,2	4,9	7,0	8,7	3,0	6,1	3,4	12,7	7,4	8,0	5,1	1,0	1,5	7,7	7,4
Гис	2,5	1,3	5,0	3,5	7,7	1,2	3,3	5,1	4,2	5,3	3,2	1,8	3,9	4,3	1,0	1,2	3,3	3,5	0,9	3,2	0,8	2,4
Лиз	7,8	8,7	9,4	10,7	9,9	1,8	7,2	11,8	10,5	7,7	6,3	4,8	7,4	5,2	5,7	5,8	2,9	7,8	0,9	3,3	5,7	11,9
Асп	8,6	10,4	12,4	9,9	11,4	12,3	9,3	12,5	15,0	13,9	19,3	15,9	14,5	9,3	18,2	19,1	14,8	11,7	16,0	17,7	11,3	8,9
Глу	6,6	11,5	4,8	4,3	9,7	7,1	13,4	13,0	12,4	10,0	9,6	8,1	12,9	20,4	4,3	11,5	12,1	10,7	11,9	13,3	12,4	22,1
Амид		1,7	0,9		2,2	1,5	1,2	1,3	2,1	2,2	1,3	1,7	1,7	0,4	(1,7)	2,8	1,8	0,9	1,3	1,6	1,6	1,2

[1]) Цифры выражают число граммов соответствующей аминокислоты на 100 г белка.

[2]) «Цис» обозначает цистин и цистеин (там, где этот последний имеется).

Последовательность аминокислот в молекуле химотрипсина также в значительной степени выяснена [1012], хотя в отношении ряда звеньев пока еще



Фиг. 127. Структура рибонуклеазы [2458].

имеются сомнения. В настоящее время проводится изучение еще нескольких ферментов, главным образом гидролитических, в том числе папаина [1591] и мурамидазы.

СТРУКТУРА И КОНФИГУРАЦИЯ ФЕРМЕНТНОГО БЕЛКА

Даже тогда, когда состав и последовательность аминокислот в пептидной цепи или цепях какой-либо белковой молекулы (т. е. то, что Эйринг назвал «первичной структурой») полностью определены, мы все еще далеки от воссоздания полной картины этой молекулы. Физические измерения показывают, что ферменты — это по большей части глобулярные белки; форма их молекул близка к сферической, а отношение осей не превышает 5. Следовательно, пептидная цепь не может быть вытянутой. Действительно, в настоящее время твердо установлено, что пептидные цепи в нативных белках обычно свернуты в спираль, согнуты или сложены («вторичная структура» Эйринга); правда, нам пока еще далеко не ясно, как может возникать подобная структура. Принято считать, что пептидная цепь свернута в спираль, отдельные витки которой связаны водородными связями. Было предложено несколько моделей таких спиралей. Из них наиболее широко известна α-спираль Полинга и Кори [2059]. Эта структура обнаружена в полипептидах, и она же может встречаться (на протяжении коротких участков) в пептидных цепях глобулярных белков, но ясно, что значительная часть молекулы глобулярных белков должна иметь другую конфигурацию. Это хорошо видно на примере белка, третичная структура которого была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа, а именно на примере миоглобина. Изящная модель миоглобина, сконструированная Кендрью и др. [1359], показывает, что в его молекуле имеются четыре длинных и два коротких спирализованных участка; между спирализованными участками находятся неспирализованные области, которые составляют значительную часть молекулы. В то же время рентгеноструктурный анализ рибонуклеазы (единственного детально изученного фермента) не дает никаких указаний на то, что в структуре этого

фермента существенную роль играют участки, построенные по типу α-спирали. Вопрос о конфигурациях цепей в белковых молекулах освещен в обзоре Лоу [1619].

Поскольку молекула глобулярного белка значительно толще, чем свернутая спиралью или каким-либо другим способом пептидная цепь, в белковой молекуле должны быть упакованы бок о бок несколько цепей; в молекулах же, состоящих только из одной пептидной цепи, эта цепь должна быть сложена так, чтобы различные ее участки лежали рядом друг с другом («третичная структура» Эйринга). Как было упомянуто в гл. VII, третичная структура может играть некоторую роль в активации субстрата, и ферментативная активность обычно утрачивается при денатурации, т. е. с разрушением третичной структуры.

Химия активного центра

ЧИСЛО АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ В МОЛЕКУЛЕ

Определение числа простетических групп в молекуле

В том случае, когда фермент содержит простетическую группу, принимающую участие в реакции, число активных центров едва ли может быть большим, чем число таких групп. Возможно, однако, что другие соединенные с белком группы той же химической природы, что и простетическая, не принимают участия в реакции. Поэтому простое определение общего числа этих групп дает лишь *максимально возможное* число активных центров.

Для определения числа простетических групп применяются спектроскопические и химические методы. У флавопротеидов и гемопротеидов измерение интенсивности характерных полос поглощения позволяет определить молярную концентрацию этих групп в том случае, если коэффициент поглощения группы в связанном и в свободном состоянии одинаков. Для флавопротеидов это предположение, по-видимому, справедливо, поскольку поглощение при 450 *ммк* приблизительно одинаково у различных флавиновых соединений. С гемопротеидами дело обстоит сложнее, так как положение и интенсивность полос поглощения связанного гема резко отличны от положения и интенсивности полос поглощения свободного гема. Для определения геминовых простетических групп обычно используют два спектроскопических метода. В одних случаях величину поглощения данного производного сравнивают с величиной поглощения стандартного раствора гемопротеида, для которого содержание гема известно (например, величину поглощения различных цитохромов можно сравнивать с величиной поглощения цитохрома *c*). В других случаях геминовые группы отщепляют от белка и переводят в какое-либо одно определенное соединение, обычно в пиридинферрогемохром; количество пиридинферрогемохрома в полученном растворе сравнивают с его количеством в стандартном растворе. Дополнительное осложнение при работе с гемопротеидами вызывается тем, что они могут содержать различные порфирины, и поэтому необходимо в качестве стандарта использовать соответствующий феррогемохром.

Для определения различных простетических групп, отщепленных от ферментного белка, существуют специальные методы. Например, количество флавинадениндинуклеотида можно определить, если прибавить известный объем его раствора к не содержащему флавина препарату оксидазы D-аминокислот и затем сравнить скорость окисления аланина в этом случае со скоростью окисления аланина в присутствии известного количества ФАД. Тиаминпирофосфат можно определять подобным же образом с помощью пируватдекарбоксилазы, а пиридоксальфосфат — с помощью декарбоксилазы

аминокислот. Любую из этих простетических групп можно определять также путем измерения активности изучаемых препаратов в качестве ростовых факторов для соответствующих микроорганизмов.

Когда простетической группой служит металл или когда металл входит в состав такой группы, можно воспользоваться химическими методами определения или прибегнуть к эмиссионному анализу (см. [2707]). При определении металлов в большей мере, чем при определении любых других простетических групп, важно работать с достаточно очищенными ферментами, поскольку белки легко связывают ионы металлов из раствора. Даже очищенный фермент может содержать значительные количества тех или иных металлов, никак не влияющих на его активность. Неоднократно сообщалось о том, что флавопротеиды содержат железо, количество которого может варьировать от 40 атомов на флавиновую группу до $^1/_6$ атома.

Перечисленными методами определяют число простетических групп для всего имеющегося белка. Если фермент очищен, то на основании этих данных можно определить молекулярный вес в расчете на одну простетическую группу; это будет минимальный молекулярный вес ферментного белка. Если же с помощью физических методов был определен и действительный молекулярный вес данного фермента, то путем простого деления можно рассчитать число простетических групп в молекуле фермента.

Определение числа субстратсвязывающих участков в молекуле

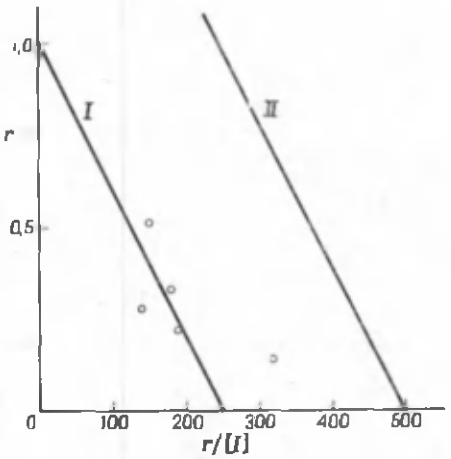
Если при соединении субстрата с ферментом изменяются некоторые физические свойства, то можно прямо определить максимальное число молекул субстрата, связываемых одной молекулой фермента. Хорошим примером такого рода может служить соединение НАД с алкогольдегидрогеназой, которое сопровождается изменением спектра поглощения в ультрафиолетовой области [2633]. На основании наблюдаемых изменений Теорелл и Бонникхсен показали, что молекула фермента из печени связывает две молекулы кофермента. Количество связанного субстрата можно также определить двумя физическими методами, которые основаны на измерении количества свободного субстрата, находящегося в равновесии с ферментом, а именно методом равновесного диализа и методом анализа различных слоев надосадочной жидкости после ультрацентрифугирования.

Метод равновесного диализа разработали Клотц и др. [1402]. Сущность его сводится к следующему. Определенный объем раствора фермента известной молярной концентрации помещают в мешочек для диализа и диализуют против раствора субстрата (или против раствора родственного субстрату конкурентного ингибитора), также известного объема и молярности, до наступления равновесия. Субстрат не должен подвергаться превращениям при данных условиях. После того как будет достигнуто равновесие, определяют концентрацию субстрата в наружной жидкости, которая — в том случае, если эффектом Доннана можно пренебречь,— должна быть равна концентрации свободного субстрата в растворе фермента. Поскольку общее количество добавленного субстрата известно, нетрудно рассчитать (с учетом возможных изменений объема) количество субстрата, связанного ферментом, а затем и число молекул субстрата, связанного каждой молекулой фермента при данной концентрации субстрата. Эту процедуру проводят с несколькими различными концентрациями субстрата и, экстраполируя данные, определяют максимальное число субстратсвязывающих участков в молекуле фермента. Легко показать, что

$$r \cdot \frac{K_s}{s} = n - r, \qquad \text{(X.1)}$$

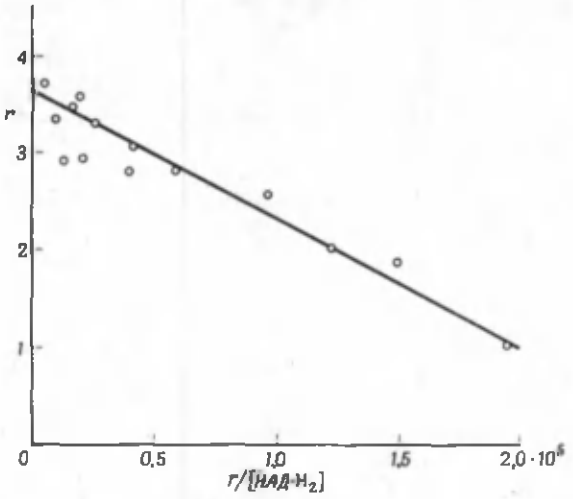
где r — среднее число молекул субстрата, связанных одной молекулой фермента; s, как обычно,— концентрация *свободного* субстрата; n — общее

число субстратсвязывающих участков в молекуле фермента. Таким образом, когда s возрастает до такой степени, что фермент оказывается насыщенным субстратом, r достигает максимума, т. е. становится равным n. График зависимости r от r/s должен представлять собой прямую, пересекающую ось ординат в точке n.



Фиг. 128. Связывание α-нафтилпропионата α-химотрипсином [1609].
Прямые *I* и *II* рассчитаны теоретически для $n = 1$ и $n = 2$ соответственно, так как $K_i = 4{,}0 \cdot 10^{-3}$ *M*. [I] — концентрация свободного α-нафтилпропионата.

На фиг. 128 показаны результаты, полученные Левусом и Бриггсом [1609] для процесса связывания α-нафтилпропионата (конкурентный ингибитор) α-химотрипсином. Использовав меченый ацетилдибромтирозин — продукт одной из реакций, катализируемых тем же ферментом,— Доарти



Фиг. 129. Связывание НАД·H_2 дрожжевой алкогольдегидрогеназой [1044].
r — число молекул НАД·H_2, связанных одной молекулой фермента.

и Васлов [644] также показали, что молекула химотрипсина имеет только один субстратсвязывающий участок.

Метод ультрацентрифугирования, разработанный Хэйсом и Великом [1044], основан на том же принципе, но только измерения проводятся здесь путем отбора проб надосадочной жидкости на разных уровнях ячейки и опре-

деления в этих пробах концентрации субстрата и фермента (белка). На фиг. 129 приведены результаты опытов по взаимодействию между дрожжевой алкогольдегидрогеназой и НАД·H_2. Эти результаты, по-видимому, свидетельствуют о том, что на одну молекулу фермента приходится четыре субстратсвязывающих участка (хотя по непонятной причине величина, найденная при экстраполировании, имеет несколько меньшее значение). Напомним, что этот фермент содержит четыре атома цинка на молекулу, тогда как фермент из печени, соединяющийся с двумя молекулами кофермента, содержит два атома цинка на молекулу и имеет вдвое меньший молекулярный вес. Рейнгард и др. [2213] использовали тот же метод для определения константы связывания субстрата ферментом пируваткиназой.

Близкий метод применялся для измерения числа связываемых белком молекул красителя или ионов хлора. Речь идет об электрофоретическом методе Смита и Бриггса [2455] и Олберти и Марвина [36, 37], в котором необходимо измерять только подвижности границ. Однако этот метод, насколько нам известно, пока еще не использовался при работе с ферментами.

Определения, проводимые с помощью специфичных реагентов

Если активность фермента полностью подавляется в результате соединения с небольшим числом молекул ингибитора, то обычно предполагают, что это число соответствует максимальному числу активных центров в молекуле фермента. Такое предположение, однако, не всегда оказывается правильным. Известно, например, что активность β-фруктофуранозидазы (3.2.1.26) полностью подавляется при добавлении 7—8 ионов Ag^+ на одну молекулу фермента [1911], а для подавления активности уреазы (3.5.1.5) достаточно четырех ионов Ag^+ [59]. Казалось бы, эти данные свидетельствуют о том, что указанные ферменты содержат в своей молекуле небольшое число активных центров. Но дело в том, что соединение небольшого числа диссоциирующих групп с серебром может вызвать значительные изменения в конфигурации пептидных цепей, и именно эти изменения могут послужить причиной утраты ферментативной активности. В таком случае число атомов серебра, достаточное для подавления активности фермента, уже не будет служить указанием на число субстратсвязывающих участков фермента.

Такого рода осложнения в значительно меньшей мере угрожают опытам, в которых используются специфичные реагенты, действующие как необратимые ингибиторы и полностью подавляющие активность фермента после присоединения к молекуле фермента всего одной или двух молекул ингибитора. В настоящее время наиболее специфичным из таких реагентов считается ДФФ. Это соединение не влияет на большинство ферментов, но подавляет активность определенной группы ферментов, гидролизующих эфиры, в образовании которых участвует карбоксильная группа (см. стр. 309).

Боурснелл и Уэбб [301] наблюдали полное подавление активности карбоксилэстеразы печени (3.1.1.1) меченым ДФФ при соединении 1 *г-атом* радиоактивного фосфора с 80 000 *г* белка. Хотя молекулярный вес этого фермента неизвестен, можно предположить, что число активных центров в его молекуле едва ли превосходит четыре; более вероятно, что имеется только один активный центр. Янсен и его сотрудники, также пользуясь радиоактивным ДФФ, показали, что полное подавление активности α-химотрипсина наступает в том случае, когда фермент связывает один атом радиоактивного фосфора [1245] и две изопропильные группы [1246] на молекулу. Эти данные могут означать только одно, а именно что в молекуле химотрипсина имеется всего один активный центр. Подобные же результаты были получены Янсеном и Боллсом при исследовании трипсина [1241].

Аналогичные опыты провели Килби и Джоуатт [1378]. Они измеряли количество освобождающегося *п*-нитрофенола в процессе нарастающей инак-

тивации трипсина при переносе на него диэтилфосфатной группы с диэтил-*п*-нитрофенилфосфата. Эти авторы нашли, что полное торможение наступает в том случае, когда на одну молекулу с молекулярным весом 17 000—18 000 освобождается одна нитрофенольная группа; значение эквивалентного веса, рассчитанное на основании опытов с ДФФ, равно 20 700. Молекулярный вес, определенный с помощью физических методов, оказался равным приблизительно 23 000.

Трудности при работе с недостаточно очищенными ферментами, например с ацетилхолинэстеразой (3.1.1.7), связаны с тем, что часть ДФФ может соединяться вместо активного центра фермента с какими-либо иными группами. Коэн и Варринга [461] предложили для преодоления этих трудностей следующий изящный способ. Они сначала маскировали активный центр фермента добавлением сильного конкурентного ингибитора, а затем обрабатывали фермент избытком немеченого ДФФ. Последний насыщал все группы, которые были способны его связывать, за исключением активного центра. Затем избыток ДФФ и ингибитор полностью удаляли диализом (этот процесс контролировали по восстановлению исходной активности), а препарат обрабатывали *меченым* ДФФ, который соединялся теперь уже только с активным центром. После этого вновь проводили диализ в течение достаточно продолжительного времени и измеряли количество связанного радиоактивного фосфора. Значение эквивалентного веса фермента Коэн и Варринга не приводят; однако они рассчитали, что каждый бычий эритроцит содержит только 520 активных центров. Поскольку к данному ферменту можно подобрать ряд ингибиторов с очень высоким сродством, для определений такого рода пригоден также метод, который мы описали на стр. 295. Другой кинетический метод [2885], применявшийся в опытах с ацетилхолинэстеразой, основан на использовании ингибитора с высоким сродством, который одновременно служит для фермента также и медленно расщепляющимся субстратом.

Еще один класс специфичных реагентов составляют вещества, реагирующие с тиоловыми группами. Хотя тиоловые группы имеются в целом ряде ферментов, они не всегда входят в состав активного центра; известно, например, что разрушение десяти тиоловых групп в молекуле альдолазы не влечет за собой утраты ферментативной активности [2585]. В том случае, когда тиоловые группы входят в состав активного центра, упомянутые реагенты можно использовать для определения числа этих необходимых групп так же, как используют для этой цели ДФФ. Велик [2726] нашел, что активность глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы (1.2.1.12) из мышц полностью подавляется при соединении этого фермента с тремя эквивалентами *п*-хлормеркурибензоата. Получаемый обычным путем фермент содержит две молекулы связанного НАД на молекулу, и обе они отщепляются под действием веществ, реагирующих с тиоловыми группами [2726]. Следует, однако, обратить внимание на тот факт, что после удаления связанного кофермента в результате обработки адсорбентами фермент соединяется уже с тремя эквивалентами НАД [766]. При использовании иодозобензоата реагирует пять и более тиоловых групп на молекулу, но только две из них имеют отношение к активному центру; об этом свидетельствует тот факт, что субстрат специфически предохраняет эти две группы от действия веществ, реагирующих с тиоловыми группами [2361]. Можно сделать вывод, что фермент содержит три активных центра на молекулу.

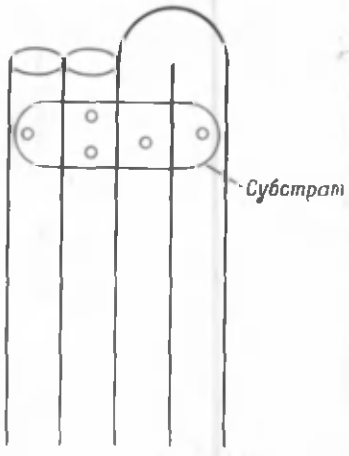
Другой метод определения числа активных центров состоит в инактивировании фермента путем его фотоокисления в присутствии метиленового синего; в результате такой обработки разрушаются гистидин и триптофан в белке [2818]. Было найдено [2819], что мурамидаза инактивируется на 70% в том случае, когда разрушается 1 остаток гистидина и 1,2 остатка триптофана на молекулу фермента, а полная инактивация химотрипсина

совпадает с разрушением 1 остатка гистидина и 3 остатков триптофана на молекулу [2820]. Эти величины дают максимальное значение числа активных центров. 90%-ная инактивация фосфоглюкомутазы достигалась при разрушении 1 остатка гистидина. Кинетику инактивации сравнивали с кинетикой разрушения ряда аминокислот. Оказалось, что процесс инактивации включает быстрый и медленный этапы; первый связан с разрушением одного реакционноспособного остатка гистидина, а второй — с разрушением тоже одного реакционноспособного остатка метионина [1450, 2188, 2189].

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА

Общие представления

Следует признать, что наши знания о структуре активных центров ферментов (в отличие от знаний о структуре простетических групп) очень скудны, и ни для одного фермента мы не имеем полной картины строения активного центра. Активный центр представляет собой ту специальную часть молекулы ферментного белка, которая соединяется с субстратом и от которой зависят ферментные свойства молекулы. Он определяет и специфичность и каталитическую активность фермента, а потому, как мы уже отмечали, он должен представлять собой структуру определенной степени сложности, приспособленную для довольно тесного взаимодействия с молекулой субстрата или по крайней мере с теми ее частями, которые непосредственно участвуют в реакции. Как уже указывалось в главе о специфичности (гл. VI), взаимодействие между активным центром и молекулой присоединенного субстрата может, по-видимому, осуществляться лишь при тесном сближении на расстоянии около 15—20 Å; с увеличением расстояния оно быстро ослабевает, хотя разные ферменты в этом отношении ведут себя не одинаково. Общий характер взаимодействия и данные по специфичности говорят о том, что в активном центре должен иметься ряд различных групп, соединяющихся с различными частями молекулы субстрата. В следующем разделе мы обсудим природу этих групп.



Фиг. 130. Вероятная схема строения активного центра фермента [623].

Ничто не указывает на то, что активный центр располагается обязательно в пределах ограниченного отрезка одной пептидной цепи; он может представлять собой совокупность групп, расположенных на двух или нескольких смежных пептидных цепях или на смежных участках изогнутой пептидной цепи, как показано на фиг. 130 [623]. Если это так, то активность фермента должна зависеть не только от наличия тех или иных функциональных групп, но также и от целостности конфигурации нативной молекулы белка, ибо эта конфигурация определяет взаимное расположение таких групп. Отсюда вытекает важность третичной структуры белка для сохранения его ферментативной активности. Хорошо известно, что если при денатурации фермента расположенные рядом пептидные цепи отходят друг от друга, то активность фермента практически во всех случаях утрачивается. Иногда у фермента после денатурации, несмотря на полную утрату активности, в какой-то мере сохраняется способность соединяться с субстратом. Это наводит на мысль, что отдельные группы, участвующие в соединении фермента с суб-

стратом, все еще сохраняются, хотя структура активного центра в целом оказывается разрушенной. В некоторых случаях (если денатурация обратима) эта структура может быть вновь восстановлена, и тогда восстанавливается также и активность фермента. Такое поведение согласуется с тем известным фактом, что присоединившийся к ферменту субстрат часто предохраняет его от денатурации; видимо, это объясняется тем, что молекула субстрата стремится удержать пептидные цепи фермента вместе.

Сходную ситуацию можно наблюдать у цитохрома *c*, как явствует из фиг. 70, где гем представлен в соединении с четырьмя параллельно расположенными пептидными цепями, скрученными в виде спиралей.

В некоторых случаях отделение пептидных цепей друг от друга можно вызвать, разорвав дисульфидные мостики при помощи каких-либо химических воздействий. Во многих белках эти мостики, образованные остатками цистеина, находящимися в различных цепях, представляют собой единственные ковалентные связи, т. е. наиболее прочные связи, удерживающие цепи вместе. Помимо дисульфидных мостиков цепи удерживаются друг подле друга главным образом за счет водородных связей, и потому разрыв дисульфидных мостиков в результате реакции восстановления или окисления влечет за собой значительные изменения в конфигурации. Так, у рибонуклеазы при окислении ее надмуравьиной кислотой [73] активность полностью утрачивается, хотя она еще и сохраняется после расшатывания водородных связей в 8 *M* растворе мочевины [72].

Методы идентификации специфических групп в активном центре

Для идентификации химических групп в активном центре используются различные методы, которые могут быть отнесены к трем основным типам: а) определение значений pK субстратсвязывающих групп на основе изучения влияния pH на K_m или v_0; б) исследование активности фрагментов, образующихся в результате действия протеолитических ферментов; в) инактивация фермента специфическими химическими реагентами.

Метод определения значений pK для групп, входящих в состав активного центра, уже описан в гл. IV (см. раздел В). Можно было бы думать, что определение величин pK для групп, входящих в состав активного центра фермента, даст ключ к пониманию химической природы этих групп, и, действительно, некоторые авторы делали выводы такого рода. Однако мы уже подчеркивали (см. стр. 129), что подобные данные должны истолковываться с надлежащей осторожностью, поскольку значения pK для той или иной группы могут сильно изменяться под влиянием соседних групп. Изучение влияния температуры на величины pK в известной мере подкрепляет эти данные и делает идентификацию более надежной.

В табл. 32 приведены значения pK, полученные в опытах по изучению кинетики действия некоторых ферментов.

В столбце 3 приводятся величины pK для тех групп в свободном ферменте, которые непосредственно соединяются с субстратом или располагаются достаточно близко к субстратсвязывающим группам фермента, вследствие чего величины pK для этих групп могут существенно меняться при взаимодействии фермента с субстратом. Эти величины могут быть получены из опытов по измерению влияния pH на K_m или на v_0 (ср. фиг. 48). Величины pK в столбце 4 относятся к группам, степень ионизации которых также изменяется (в результате образования комплексов); однако эти группы не обязательно принадлежат ферментной части комплекса — они могут принадлежать и соединившейся с ферментом молекуле субстрата. Величина, заключенная в скобки, явно принадлежит группе, относящейся к этой последней категории. Значения pK комплексов можно получить, определяя влияние pH на K_m или V. Помимо тех групп, у которых величины pK меняются

Таблица 32

КОНСТАНТЫ ИОНИЗАЦИИ ГРУПП, СВЯЗАННЫХ С АКТИВНЫМИ ЦЕНТРАМИ ФЕРМЕНТОВ

Фермент	Субстрат или ингибитор	pK_e	pK_{es}	Источник данных	
				экспериментальных	расчетных
Ксантиноксидаза (1.2.3.2)	2-амино-4-оксиптеридин	5,3; 7,9	4,4	[1622]	[621]
НАД·H_2-цитрохром-*c*-редуктаза (1.6.2.1)	НАД·H_2 + Цитрохром *c*	7,7; 8,5	7,6; 8,5	[778]	[778]
Пероксидаза (1.11.1.7)	H_2O_2 + Гваякол		7,8	[1172]	[1172]
Карбоксилэстераза (3.1.1.1)	Этилбутират		5,5	[2808]	[2808]
	Этилхлорацетат		6,1; 9,4	[228]	[228]
	Изопропилфторацетат		6,8; 9,2		
Ацетилхолинэстераза (3.1.1.7)	Ацетилхолин	6,3; 10,4*	10,4*	[2883]	[2880]
	Этилхлорацетат		6,7; 9,6	[228]	[228]
	n-Пропилфторацетат		6,2; 9,0	[228]	[228]
Холинэстераза (3.1.1.8)	Ацетилхолин	6,2*; 7,7	6,2*	[1019]	[1019] [1505]
	n-Пропилхлорацетат		6,2; 9,0	[228]	[228]
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)	Фенилфосфат	9,2		[1878]	[621]
Кислая фосфатаза (3.1.3.2)	Фенилфосфат		3,3	[2341]	[1505]
Арилсульфатаза (3.1.6.1)	*n*-Нитрофенилсульфат	8,1; 9,4	7,75	[2979]	[632]
	n-Ацетилфенилсульфат	8,1; 9,4	7,65	[2979]	[632]
	n-Нитрокатехилсульфат	(6,9); 8,1; 9,4	7,55	[2979]	[632]
Арилсульфатаза B	*n*-Нитрофенилсульфат	5,7	5,2	[2923]	[2923]
Арилсульфатаза C	*n*-Нитрофенилсульфат	7,8		[2271]	[2271]
β-Амилаза (3.2.1.2)	Амилопектин	3,7; 7,0		[2641]	[2641]
Декстрин-1,6-глюкозидаза (3.2.1.b)	Остаточный декстин	7,6		[1522]	[1522]
Олиго-1,6-глюкозидаза (3.2.1.10)	» »	7,0		[1519]	[1519]
α-Глюкозидаза (3.2.1.20)	Мальтоза	7,0		[1519]	[1519]
β-Фруктофуранозидаза (3.2.1.26)	Сахароза	3,0; 6,6*	6,6*	[1268]	[621] [1505]
	Сахароза	6,8*	2,6; 6,8*	[1916]	[1916]
	Раффиноза	6,8*	2,6; 6,8*	[1916]	[1916]
Пепсин (3.4.4.1)	Овальбумин		2,2	[358]	[1505]
Трипсин (3.4.4.4)	Бензоиларгининэтиловый эфир		6,25	[958]	[958]
	Казеин		6,25	[2494]	[989]
Ацетилтрипсин	Казеин		7,1	[2494]	[989]
Химотрипсин (3.4.4.5)	Ацетилфенилаланинэтиловый эфир	8,5; 6,85*	6,85*	[989] [525]	[989] [1] [525] [632]
	Метилгидрокоричная кислота		7,2; 8,0	[171]	[1505]
Фицин (3.4.4.12)	Бензоиларгининэтиловый эфир	4,35*	4,35*	[234]	[234]

Продолжение табл. 32

Фермент	Субстрат или ингибитор	pK_e	pK_{es}	Источник данных: экспериментальных	Источник данных: расчетных
Уреаза (3.5.1.5)	Мочевина		6,1; 9,2	[2772]	[1505]
	Мочевина	9,0*	5,6; 9,0*	[2721]	[632] [1913]
Аргиназа (3.5.3.1)	Аргинин	6,8	8,3; 12,1	[913] [2242]	[621] [2242]
Фумаратгидратаза (4.2.1.2)	Фумарат	6,2; 6,8	5,3—5,8 7,3—7,7	[34]	[34]
	Малат	6,2; 6,8	6,6—7,3 8,4	[34]	[34]
Гистидин—аммиак-лиаза (4.3.1.3)	Гистидин		7,2; 10,9	[2762]	[1505]

[1]) Хаммонд и Гутфрейнд [988] пользуются символом K_i вместо употребляемых нами K_s или K_{es}, так как они рассматривают участвующий в этой реакции ион водорода как ингибитор фермента.

при соединении с субстратом, имеются также и такие группы, степень ионизации которых влияет на реакционную способность фермент-субстратного комплекса, хотя сами они в образовании комплекса не участвуют. Значения величин pK этих групп можно определить по влиянию pH на V, но не на K_m (ср. фиг. 47); эти величины отмечены звездочками.

Как можно видеть из табл. 32, значения pK изменяются в широких пределах — они варьируют приблизительно от 3 до 11. Интересно, что в большинстве случаев в активном центре присутствует группа, для которой величина pK равна 6—7. Так как гистидин — единственная аминокислота, у которой величина pK лежит в этой области, то многие исследователи приписывают гистидину особое значение в ферментативном катализе. Однако нельзя считать абсолютно доказанным, что в белке нет других групп с тем же значением pK; две аминогруппы в цистинилдиглицине имеют pK 6,36 и 6,95 [921].

Хотя расщепление ферментных белков протеолитическими ферментами чаще всего ведет к утрате активности, тем не менее материал, представленный в следующей главе, говорит о том, что некоторые протеолитические ферменты могут, оставаясь активными, претерпевать небольшие изменения, например разрыв одной или двух пептидных связей. В четырех случаях оказалось возможным удалить значительную часть белка путем переваривания без того, чтобы это заметным образом сказалось на активности. Перлмен [2070] нашла, что после самопереваривания пепсина при удаленных от оптимума значениях pH могут получаться фрагменты, способные проходить через полупроницаемые мембраны и при этом сохраняющие некоторую ферментативную активность. Измеренная активность оказалась низкой: в том случае, когда субстратом служил гемоглобин, активность на единицу веса азота составляла 1—5% исходной; когда же субстратом служил ацетилфенилаланилдиодтирозин, то сохранялось 64% исходной активности. Если бы при самопереваривании пепсина удалялась какая-то неактивная часть белковой молекулы, а каталитическая активность активного центра сохранялась неизменной, то удельная активность остающейся части молекулы должна была бы возрасти, а не уменьшиться. Однако приведенные величины харак-

теризуют только среднюю активность всех пептидов, способных диализоваться; поэтому мы вправе допустить, что некоторые из этих пептидов могут быть совершенно лишены ферментативной активности.

Рибонуклеаза (2.7.7.16) может быть полностью инактивирована пепсином в результате расщепления только одной пептидной связи и удаления тетрапептида Асп-Ала-Сер-Вал с С-конца молекулы. Ни физическими, ни химическими методами [73] не удалось обнаружить изменений в оставшейся части молекулы. Однако с помощью карбоксипептидазы А от С-конца молекулы рибонуклеазы можно отщепить три аминокислоты (валин, серин и аланин) без какой-либо потери активности. Отсюда следует, что перечисленные аминокислоты не являются необходимыми для сохранения ферментативной активности [2241]. Естественно сделать вывод, что остаток аспарагиновой кислоты, занимающий четвертое положение от С-конца, составляет часть активного центра молекулы рибонуклеазы. Гуанидинирование боковых цепей лизина с помощью О-метилизомочевины показывает, что один из десяти остатков лизина менее реакционноспособен, чем другие, и что только этот остаток связан с каталитической активностью [1393]. В настоящее время установлено [2512], что этот остаток занимает положение 41 (фиг. 127).

Ричардс и Витаятил [2214] провели с рибонуклеазой исследование, представляющее большой интерес. Они действовали на рибонуклеазу субтилопептидазой А. Последняя расщепляет только одну пептидную связь в молекуле рибонуклеазы, а именно связь между 20- и 21-м аминокислотным остатком, и притом без потери активности. Образующуюся смесь пептида и укороченного белка можно разделить, осадив белок трихлоруксусной кислотой. Ни один из двух компонентов смеси сам по себе не обладает ферментативной активностью, но уже при простом смешивании их ферментативная активность почти полностью восстанавливается. Было показано, что пептид и белок обладают очень большим специфическим сродством друг к другу в нейтральной среде. Эти исследования позволили установить, что для сохранения активности фермента необходимы некоторые группы, расположенные поблизости от концов исходной белковой цепи, и одна группа, находящаяся в центре. Вполне вероятно, что эти группы сближаются при свертывании цепи, которое приводит к образованию активного центра; но можно допустить и другое, а именно что они сами могут влиять на свертывание цепи.

Очень интересные результаты получили с помощью методики постепенного расщепления молекулы фермента Хилл и Смит [1102] на неактивном ртутном производном папаина (3.4.4.10). Это производное можно подвергать ступенчатому расщеплению с помощью лейцинаминопептидазы до тех пор, пока от исходной молекулы не отщепится 109 из 185 аминокислотных остатков, входящих в ее состав. После удаления ртути (из оставшейся части молекулы) исходная активность фермента восстанавливалась, а это свидетельствует о том, что почти две трети молекулы не являются необходимыми для сохранения каталитической активности. Активный центр фермента и в этом случае располагается, по-видимому, поблизости от С-конца его молекулы, так как аминопептидаза отщепляет аминокислоты с N-конца.

Четвертым примером служит фосфопируват-гидратаза (4.2.1.11), которая может быть деградирована без потери активности лейцинаминопептидазой или карбоксипептидазой А таким образом, что с одного или другого конца ее молекулы отщепляется 150 аминокислотных остатков [2004]. Так как молекула этого фермента состоит из одной пептидной цепи, молекулярный вес которой равен 64 000, то при отщеплении 150 аминокислотных остатков степень деградации оказывается значительно меньше той, какая была достигнута для папаина (имеющего молекулярный вес 20 700).

Эти данные можно сравнить с результатами, полученными при переваривании цитрохрома *c* пепсином [1717]. При таком переваривании образуется ряд более или менее полно денатурированных продуктов, обладающих ката-

литическими свойствами. Активность образующихся продуктов варьирует от свойственной нативному цитохрому *c* до свойственной одному только феррогемохрому.

На основании опытов по инактивации ферментов с помощью химических реагентов неоднократно высказывались предположения о том, какие группы входят в состав активных центров этих ферментов. Такие выводы можно считать обоснованными только в том случае, *если использованный* реагент действительно специфичен для данной определенной группы; иными словами, он не должен реагировать ни с какими другими группами, присутствующими в белках. *Более того, следует иметь в виду, что под влиянием* соседних групп аминокислотный остаток, находящийся в данном положении в молекуле белка, может вести себя совершенно иначе, нежели такой же *остаток в другом положении или в составе* более простой молекулы. Еще одно условие заключается в том, что используемый реагент должен инактивировать фермент благодаря непосредственному воздействию на активный центр, а не в результате денатурации белка.

Группа реагентов, уже описанная в гл. VIII, действует более или менее специфично на тиоловые группы ферментов; при этом происходит либо окисление тиоловых групп до дисульфидных, либо образование меркаптидов, либо алкилирование. Первые две реакции обратимы, третья — необратима. В результате анализа данных, полученных при исследовании торможения, вызываемого этими реагентами, было высказано утверждение, что тиоловые группы входят в состав активных центров многих ферментов. Однако различные реагенты, действующие на тиоловые группы, часто дают различные результаты (см., например, [985]); мнения исследователей по вопросу о специфичности этих реагентов нередко расходятся, и в интерпретации полученных данных также имеются расхождения. Более того, известно, что некоторые из ранних опытов были проведены не с очищенными ферментами, а на сложных системах, в состав которых входили иногда такие носители тиоловых групп, как липоат или кофермент А. На эти вещества использованные реагенты также, разумеется, должны были действовать. Таким образом, в отдельных случаях наблюдаемое торможение вызывалось не атакой указанных веществ на тиоловые группы ферментов, а взаимодействием их с SH-группами названных кофакторов. Было бы очень желательно установить специфичность *стандартного реагента в отношении* SH-*групп и провести* новое исследование с очищенными ферментами, используя этот реагент. А до тех пор, пока это не будет сделано, приводимые в литературе списки «SH-*ферментов*» (*см., например*, [173]) *следует принимать с* некоторыми оговорками.

На примере рибонуклеазы хорошо видно, какими опасностями чревата непродуманная интерпретация таких данных. Этот фермент не содержит SH-групп, но активность его подавляется некоторыми из так называемых SH-реагентов, например иодацетатом и бромацетатом [170]; выяснилось, что эти реагенты атакуют в молекуле рибонуклеазы остаток гистидина.

В отдельных случаях, однако, присутствие SH-групп в составе активного центра фермента можно считать доказанным. Это относится, например, к глицеральдегид-дегидрогеназе (1.2.1.12), сукцинатдегидрогеназе (1.3.99.1), дрожжевой алкогольдегидрогеназе (1.1.1.1), папаину (3.4.4.10) и ко многим, а может быть и ко всем, киназам.

Если для инактивации фермента требуется, чтобы реагент соединился с большим числом SH-групп в молекуле фермента, то влияние указанного реагента, вероятно, следует отнести не за счет специфической атаки на активный центр, а за счет изменения конфигурации белковой молекулы в целом. В нескольких случаях, однако, из защитного действия субстратов и конкурентных ингибиторов вытекает, что тиоловые группы, о которых идет речь, находятся действительно в самом субстратсвязывающем участке молекулы фермента. Гопкинс и др. [1158] показали, что сукцинат или мощный конку-

рентный ингибитор малонат защищают сукцинатдегидрогеназу от инактивации SH-реагентами. Рапкин и др. [2173] продемонстрировали защитное действие НАД по отношению к глицеральдегидфосфат-дегидрогеназе. Сегал и Бойер [2361] не обнаружили защитного влияния НАД в опытах с необратимо действующими SH-реагентами, но некоторое защитное действие в их опытах оказывал глицеральдегидфосфат. В β-амилазе иодацетамид алкилирует только SH-группу; циклогексаамилоза, которая является конкурентным ингибитором, защищает фермент от действия этого реагента [2641]. Алкилирование снижает V в 50 раз, а сродство к субстрату — в 8 раз.

Другой возможный путь инактивирования ферментов под действием SH-реагентов, алкилирующих или образующих меркаптиды (для случаев, когда SH-группы фермента *не входят* в состав его активного центра и не обусловливают его каталитическую активность),— это создание стерических препятствий к взаимодействию фермента с субстратом. Если SH-группа, даже и не имеющая отношения к каталитическому действию, расположена достаточно близко к субстратсвязывающему участку молекулы фермента, то крупная молекула реагента, присоединившаяся к этой группе, может преградить субстрату доступ к активному центру. Сингер [2409] предположил, что именно такой механизм лежит в основе торможения липазы из зародышей пшеницы *п*-хлормеркурибензоатом; известно, что в этом случае интенсивность торможения возрастает с увеличением размера молекул субстрата, а это наводит на мысль, что более мелкие молекулы субстрата способны преодолеть препятствие, тогда как для более крупных молекул активный центр оказывается недоступным. Сингер нашел также, что торможение, вызванное тем же реагентом при действии на оксидазу D-аминокислот, не зависит от природы субстрата.

Другая группа высокоспецифичных реагентов, уже упомянутая ранее,— это фосфорорганические соединения, например ДФФ, реагирующие только с определенными ферментами, обладающими эстеразным действием (см. гл. VIII и [2805]). Эти соединения не реагируют ни с белками, ни с входящими в состав белков аминокислотами. С помощью изотопов было показано, что ДФФ не способен соединяться с целым рядом нативных и денатурированных белков, включая даже химотрипсиноген и денатурированный химотрипсин [301] (хотя нативный химотрипсин быстро реагирует с ДФФ, и полное торможение достигается уже при соединении одной молекулы химотрипсина с одной молекулой ДФФ; см. [146]). Так как ДФФ не реагирует ни с одной из известных индивидуальных групп, присутствующих в молекулах белков, то нужно сделать вывод, что он реагирует с каким-то участком молекулы, в образовании которого принимают участие по меньшей мере две соседние группы, находящиеся в различных пептидных цепях (а может быть, и несколько таких групп); когда в результате денатурации эти группы разъединяются, реакционная способность фермента по отношению к ДФФ исчезает. Подобные реагенты, имея в своем составе эфирную группировку, сначала, вероятно, соединяются с активным центром тем же путем, как и сложные эфиры, служащие субстратом фермента; однако фосфорильная группа присоединяется к ферменту необратимо, тогда как ацильная группа нормального субстрата, присоединившись, может вновь отщепиться. Все изложенное выше дает нам основание ожидать, что опыты с ДФФ помогут расшифровать структуру активного центра.

Так как замещенная фосфорильная группа присоединяется необратимо и не удаляется ни при денатурации, ни при гидролизе белка, то, очевидно, можно получить ценные данные, разделяя и идентифицируя те пептиды из ферментов, обработанных ДФФ, которые эту группу содержат. Это может помочь определить природу групп в активном центре, к которым присоединяется ДФФ. Работа значительно облегчается при использовании ДФФ, меченного радиоактивным фосфором.

Шаффер, Мей и Саммерсон [2322] показали, что в химотрипсине фосфорильная группа присоединяется к гидроксильной группе одного из остатков серина. Так как в молекуле химотрипсина имеется больше двадцати остатков серина, то эта единственная сериновая группа должна занимать особое положение. Несколько позже аналогичные результаты были получены и для ряда других гидролитических ферментов. На основании идентификации пептидов, полученных при частичном гидролизе ферментов и меченых диизопропилфосфорильным радикалом, были установлены последовательности аминокислот, указанные в табл. 33. Все эти пептиды содержат реакционноспособный серин, к которому слева присоединена дикарбоновая кислота (глутаминовая у эстераз и аспарагиновая у пептидаз), а справа — нейтральная аминокислота (аланин у эстераз и глицин у пептидаз). (Исключение составляет последний фермент, явно принадлежащий к другому типу.) Результаты, полученные для химотрипсина двумя разными группами исследователей, несколько различаются, хотя эти расхождения не касаются аминокислотных остатков, непосредственно присоединенных к серину. Остербан и др. [2026] подтвердили правильность установленной ими последовательности аминокислот при помощи опытов, в которых вместо ДФФ использовался C^{14}-*n*-нитрофенилацетат.

Некоторые из ферментов, о которых говорилось выше, например химотрипсин, имеют в составе активного центра гистидин (*что было обнаружено* при помощи других методов; см. стр. 407). Однако в последовательностях, приведенных в табл. 33, не содержится гистидина, расположенного поблизости от *реакционноспособного остатка серина*. *Два остатка гистидина* в молекуле α-химотрипсина находятся не в той пептидной цепи, которая содержит реакционноспособный серин, а в другой [1012]; это лишний раз *подтверждает, что в образовании активного центра* участвует более чем одна пептидная цепь. Реакционная способность рассматриваемого остатка серина обеспечивается, по-видимому, сближением двух цепей, поскольку она утрачивается, когда цепи разъединяются при денатурации.

У других ферментов, содержащих в активном центре реакционноспособный серин, последовательность аминокислот в пределах активного центра была установлена иным способом. Мильштейн и Сэнгер [1830] метили фосфоглюкомутазу при помощи субстрата, меченного радиоактивным фосфором (глюкозо-1-фосфата или глюкозо-6-фосфата), и установили, что к реакционноспособному остатку серина примыкают следующие аминокислоты:



Было показано, что у этого фермента как серин, так и гистидин — необходимые компоненты активного центра. Любопытно, что эти два аминокислотных остатка располагаются рядом в одной пептидной цепи. Серин входит также в состав активного центра щелочной фосфатазы. Этот фермент метили неорганическим фосфатом [698].

Когда α-глюканфосфорилаза *b* переходит в *a*-форму под действием P^{32}-АТФ, образующийся продукт содержит в дополнение к четырем фосфатным группам пиридоксаля по четыре меченых остатка фосфосерина на молекулу, т. е. по одному на каждый активный центр [734]. Каждый из этих меченых остатков серина обнаруживается в последовательности



Как можно видеть из сказанного выше, остаткам серина и гистидина приписывают очень важное значение в механизме ферментативного катализа.

Таблица 33

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ В АКТИВНЫХ ЦЕНТРАХ ФЕРМЕНТОВ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ДФФ

Фермент	Последовательность аминокислот [1]	Источник данных
Карбоксилэстераза (3.1.1.1) (печень лошади)	Гли-Глу-Сер(Ф)-Ала-Гли-Гли-(Сер, Глу)	[1248]
Холинэстераза (3.1.1.8) (лошадиная сыворотка)	Фен-Гли-Глу-Сер(Ф)-Ала-Гли-(Ала, Сер, Ала)	[1247]
Трипсин (3.4.4.4) (бычья поджелудочная железа)	NH_2-Асп-Сер(Ф)-Цис-Глу-Гли-Гли-Асп-Сер(Ф)-Гли-Про-Вал-Цис-Сер-Гли-Лиз	[612]
Химотрипсин (3.4.4.5) (бычья поджелудочная железа)	Гли-Асп-Сер(Ф)-Гли-Глу-Ала	[2323, 2687]
Химотрипсин (3.4.4.5) (бычья поджелудочная железа)	Гли-Асп-Сер(Ф)-Гли-Гли-Про-Лей	[2025]
Панкреатопептидаза Е (3.4.4.7) (бычья поджелудочная железа)	Асп-Сер(Ф)-Гли	[1931]
Тромбин (3.4.4.13) (бычья кровь)	Асп-Сер(Ф)-Гли	[845]
Субтилопептидаза А (3.4.4.16) (*Bacillus subtilis*)	Тре-Сер(Ф)-Мет-Ала	[2298]

[1] Ф — фосфорильная группа, ведущая свое происхождение от фосфорорганического соединения, с помощью которого метился активный центр фермента.

В связи с этим было изучено несколько простых модельных систем. Гидроксильная группа N-ацетилсеринамида — соединения, служащего моделью серинового участка в пептидной цепи,— может быть ацилирована макроэргическими ацетильными производными в 1000 раз быстрее, чем гидроксильная группа воды или этанола. Образующаяся при этом связь легко гидролизуется под действием имидазола, играющего роль катализатора [67]. Скорости этих реакций довольно высоки, но все же они значительно ниже, чем скорости реакций, катализируемых ферментами. Интересное обсуждение возможных механизмов катализа с участием серина и имидазола можно найти в работах [67] и [169].

ГЛАВА XI

ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Этот раздел включает в себя два самостоятельных вопроса: а) внеклеточное образование активных ферментов из неактивных предшественников (процесс, который может протекать и in vitro); б) биосинтез ферментов в живой клетке (процесс, неразрывно связанный с ростом и заменой изношенных частиц, который, однако, может стимулироваться под влиянием изменений в условиях окружающей среды). Биосинтез, несомненно, значительно более важный и фундаментальный процесс; образование же ферментов из белковых предшественников ограничивается, по-видимому, только протеиназами, и его можно, очевидно, рассматривать как конечный этап их синтеза. Поэтому мы и начнем наше рассмотрение образования ферментов с вопроса об их биосинтезе.

Биосинтез ферментов

В каждом живом организме непрерывно протекает синтез ферментов. Когда в процессе роста организма увеличивается количество живого вещества, параллельно этому увеличивается и число молекул каждого необходимого фермента. При отсутствии роста синтез тоже необходим, чтобы непрерывно восполнять убыль молекул вследствие их разрушения. Исходя в первую очередь из работ Шёнгеймера и его школы [2340] по включению меченых аминокислот в белки, в настоящее время полагают, что у животных внутриклеточные белки пребывают в состоянии динамического равновесия, т. е. непрерывно разрушаются и замещаются вновь синтезированными. Правда, работы [1129] по индуцированному синтезу β-галактозидазы (3.2.1.23) у *E. coli*, проведенные с применением изотопного метода (ниже мы рассмотрим их более подробно), обнаружили удивительную стабильность белков у этого организма. В связи с этим было высказано предположение, что данные Шёнгеймера, полученные на целых животных, свидетельствуют не о быстром обновлении белков отдельных клеток, а о замене старых клеток молодыми или (в тех тканях, где обновление идет особенно быстро) о пополнении белков, расходуемых в процессе секреции. Однако более поздние работы, проведенные с применением изотопов [2586], показали, что время полужизни белков печени равно 2—4 дням. Более того, для некоторых ферментов животных тканей изотопным методом получено прямое доказательство довольно быстрого обновления их в организме [1054, 2407]. Взрослым кроликам вводили меченые аминокислоты, а затем через определенные промежутки времени (начиная от 2 *час* и более) выделяли у них из мышц три различных фермента. Определение радиоактивности аминокислот, выделенных из перекристаллизованных ферментов, показало, что в белок включается значительное количество введенных аминокислот. Распад и синтез за одни сутки составили для двух ферментов около 1% общего количества каждого из них, а для третьего фермента — около 0,5%. Показано, что время полужизни альдо-

лазы мышц (ткани, в которой клетки живут долго) равно примерно 20 дням [2326].

Эти данные говорят о том, что биосинтез ферментов представляет собой чрезвычайно важный процесс, без которого жизнь вскоре приостановилась бы. Для образования активного фермента необходимо, чтобы была синтезирована белковая часть его молекулы и простетическая группа (в тех случаях, когда она имеется). Однако организм не всегда может синтезировать необходимые ему простетические группы из простых метаболитов. Поэтому те простетические группы, которые он не способен синтезировать сам, должны быть доставлены ему извне. Организм животного не может, например, синтезировать флавин. Поэтому рибофлавин относится к числу незаменимых витаминов, которые всегда должны входить в состав рациона животного; при недостатке флавина развиваются явления острой недостаточности — организму не хватает флавопротеидных ферментов, таких, как ксантиноксидаза и оксидаза D-аминокислот [111, 2253]. Конечно, в тех случаях, когда ферменты содержат какие-нибудь металлы, эти металлы также должны поступать в организм извне, и, следовательно, они обычно являются факторами роста. Явления недостаточности при нехватке определенных металлов и устранение этой недостаточности в результате введения металлов используют как доказательство того, что данные металлы входят в состав соответствующих ферментов. У крыс, например, при недостатке молибдена снижается количество ксантиноксидазы, а добавление молибдена к рациону повышает уровень оксидазы [595, 2218]. Такие исследования проводились не только на животных; подобными же опытами с введением недостающих питательных веществ было доказано, например, присутствие молибдена в нитратредуктазе плесневых грибов [1962, 1965].

Обычно синтез ферментов происходит в живых организмах, но он может протекать и в значительно более простых системах, например в перфузируемых органах или (in vitro) в тканевых срезах, в разрушенных бактериальных клетках и даже (в отдельных случаях) в бесклеточных экстрактах животных тканей. В изолированной перфузируемой печени может быстро образоваться триптофаноксигеназа и треониндегидратаза [2118, 2313]. В срезах поджелудочной железы голубя при инкубации в аэробных (но не в анаэробных) условиях образуются амилаза, липаза и рибонуклеаза, особенно если к среде добавлена смесь аминокислот [1130, 2343]; наблюдалось четырехкратное увеличение активности первых двух ферментов за 2,5 *час*. Синтез этих ферментов тормозится при добавлении к среде динитрофенола, который нарушает процессы аэробного фосфорилирования; этот факт указывает на прямую зависимость синтеза белков от процессов, поставляющих энергию. Тщательно отмытые разрушенные клетки *Staphylococcus aureus* при добавлении к ним смеси аминокислот и АТФ в качестве источника энергии синтезируют каталазу, β-галактозидазу (если присутствует галактоза) и систему ферментов гликолиза [812]. Фракция, выделенная из водного экстракта ацетонового порошка поджелудочной железы голубя или свиньи, в присутствии смеси аминокислот и АТФ способна образовывать амилазу в течение 30—60 *мин* [2547].

Синтез ферментов в живой клетке находится под двойным контролем. С одной стороны, образование ферментов, как и образование белков вообще, подчинено генетическому контролю. Данный фермент может образоваться только в том случае, если в клетке имеется соответствующий ген; если же ген отсутствует или поврежден в результате мутации, то и фермент будет отсутствовать. Таким образом, совокупность генов (генотип) клетки определяет ее потенциальные возможности в отношении синтеза ферментов. Функция генов связана с синтезом ферментов и генотип содержит «план» метаболизма клетки. Клетка не может образовывать неограниченное число различных ферментов, ибо это привело бы к хаосу; она может синтезировать только те ферменты, которые определяются ее генотипом. Теория Бидла

[181] «один ген — один фермент», постулирующая необходимость наличия специального гена для образования каждого фермента, в настоящее время находит широкое признание. В основу этой теории положены данные, полученные главным образом при изучении обмена веществ у мутантных штаммов плесневого гриба *Neurospora*. Эти данные говорят о том, что мутация отдельного гена приводит к исчезновению одного фермента. Ниже, в гл. XIII, мы еще остановимся на этом вопросе более подробно.

С другой стороны, на процесс синтеза многих ферментов значительное влияние оказывают определенные метаболиты. Обычно, хотя и не всегда, это либо субстраты, либо продукты соответствующих реакций. Наличие гена само по себе не является гарантией того, что данный активный фермент будет образовываться в значительных количествах; нередко для этого требуется еще и присутствие «индуктора» (по большей части это субстрат фермента или родственное ему низкомолекулярное вещество), который может усилить образование фермента в сотни и тысячи раз, не оказывая сколько-нибудь заметного влияния на синтез других ферментов. Этот феномен индукции ферментов особенно хорошо выражен у микроорганизмов, и на них его проще всего наблюдать. В животном организме, напротив, состав среды, окружающей клетки, остается сравнительно постоянным, и поэтому содержание ферментов в каком-либо органе у данного вида не испытывает в норме очень больших колебаний. Однако и в тканях животных неоднократно наблюдалась индукция. В одном случае имело место десятикратное увеличение количества алкогольдегидрогеназы в почках крыс, к рациону которых на протяжении месяца добавляли спирт [1544]; в другом случае наблюдали увеличение количества аргиназы в печени крыс, получавших рацион с высоким содержанием белков (вследствие чего в их организме должен был усиливаться процесс превращения аргинина в мочевину) [1702].

Процессом, противоположным индукции, является «репрессия», т. е. специфичное торможение синтеза определенного фермента в результате накопления продукта той реакции, которую этот фермент катализирует. Так как увеличение количества данного фермента в клетке должно приводить к уменьшению концентрации его субстрата и увеличению концентрации продукта реакции, то ясно, что в результате индукции и репрессии должен усиливаться синтез тех ферментов, которых не хватает, а синтез ферментов, имеющихся в избытке, должен, напротив, приостанавливаться.

Теперь мы обсудим механизм действия этих контролирующих факторов более подробно, начав с биосинтеза белка, осуществляемого под контролем генов.

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Сведения в этой области накапливаются в настоящее время с феноменальной быстротой; действительно, это один из тех вопросов, по поводу которых можно сказать, что данные, касающиеся их, устаревают еще до публикации. Самое большее, что мы можем сделать, — это осветить состояние вопроса к моменту написания книги. Механизм биосинтеза белка представляет особый интерес для энзимолога не только потому, что речь идет о процессе, от которого зависит и синтез ферментов, но также еще и потому, что в основе этого процесса лежит исключительно интересный феномен — специфичность ферментов.

Из наиболее полных обзоров по этому вопросу, охватывающих период вплоть до 1961 г., мы можем упомянуть обзоры Раакке [2137], Мак-Квиллена [1672] и Гейла [808]; в обзоре Гейла приводится список новейших работ.

Основным местом синтеза белка являются рибосомы — рибонуклеопротеидные частицы диаметром около 150 Å, отличающиеся высокой электронной плотностью. Эти частицы в большом числе рассеяны по всей клетке; возможно, что они имеются даже внутри ядра и митохондрий. Действительно,

некоторое (небольшое) количество белка синтезируется в ядре и митохондриях; однако в основном синтез белка протекает в цитоплазме, вне этих структур. Вебстер и Линглер [1010] продемонстрировали синтез нескольких ферментов, в том числе АТФ-азы, фосфоглюкомутазы, альдолазы и пируваткиназы в системе изолированных рибосом.

Природа белка, образуемого рибосомами, определяется генами. В настоящее время совершенно ясно, что ген содержит подробную информацию о последовательности аминокислот в молекуле того фермента или белка, синтез которого он контролирует. Эта информация копируется при удвоении хромосом и может таким образом передаваться без изменений от клетки к клетке на протяжении миллионов генераций. Она передается также внутри клетки от гена к рибосоме, благодаря чему эта рибосома осуществляет синтез молекул белка именно с данной, определенной последовательностью аминокислот.

В основе механизма биосинтеза белка лежит: а) действие полинуклеотидных матриц, которые определяют последовательность аминокислот в цепях, синтезируемых при участии ферментов, уже упоминавшихся в гл. IX, б) выраженная тенденция к ассоциации у полинуклеотидных цепей с комплементарной последовательностью оснований и в) двоякая специфичность лигаз подгруппы 6.1.1 — по отношению к аминокислотам, с одной стороны, и по отношению к определенным нуклеотидным последовательностям — с другой.

Ген представляет собой участок дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), т. е. длинную цепь нуклеотидов, отличающихся друг от друга только характером пуриновых или пиримидиновых оснований. Информация, определяющая последовательность аминокислот в синтезируемом белке или ферменте, должна поэтому быть закодирована в гене в форме определенной последовательности нуклеотидов. Механизм биосинтеза должен обеспечивать не только передачу информации от гена к рибосоме, но также и перевод этой информации с одного «языка» на другой — из последовательности нуклеотидов в последовательность аминокислот.

Передача информации осуществляется ферментом, использующим молекулу ДНК гена как матрицу для построения молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК), у которой последовательность нуклеотидов строго комплементарна последовательности нуклеотидов в матричной ДНК. Образовавшаяся «информационная» РНК переходит к рибосоме, соединяется с ней и, действуя в качестве матрицы, заставляет рибосому синтезировать именно данный, а не какой-нибудь другой белок.

Перевод информации с языка нуклеиновых кислот на язык белка (процесс *трансляции*) осуществляется лигазами подгруппы 6.1.1; для каждой аминокислоты имеется, по-видимому, своя лигаза. Эти ферменты прикрепляют к аминокислоте нечто вроде «бирки» с адресом — низкомолекулярную *растворимую*, или *транспортную*, РНК (*s*-РНК) с определенной последовательностью нуклеотидов, различной для разных аминокислот. Аминокислоты с такой «биркой» под действием фермента, активного в присутствии ГТФ, соединяются в определенной последовательности на рибосоме; порядок, в котором они при этом располагаются (в строящейся белковой цепи), определяется соответствием (*комплементарностью*) между последовательностью нуклеотидов в РНК-матрице и последовательностью нуклеотидов в «бирках», присоединенных к аминокислотам. Отделение вновь синтезированной белковой цепи от рибосомы осуществляется еще одним растворимым ферментом, действие которого зависит от АТФ.

Значительная часть сведений, на которых базируется приведенная выше схема, получена в опытах с бактериями и с ДНК, выделенной из бактериофагов. Однако в основном тот же механизм удалось наблюдать и в опытах с рибосомами из растительных и животных тканей. Ниже мы обсудим более подробно различные этапы процесса биосинтеза белка.

Репликация генной ДНК

Молекула ДНК обычно состоит из двух комплементарных дезоксирибонуклеотидных цепей, скрученных вместе в спираль [2797]. Цепь из остатков дезоксирибозы, соединенных между собой фосфатными группами, располагается снаружи, а основания лежат внутри спирали; каждое пуриновое основание одной спарено с пиримидиновым основанием другой цепи. Спаривание осуществляется с помощью водородных связей, а конфигурация оснований такова, что аденин образует пару только с тимином, а гуанин только с цитозином. Именно эту возможность образования пар и имеют в виду, когда говорят, что две цепи комплементарны. Ясно, что состав и последовательность оснований в одной цепи определяют состав и последовательность оснований в другой цепи. Дезоксирибозофосфатные цепи в такой двухцепочечной структуре *антипараллельны*, т. е. если в одной цепи каждая фосфатная группа присоединена к верхнему остатку пентозы в положении 3′ и к нижнему остатку в положении 5′, то в другой цепи каждая фосфатная группа присоединена к верхнему остатку пентозы в положении 5′ и к нижнему остатку в положении 3′ (см. [1270]). Обычно цепи имеют очень большую длину — до 10 000 нуклеотидов и более. На фиг. 131 изображен короткий участок цепи, а на фиг. 132 схематически представлено спаривание оснований в молекуле ДНК.

У РНК (хотя в определенных условиях и она может образовывать двухцепочечную структуру, состоящую из комплементарных цепей) способность принимать спиральную конфигурацию выражена не столь сильно из-за наличия дополнительного атома кислорода в положении 2. По всей вероятности, обычно в молекуле РНК имеется лишь ряд небольших спирализованных участков, на долю которых приходится в общей сложности около половины всех нуклеотидов молекулы [649].

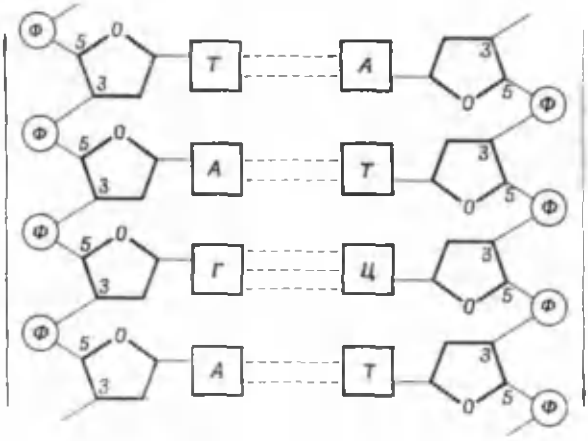
Однако растворимая РНК (*s*-РНК), которая имеет несколько иной состав оснований (см. стр. 428), по-видимому, существует преимущественно в виде двойной спирали. Спенсер и др. [2482] на основе рентгеноструктурного анализа кристаллической *s*-РНК дрожжей (представляющей собой, очевидно, смесь всех двадцати видов *s*-РНК) пришли к выводу, что каждая молекула сложена в средней точке пополам и свернута в виде двухцепочечной спирали, причем последовательность нуклеотидов в одной половине молекулы комплементарна последовательности нуклеотидов в другой ее половине.

Репликация ДНК осуществляется при участии фермента 2.7.7.7. Этот фермент был выделен из бактерий и очищен приблизительно в 4000 раз Корнбергом и др. [1429, 1532]. Удалось его выделить также и из других источников, например из тимуса [283]. Действие этого фермента, представляющего в ряде отношений особый интерес, заключается в переносе нуклеотидильных групп с дезоксирибонуклеозидтрифосфата на конец цепи ДНК, в результате чего освобождается пирофосфат, а цепь удлиняется на один нуклеотид.

Для реакции необходимы трифосфаты — в присутствии дифосфатов она не идет; специфичность проявляется и по отношению к углеводному компоненту — фермент нуждается в дезоксирибонуклеозидтрифосфатах и не действует на рибонуклеозидтрифосфаты. По отношению к пуриновым и пиримидиновым основаниям активный центр фермента не обнаруживает никакой специфичности. Поэтому при повторении данной реакции многие тысячи раз может быть построена полная цепь ДНК из смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Однако включение различных нуклеотидов не носит случайного характера; необходимая последовательность оснований в любом данном участке цепи обеспечивается наличием преформированной молекулы ДНК, действующей как матрица.



Фиг. 131. Двухцепочечная спирализованная структура ДНК [551].
Небольшими черными кружками обозначены фосфатные группы, светлыми пятиугольниками — кольца дезоксирибозы, черными пяти- и шестиугольниками — кольца пуринов и пиримидинов, пунктирными линиями — водородные связи.



Фиг. 132. Спаривание оснований в ДНК [1270].

Фермент совершенно неактивен в отсутствие ДНК-матрицы. Двухцепочечная ДНК не может служить матрицей; предварительно ее цепи должны быть разделены, что может быть достигнуто, например, под влиянием нагревания [283]. Затем матричная цепь соединяется с ферментом, и фермент строит на ней новую комплементарную цепь ДНК — точную копию той, с которой она была соединена ранее [1270]. Таким путем образуется двухцепочечная молекула ДНК, во всех отношениях идентичная исходной молекуле; и так как описанный процесс происходит с каждой из двух цепей исходной молекулы, то вместо одной исходной молекулы ДНК образуются две.

В каждой новой молекуле одна цепь — это всегда цепь, образовавшаяся вновь, а другая — исходная, оставшаяся неизмененной. То, что подобный механизм действует и in vivo, показали Мезельсон и Сталь [1801] в изящных опытах с изотопами. ДНК, содержащая N^{15} вместо N^{14}, несколько отличается от обычной ДНК по молекулярному весу, так что ее можно отделить от «немеченой» ДНК ультрацентрифугированием. Бактерии выращивали в среде, содержащей N^{15}, до тех пор, пока их ДНК не оказывалась полностью меченной по азоту («тяжелая ДНК»); такая ДНК давала при ультрацентрифугировании одну полосу, отграниченную от полосы обычной («легкой») ДНК. Затем эти бактерии переносили в среду, содержащую только N^{14}. После одной генерации их ДНК тоже давала только одну полосу, но эта полоса занимала промежуточное положение: ни «легкой», ни «тяжелой» ДНК обнаружить не удавалось. Следовательно, после одной генерации каждая молекула ДНК состояла из одной (исходной) «тяжелой» нити и одной (новой) «легкой» нити. ДНК из клеток второй генерации давала две полосы: одна из них соответствовала промежуточной, а другая —«легкой» ДНК. «Легкая» и «тяжелая» нити промежуточной ДНК служили матрицами, на которых образовывались молекулы «легкой» и промежуточной ДНК соответственно. «Легкая» и «тяжелая» нити промежуточной ДНК могли быть разделены в неповрежденном состоянии.

Переходя к рассмотрению вопроса о том, каким образом действует матрица, мы едва ли можем предположить, что вся молекула соединяется с ферментом и располагается на его поверхности, оставаясь неподвижной все то время, пока на ней строится новая цепь. Столь же мало вероятно, чтобы одна молекула фермента содержала 10 000 активных центров, специфичных по отношению к дезоксирибозотрифосфатной структуре (что, по-видимому, было бы необходимо, если бы матрица оставалась фиксированной в течение всего процесса). Значительно более вероятно, что матрица постепенно перемещается относительно активного центра фермента, так что каждый из ее нуклеотидов в процессе построения комплементарной цепи поочередно проходит мимо активного центра. В таком случае матричная цепь должна подаваться к активному центру, как подается перфолента в вычислительной машине. Однако, учитывая размеры матричной молекулы, быть может, лучше предположить, что активный центр фермента перемещается вдоль цепи. Мысль о том, что активный центр фермента перемещается вдоль молекулы субстрата, не нова; при расщеплении длинной полисахаридной цепи под действием β-амилазы или α-глюканфосфорилазы должно иметь место подобное же явление. Во всех случаях положение активного центра относительно цепи определяется концом цепи; в последних двух случаях оно определяется концом полисахаридной цепи, претерпевающей распад, а в случае ДНК — концом синтезируемой цепи.

Мы, вероятно, можем рассматривать определенный нуклеотид ДНК-матрицы, находящейся в данный момент у активного центра фермента, как некую часть «полного» активного центра, присоединяющуюся к активному центру фермента на время и тем самым завершающую его структуру, т. е. придающую ему специфичность по отношению к пуриновым и пиримиди-

новым основаниям, отсутствовавшую у исходной неизменной части его структуры. Основание, входящее в состав этого нуклеотида, в силу особого расположения тех его групп, которые участвуют в образовании водородных связей, сообщает активному центру специфическое сродство к нуклеотиду, содержащему комплементарное основание, который затем и присоединяется к концу строящейся цепи. Если, например, этот матричный нуклеотид содержит гуанин, то «полный» активный центр будет специфически включать в строящуюся цепь только нуклеотид цитозина; цитозин при этом будет связываться водородными связями с гуанином, а фосфат — присоединяться к дезоксирибозе в конце новой цепи. Удлинение цепи приведет к тому, что на место у активного центра встанет следующий матричный нуклеотид и специфичность активного центра соответствующим образом изменится. Таким путем может осуществляться точная репликация; более того, новая цепь уже при образовании будет связываться водородными связями с матричной ДНК и двухцепочечная структура будет, несомненно, принимать спиральную конфигурацию при удалении от активного центра (по мере роста цепи).

Как и следовало ожидать, реакция идет только в том случае, если присутствуют все четыре нуклеозидтрифосфата. Ниже приведены данные [239], характеризующие включение дезоксицитидиловой кислоты (дЦМФ) в ДНК под действием ДНК-нуклеотидилтрансферазы (2.7.7.7):

Добавленные компоненты реакции	*Включение дЦМФ, мкмкмоль*
дЦТФ	2,5
дЦТФ + дГТФ	5,1
дЦТФ + дГТФ + дТТФ	15,7
дЦТФ + дГТФ + дТТФ + дАТФ	3300

Аналогичные результаты были получены и для трех других нуклеотидов. Если в реакционную смесь добавлен только один из четырех нуклеотидов, то наблюдается незначительное включение, а затем реакция останавливается. Вероятно, в этом случае молекулы фермента включают только те нуклеотидные остатки, на включение которых они «настроены», и если следующий требуемый нуклеотид отсутствует, то процесс продолжаться не может. Можно думать, что наличие всех компонентов реакции необходимо во всех тех случаях, когда последовательность присоединения этих компонентов контролируется матрицей.

Образование информационной РНК

Синтез информационной РНК (*m*-РНК) катализируется РНК-нуклеотидилтрансферазой (2.7.7.6), которая во многом сходна с ферментом, описанным выше. РНК-нуклеотидилтрансфераза также строит полинуклеотидные цепи из нуклеозидтрифосфатов, и этот процесс тоже зависит от наличия ДНК-матрицы, которая определяет последовательность оснований во вновь синтезируемой цепи. Однако она использует для синтеза рибонуклеозидтрифосфаты и не действует на дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, так как она строит цепи РНК (комплементарные цепям ДНК-матриц) (см. [417, 2009, 2827, 2829]). Все четыре нуклеозидтрифосфата необходимы для включения любого из них. Кроме того, необходима еще и ДНК, и синтезируемая РНК по составу оснований всегда комплементарна матричной ДНК; это было установлено с ДНК из целого ряда источников, у которой состав оснований очень сильно варьировал. Спаривание оснований происходит здесь не совсем так, как в предыдущем случае, поскольку соединяются различные цепи — ДНК и РНК; тимину в матрице соответствует аденин в РНК,

но аденину в матрице соответствует в РНК не тимин, а урацил, так как тимин (метилурацил) не входит в состав РНК.

Информационная РНК [1225] составляет лишь небольшую часть суммарной РНК клетки, но она очень быстро обновляется, т. е. быстро образуется (в несколько сот раз быстрее, чем любая другая РНК) и быстро разрушается в процессе синтеза белка в рибосомах. Поэтому во время синтеза белка информационная РНК непрерывным потоком течет из ядра к рибосомам. Очень быстрое новообразование *m*-РНК можно наблюдать после инъекции в клетку чужеродной ДНК, например после инъекции фаговой ДНК в бактериальную клетку.

При образовании информационной РНК обе цепи ДНК служат матрицами, так что образуются две комплементарные цепи РНК [820]. По-видимому, только одна из них способна принимать участие в биосинтезе белка; у другой последовательность нуклеотидов комплементарна той, какая необходима для присоединения транспортной РНК (т. е. той «бирки», которой бывает снабжена каждая аминокислота). Судьба этой цепи РНК и ее функция (если только она вообще несет какую-нибудь функцию) пока неизвестны.

Связывание аминокислот с *s*-РНК

Связывание аминокислот транспортной РНК катализируется лигазами (синтетазами)[1] подгруппы 6.1.1, которые осуществляют реакции типа

$$\text{Аминокислота} + s\text{-РНК} + \text{АТФ} = \text{Аминоацил-}s\text{-РНК} + \text{АМФ} + \text{Пирофосфат}. \quad \text{(XI.1)}$$

Это типичная синтетазная реакция, в которой соединение двух молекул сопровождается расщеплением молекулы АТФ. Механизм таких реакций уже обсуждался в гл. VII.

Несколько лигаз было выделено и получено в высокоочищенном состоянии. В настоящее время мы располагаем данными, говорящими о том, что каждая аминокислота имеет свой фермент. По-видимому, каждый фермент обладает также выраженной специфичностью по отношению к определенной *s*-РНК; иными словами, имеется много *s*-РНК, отличающихся последовательностью нуклеотидов, и каждая из них благодаря отчетливо выраженной двоякой специфичности ферментов присоединяется только к одной определенной аминокислоте.

Таким образом, каждая аминокислота соединяется с определенной последовательностью нуклеотидов, по-видимому — с тремя нуклеотидами (см. ниже раздел, посвященный кодированию), и мы можем предположить, что эта последовательность комплементарна последовательности нуклеотидов, которая соответствует данной аминокислоте в *m*-РНК, функционирующей как матрица при синтезе белка на рибосоме. Известно, например, что фенилаланину соответствует в матрице определенная последовательность (по-видимому, из трех) УМФ-нуклеотидов. Если лигаза для фенилаланина специфична по отношению к *s*-РНК, содержащей соответствующую последовательность АМФ-нуклеотидов, то спаривание комплементарных оснований будет гарантией того, что именно фенилаланин, а не какая-либо другая аминокислота включится в полипептидную цепь в местах, соответствующих УМФ-последовательности. Таким путем нуклеотидная последовательность матрицы (а значит, и соответствующего гена) переводится в аминокислотную последовательность и различные аминокислоты соединяются

[1] Их часто называют также «ферментами, активирующими аминокислоты». Это название неудачно. Все ферменты активируют свои субстраты, и такое название не дает возможности отличить ферменты данной подгруппы от других ферментов, тоже активирующих аминокислоты, например от тех, которые входят в подгруппы 1.4.1, 2.6.1, 4.1.1, 5.1.1 и т. д. Более того, оно не дает представления о характере реакции. Международная Комиссия по ферментам рекомендует не употреблять это название (см. Правило 5 в гл. V).

в требуемом порядке, образуя цепь того белка или того фермента, который определяется геном.

Следует отметить, что именно лигазы «переводят» нуклеотидную последовательность в аминокислотную; нуклеотидный код, заключенный в генах, реализуется в этих ферментах в форме их специфичности. Никаких видимых предпосылок химического характера для присоединения данной аминокислоты к ее специфичной *s*-РНК нет, и единственная причина, обусловливающая это присоединение, состоит в том, что фермент специфичен и к данной аминокислоте и к данной *s*-РНК.

s-РНК служит «адаптором» (термин Крика), т. е. дает возможность аминокислоте занять определенное место на матрице. Если аминокислота уже присоединилась к «своей» *s*-РНК и покинула лигазу, то ее местоположение на матрице определяет исключительно *s*-РНК, а химические изменения в самой аминокислоте не оказывают влияния. Шапвиль и др. [429] ферментативным путем присоединили цистеин к специфичной *s*-РНК, в результате чего образовалось соединение Цис-*s*-РНК$_{\text{Цис}}$. При действии на образовавшийся молекулярный комплекс никелевого катализатора остаток цистеина превратился в остаток аланина, что привело к образованию Ала-*s*-РНК$_{\text{Цис}}$. В рибосомной системе такой аланин вел себя как цистеин и при включении в белок занимал место цистеина.

К настоящему времени в достаточно очищенном виде получено лишь небольшое число *s*-РНК; однако на основании имеющихся данных уже и сейчас можно сделать вывод, что для каждой аминокислоты имеется по крайней мере одна специфичная *s*-РНК. Молекулы *s*-РНК по сравнению с молекулами других форм РНК невелики: они состоят всего из 100—200 нуклеотидов. Концевой фрагмент одинаков у всех молекул *s*-РНК: два остатка ЦМФ и один остаток АМФ (последний располагается на самом конце) [1048]. Одна молекула *s*-РНК способна присоединить только одну молекулу аминокислоты; при этом образуется сложноэфирная связь между карбоксилом аминокислоты и гидроксилом в положении 2′ или 3′ рибозы, входящей в состав концевого нуклеотида (АМФ). Это позволяет выделить отдельные специфичные *s*-РНК из смеси, имеющейся в клетке, так как соединение с аминокислотой предохраняет данный остаток рибозы от действия периодата, к которому он в свободном состоянии чувствителен. Если инкубировать смесь *s*-РНК с избытком какой-нибудь одной аминокислоты в присутствии лигазы этой аминокислоты, а затем подвергнуть эту смесь действию периодата, то *s*-РНК, соединившаяся с аминокислотой, окажется устойчивой к периодату, тогда как все другие *s*-РНК будут им инактивированы и могут быть превращены в производные, которые легко удалить (см. [1010]).

Поскольку три концевых нуклеотида, примыкающие к аминокислоте, одинаковы у всех *s*-РНК, специфичность *s*-РНК должна определяться другими, более удаленными частями цепи. Всего вероятнее, что положение на матрице определяют нуклеотидные остатки, расположенные в молекуле *s*-РНК непосредственно после ее концевого тринуклеотидного звена; какая часть цепи определяет специфичность *s*-РНК по отношению к лигазам, это еще пока не известно. Следует особо отметить, что *s*-РНК отличаются от других форм РНК тем, что они содержат необычные основания, например метилированные пурины и пиримидины; до 25% урацила может быть также присоединено к рибозе не через один из атомов азота, а через атом углерода в положении 5 (в результате чего образуется псевдоуридин).

Видовая специфичность лигаз и *s*-РНК выражена, по-видимому, слабо, и взаимозаменяемость препаратов, полученных из различных источников, свидетельствует о том, что один и тот же нуклеотидный код если и не универсален, то по крайней мере очень широко распространен. Известны, однако, и некоторые примеры видовой специфичности при взаимодействии *s*-РНК и лигаз. Лейцинспецифичные лигазы и *s*-РНК из дрожжей и из печени крыс

взаимозаменяемы, но ни одна из этих лигаз не обнаруживает активности с *s*-РНК из *E. coli*; в то же время лигаза из *E. coli* активна со «своей» *s*-РНК и неактивна с *s*-РНК из дрожжей или печени [2209]. Видовые различия могут быть выражены в разной степени в зависимости от природы аминокислоты: присоединение лизина к *s*-РНК из *E. coli* может осуществляться с равным успехом в присутствии лигазы как из дрожжей, так и из *E. coli*, но присоединение аргинина к *s*-РНК из *E. coli* дрожжевая лигаза катализировать не может [209]. Эти данные не обязательно указывают на различия в кодировании; видовые различия могут затрагивать ту часть цепи *s*-РНК, которая лежит вне кодирующего участка.

Образование белков на рибосомах[1]

Рибосомы состоят из примерно равных количеств белка и высокомолекулярной РНК. Оба компонента сравнительно стабильны; состав их варьирует мало, и они не претерпевают такого быстрого обновления, как информационная РНК. Рибосомы несут, по-видимому, структурную функцию, образуя основу, на которой удерживается матрица и происходит сборка белковой цепи. Они содержат большое количество воды (в несколько раз превосходящее их собственный вес) и могут иметь губчатую структуру. РНК в рибосомах расположена по периферии частиц и не покрыта белком, как в вирусных нуклеопротеидах. Эта РНК значительно отличается по составу от *s*-РНК и информационной РНК. Вопрос о структуре рибосом подробно обсуждается в работе Мак-Квиллена [1672].

С помощью электронного микроскопа установлено, что рибосомы, полученные из *E. coli*, состоят из двух частей: меньшей и большей (превосходящей первую приблизительно в 2 раза) [1201]. В определенных условиях эти части могут разделяться и рекомбинировать. Каждая из них сама по себе осуществляет лишь очень незначительное включение аминокислот; почти все включение происходит при участии «двойной» структуры. Значение этого явления неизвестно, но Тиссьер и др. [2660] высказали предположение, что белок синтезируется в том месте, где обе части рибосомы соединяются, и что он отделяется от рибосомы в тот момент, когда эти части расходятся.

По-видимому, в любой данный момент времени лишь небольшая доля всех рибосом клетки участвует в синтезе белка [2660]. Это, вероятно, связано с тем, что для всех рибосом не хватает информационной РНК. Те рибосомы, которые соединяются с информационной РНК, включают аминокислоты по крайней мере в 40 раз активнее, чем другие (а может быть, и еще гораздо быстрее). Информационная РНК в присутствии Mg^{2+} спонтанно соединяется со свободными рибосомами, и, поскольку информационная РНК имеет молекулярный вес порядка $1 \cdot 10^6$, вес рибосом в результате этого соединения значительно возрастает. Это дает возможность отделить в ультрацентрифуге нагруженные рибосомы от ненагруженных. Проведя такое разделение, можно показать, что биосинтетическая активность свойственна «тяжелым» рибосомам, т. е. тем, которые несут молекулу информационной РНК [2225].

«Посадка» аминоацил-*s*-РНК на матрицу, находящуюся в комплексе с рибосомой, протекает не спонтанно; это ферментативная реакция, катализируемая растворимым ферментом, который в настоящее время удалось уже частично очистить [1929, 2604]. Природа процесса включения аминокислот во многом еще не ясна, однако, поскольку в этом процессе принимает участие ГТФ (на каждый включенный остаток аминокислоты расщепляется одна молекула ГТФ [2810]), можно думать, что речь идет о реакции синте-

[1] Современное представление о структуре рибосом и их участии в синтезе белка изложено в сборнике «Биосинтез белка и нукленновых кислот» (Изд-во «Наука», 1965). — *Прим. ред.*

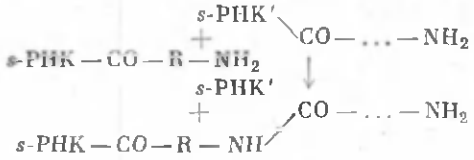
тазного типа. В результате этой реакции аминокислота присоединяется к концу растущей полипептидной цепи и молекула *s*-РНК освобождается. Освободившаяся (в неизмененном виде и активном состоянии) молекула *s*-РНК может вновь соединиться с аминокислотой. Таким образом, в этом процессе молекулы *s*-РНК функционируют как коферменты или переносчики аминокислот [1929].

Фермент, осуществляющий перенос, не специфичен по отношению к аминокислотам, к *s*-РНК и к матрице. Поэтому один и тот же фермент может катализировать перенос всех аминокислот. Однако он проявляет выраженную видовую специфичность по отношению к рибосомам. Фермент, выделенный из *E. coli*, не обнаруживает активности с рибосомами печени, а фермент из печени — с рибосомами из *E. coli* [1929]. Эти данные, по-видимому, свидетельствуют о том, что фермент соединяется с нуклеопротеидом рибосомы.

В опытах in vitro удалось определить скорость присоединения аминокислот к полипептидной цепи: около двух аминокислотных остатков в секунду [611]. При заражении бактерии фагом молекулы новых ферментов появляются в ней через 2 или 3 *мин* после инъекции фаговой ДНК.

До сих пор еще не совсем ясен механизм «сборки» полипептидных цепей. Данные, полученные в опытах с изотопами, а также с применением некоторых других методов, говорят против беспорядочного роста отдельных фрагментов пептида в разных участках матрицы и последующего соединения таких фрагментов в единую цепь; скорее они свидетельствуют о том, что рост полипептидной цепи происходит лишь с одного конца путем ряда последовательных актов присоединения аминокислот. Что касается того, с какого конца полипептидной цепи начинается синтез, то на этот счет мнения расходятся, однако Динцис [611] пришел к заключению, что наиболее убедительные доказательства говорят о том, что синтез молекулы белка начинается с N-конца. Это подтверждается также наблюдениями, которые сделали Бишоп и др. [252]. Эти авторы, исследуя биосинтез гемоглобина, нашли, что в первый период имеет место очень слабое включение меченого валина в участок, который станет N-концевым в молекуле белка. Эти данные заставляют думать, что в частично сформированных цепях молекулы гемоглобина N-концевой участок уже синтезирован. Такое же заключение может быть сделано и при анализе результатов Ваба и др. [2748] (след. раздел).

Это значит, что процесс осуществляется путем переноса карбоксильного конца синтезированной части цепи от ее *s*-РНК на аминогруппу аминокислотного остатка (R), который должен быть присоединен. Ниже показано, как это происходит (пунктирная линия означает синтезированную часть цепи).



(XI.2)

Полипептидная цепь несет только одну молекулу *s*-РНК, присоединенную к ее С-концу; поэтому она теряет свое специфическое сродство к матрице и, по-видимому, каким-то образом удерживается на рибонуклеопротеиде рибосомы. Сформированная цепь не покидает рибосому спонтанно; отделение ее от рибосомы происходит под действием другого растворимого фермента, который для проявления своей активности нуждается в АТФ [1010]. Механизм действия этого фермента неизвестен. В настоящее время фермент удалось частично очистить, причем выяснилось, что он нестабилен. Действие пуромицина, который тормозит синтез белка, сводится, вероятно, к тому, что он вызывает отделение от рибосом всех пептидных фрагментов, т. е. незавершенных белковых молекул [1929].

Информационная РНК в процессе синтеза белка так быстро разрушается, что в среднем каждая ее молекула участвует в образовании всего лишь одной молекулы белка [2662]. Именно по этой причине для синтеза белка требуются стехиометрические количества информационной РНК (и только каталитические количества *s*-РНК) [1971]. Разрушение информационной РНК протекает в присутствии АТФ и растворимого фермента, а также рибосом. Возможно, что разрушение связано с отделением полностью синтезированных молекул белка от рибосом.

В большинстве опытов, проводимых с рибосомами in vitro, аминокислоты легко включаются в синтезируемый белок, но поставить опыт так, чтобы можно было зарегистрировать образование свободного растворимого белка, обычно бывает трудно. Вебстер объясняет это недостатком фермента, под действием которого происходит отделение белка от рибосом.

Природа полинуклеотидного кода

В настоящее время один из наиболее интересных вопросов — это вопрос о природе биологической системы кодирования, основанной на том, что различные аминокислоты представлены в генах и матрицах определенной последовательностью нуклеотидов. Исследования в этой области ведутся весьма интенсивно и приносят большие успехи.

Поскольку в состав белков входит около двадцати видов аминокислот, а в состав ДНК — только четыре вида нуклеотидов, то ясно, что каждая аминокислота должна быть закодирована комбинацией из нескольких нуклеотидов. Из двух нуклеотидов можно составить только 16 различных сочетаний — число, недостаточное для того, чтобы закодировать 20 различных аминокислот. Три нуклеотида обеспечивают 64 возможных сочетания, т. е. более чем достаточное число «кодовых слов».

При изучении мутаций Крик и др. [519] получили убедительные данные, свидетельствующие о том, что код является «триплетным», т. е. что каждая аминокислота закодирована последовательностью из трех нуклеотидов и каждый следующий триплет в полинуклеотидной цепи кодирует следующую аминокислоту в полипептиде. Мутации генов рассматриваются в гл. XIII; здесь же нам достаточно сказать, что они есть следствие ошибок при репликации ДНК, т. е. либо замещения одного из оснований каким-нибудь другим, либо добавления или выпадения нуклеотида. Такие ошибки (воспроизводящиеся затем при репликации мутантной ДНК) в естественных условиях очень редки — порядка $1:10^6$,— но частоту их можно значительно повысить с помощью «мутагенных веществ», например аналогов природных оснований или веществ, которые способны включаться в полинуклеотидную цепь между двумя нуклеотидами.

Замещение одного основания в ДНК другим приведет к тому, что в синтезирующемся ферменте один из аминокислотных остатков будет заменен на какой-либо другой. Эта замена может, однако, и не оказать заметного влияния на активность фермента, если только не будет затронут его активный центр. Иначе обстоит дело при добавлении или выпадении нуклеотида. При этом меняются все аминокислоты, начиная с той точки, которая соответствует происшедшей ошибке, и если в каком-то участке возникнет бессмысленный триплет, то синтез может вообще остановиться. Например, последовательность оснований матрицы ...УУЦАУГУЦУУГАГУЦ будет считываться (справа; см. ниже) как УУЦ.АУГ.УЦУ.УГА.ГУЦ, но если добавится дополнительный нуклеотид ГМФ и полинуклеотид примет вид ...УУЦАУГГУЦУУГАГУЦ, то данный код будет читаться как У.УЦА.АГГ.УЦУ.УГА.ГУЦ. Крик и др. показали, что влияние добавления одного нуклеотида может быть нейтрализовано выпадением другого нуклеотида вблизи места первой ошибки (если только в промежутке между

этими двумя ошибками не возникнет бессмысленный триплет). Это выпадение восстанавливает нормальное считывание информации, так что в полипептидной цепи синтезированного фермента измененным окажется (по сравнению с нормальным белком) только один небольшой участок. Те же авторы показали, что влияние делеции (выпадения) может быть нейтрализовано двумя другими достаточно близко произошедшими делециями. Этого и следует ожидать при триплетном коде, так как в этом случае выпадение трех нуклеотидов должно восстанавливать нормальное считывание информации на остальном участке цепи (разумеется, при дублетном или каком-нибудь ином коде выпадение трех нуклеотидов не приведет к такому результату).

Сведения о том, какие комбинации нуклеотидов в коде соответствуют определенным аминокислотам, могут быть получены тремя путями: а) в опытах с использованием в качестве рибосомных матриц синтетических полинуклеотидов известного состава (вместо информационной РНК из природных источников); б) при наблюдении эффектов, вызываемых химическим превращением некоторых оснований, входящих в состав нуклеотидов; в) путем дедукции — на основании тех случаев замещения аминокислот в белках, которые удается наблюдать в природе.

Фермент 2.7.7.8 отличается от упомянутых выше нуклеотидилтрансфераз тем, что он строит цепи РНК из нуклеозид*ди*фосфатов и не нуждается в присутствии ДНК-матрицы. Поскольку для него матрица не определяет последовательности оснований, он, по-видимому, включает нуклеотиды беспорядочно — в тех соотношениях, в которых они присутствуют в инкубационной смеси; более того, он действует даже и в том случае, если в среде присутствует только один нуклеозиддифосфат. Так, используя УДФ, он строит полинуклеотидную цепь, состоящую исключительно из УМФ (поли-У). Было обнаружено, что синтетические полинуклеотиды с различной комбинацией оснований вызывают включение разных аминокислот. Под действием поли-У синтезируется, например, белок, состоящий исключительно из остатков фенилаланина [1971]; поэтому мы можем считать, что кодирующим триплетом для фенилаланина служит УУУ. Используя синтетические полинуклеотиды, содержащие несколько различных оснований, и сопоставляя включение тех или иных аминокислот с теоретически рассчитанной вероятностью наличия различных триплетов, две группы исследователей — группа Очоа [2483] и группа Маттеи [1759]— определили код для большинства аминокислот (табл. 34). Как видно из табл. 34, данные, полученные этими авторами, достаточно хорошо совпадают. Следует подчеркнуть, что в таблице указан только состав триплетов, а не последовательность содержащихся в них нуклеотидов. Триплеты, приведенные в таблице,— это код информационной РНК; коды генной ДНК и (по всей вероятности) растворимых РНК представлены комплементарными триплетами.

Результаты, полученные с помощью других методов исследования, в значительной мере подтверждают правильность приведенных данных. Под действием азотистой кислоты цитозин дезаминируется и превращается в урацил, а аденин — в гипоксантин (который ведет себя при кодировании как гуанин). При обработке РНК вируса табачной мозаики азотистой кислотой возникает ряд мутантов, у которых наблюдаются замены некоторых аминокислот в белке; из 18 изученных случаев все (кроме пяти) могли быть предсказаны на основании такого рода химических изменений в нуклеотидах [1759, 2483]. Смит [2441] изучил 15 обнаруженных им в природе случаев замен отдельных аминокислот (в мутантном гемоглобине и в некоторых других белках) и показал, что почти все эти случаи можно объяснить, исходя из кода, приведенного в табл. 34, если допустить, что в соответствующих триплетах какое-нибудь одно пуриновое или пиримидиновое основание было замещено на другое.

Таблица 34

НУКЛЕОТИДНЫЕ ТРИПЛЕТЫ, КОДИРУЮЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Состав нуклеотидного триплета	Кодируемая аминокислота		Состав нуклеотидного триплета	Кодируемая аминокислота	
	код Очоа	код Маттеи		код Очоа	код Маттеи
УУУ	Фен	Фен	УУГ	Вал	Вал
УУЦ	Сер	Сер		Лей	Лей
	Лей	Лей		Цис	Цис
УЦЦ	Про	Про	УГГ	Три	Три
	Тре			Гли	Гли
УУА	Тир	Тир			Цис
	Илей	Илей	УГА	Мет	Мет
	Лей			Глу	Глу
УАА	Лиз	Лиз		Асп	
	Асп-NH_2		УЦГ	Арг	Арг
УАЦ	Гис			Ала	Ала
	Тре			Глу-NH_2	Сер
	Асп-NH_2				

Джукс [1275], использовав данные Ваба и др. [2748], проанализировал большое число аминокислотных замен, наблюдаемых при мутациях, и на основе такого анализа наметил предположительные последовательности нуклеотидов в триплетах. Ваба и др. [2748] с помощью фермента 2.7.7.8 получали производные поли-У с одним остатком АМФ или ГМФ, присоединенным к цепи «слева» (к 5′-гидроксильной группе поли-У), т. е. они получали АУУУУУУ ...У или ГУУУУУУ ...У. В качестве затравки для этого синтеза служили тринуклеотиды АУУ или ГУУ. Когда в такую систему вводили УДФ, фермент присоединял ряд остатков УМФ к 3′-гидроксилу затравки, т. е. строил полинуклеотиды указанного состава. Если затем в качестве рибосомной матрицы использовали АУУУУУУ...У, то часть образовавшихся молекул полифенилаланина содержала в С-концевом положении остатки тирозина, а если использовали ГУУУУУУ ...У, то вместо тирозина в цепи в том же положении находился цистеин. ААУУУУУ...У и ГГУУУУУ...У дали те же результаты, какие были получены, когда матрицы содержали только по одному остатку А или Г. Все это позволяет сделать следующие заключения.

1. *Последовательности* оснований АУУ и ГУУ кодируют тирозин и цистеин соответственно.

2. «Левая» часть полинуклеотидной цепи, т. е. конец со свободной 5′-гидроксильной группой, соответствует С-концевому участку синтезирующейся белковой молекулы.

3. Поскольку синтез белковой молекулы начинается с N-конца (см. выше), это означает, что полинуклеотидный код считывается «справа налево», т. е. с того конца, который несет свободную 3′-гидроксильную группу.

4. Принимая во внимание, что в силу самого метода их получения использованные в опыте полинуклеотиды должны были состоять из смеси молекул с разной длиной цепи, следует считать, что неполные триплеты не учитывались. Так, в случае цепи, состоявшей из $3x$ нуклеотидов, левый конец читался как АУУ.УУУ... и в С-концевой участок белковой молекулы включался тирозин; тот же результат получался и для цепи длиной $3x + 1$, т. е. для А.АУУ.УУУ..., тогда как при наличии цепи, содержавшей $(3x + 2)$

нуклеотида (АУ.УУУ...), включения тирозина не происходило. Триплетам ААУ и ГГУ, очевидно, не соответствуют никакие аминокислоты.

Исходя из известной последовательности оснований в кодирующих триплетах для тирозина и цистеина и проанализировав большое число аминокислотных замен, которые обнаруживаются в природных белках, Джукс [1275] смог определить последовательность нуклеотидов в 25 триплетах, соответствующих известным аминокислотам. Эти данные (табл. 35) должны рассматриваться как предварительные и, вероятно, в них потребуется внести некоторые изменения.

Таблица 35

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДОВ В КОДЕ, ПРИ ПОМОЩИ КОТОРОГО В МОЛЕКУЛЕ РНК ЗАШИФРОВАНЫ АМИНОКИСЛОТЫ [1275]

Последовательность нуклеотидов	Аминокислота	Последовательность нуклеотидов	Аминокислота
УУУ	Фен	УУГ	Вал
УЦУ	Сер	УГУ	Лей
ЦУУ	Сер	ГУУ	Цис
УУС	Лей	УГГ	Три
УЦЦ	Про	ГУГ	Гли
ЦУЦ	Про	УГА	Мет
АУУ	Тир	АУГ	Глу
УУА	Илей	ГУА	Асп
УАУ	Лей	ГУЦ	Арг
АУА	Лиз	ЦУГ	Ала
УАА	Асп-NH_2	УЦГ	Глу-NH_2
АУЦ	Гис		
УЦА	Тре		
ЦУА	Асп-NH_2		

Легко заметить, что в каждом триплете, приведенном в табл. 35, либо на первом, либо на втором месте стоит У. Всего можно составить 28 таких триплетов, и 25 из них приведены в таблице. Результаты, полученные Ваба и др. [2748] (см. выше пункт 4), дают основание считать, что триплетам ААУ и ГГУ не соответствуют никакие аминокислоты; и это как раз те триплеты, которые не содержат У ни на первом, ни на втором месте.

Хотя в деталях код, возможно, и потребует изменения, однако общий его характер, по-видимому, установлен достаточно хорошо. Более того, в настоящее время получены данные об одном и том же способе кодирования у весьма далеких видов, а это позволяет думать, что код универсален, т. е. что один и тот же код действует во всех живых клетках. Максвелл [1766], например, обнаружил одни и те же кодирующие триплеты для семи аминокислот в системах из печени млекопитающих и из клеток *E. coli*.

Однако кодирующий смысл могут иметь не только те сочетания нуклеотидов, которые приведены в табл. 35. Все эти триплеты содержат УМФ, но, может быть, этот факт просто отражает то обстоятельство, что все синтетические полинуклеотиды, с которыми ставились опыты, отличались высоким содержанием УМФ. Если бы in vivo использовались только такие триплеты, то информационная РНК должна была бы отличаться значительно более высоким содержанием УМФ от всех других известных видов РНК. Этот факт был использован как аргумент, говорящий в пользу существования дублет-

ного, а не триплетного кода [2233]. Наблюдаемую картину можно, однако, объяснить иначе, а именно тем, что кодировать данную аминокислоту могут и другие триплеты, не содержащие УМФ, т. е. что данная аминокислота кодируется не одним, а несколькими триплетами. Код, в котором каждая аминокислота кодируется несколькими триплетами, получил название «вырожденного», а код, в котором один триплет соответствует более чем одной аминокислоте,— «неоднозначного». Имеющиеся данные позволяют думать, что существующий код является вырожденным, но не является неоднозначным.

В табл. 35 можно обнаружить ряд примеров, когда данная аминокислота кодируется не одной последовательностью оснований, а несколькими. Эту вырожденность кода можно, по-видимому, объяснить существованием двух или более различных *s*-РНК для одной и той же аминокислоты. Действительно, Вейсблюм и др. [2826] выделили из *E. coli* две лейцинспецифичные *s*-РНК, которые вели себя по-разному в опытах с синтетическими полинуклеотидами. Говорят ли эти данные о существовании двух лигаз для лейцина — это пока еще не ясно. Возможно, что вырожденность кода является просто следствием того, что некоторые лигазы не обладают абсолютной специфичностью, но, может быть, за нею кроется и какой-то другой, значительно более важный смысл.

Степень вырожденности кода, по-видимому, довольно велика. Результаты, полученные Криком и др. [519], указывают на то, что большая часть случайных комбинаций, возникающих в результате выпадения или включения какого-нибудь основания, должна иметь смысл, так как первый бессмысленный триплет появляется обычно не сразу после того, как произошла ошибка, а на некотором расстоянии от этого места. Если бы смысл имели только 25 приведенных в таблице триплетов (из 64 возможных), то картина, очевидно, была бы иной.

В биосинтетический механизм код «встроен» дважды: а) в генах (ДНК), где с помощью кода зашифрована структура определенных белков, и б) в специфичности отдельных лигаз. Одним из наиболее интересных и важных вопросов в биологии является вопрос о том, как это получается, что гены и лигазы используют один и тот же код. Можно, конечно, сказать, что без этого жизнь вообще была бы невозможна, но такой ответ явно неудовлетворителен. Совершенно невероятно, чтобы подобный результат достигался без участия какого-либо контролирующего, связующего механизма; однако представить себе такой механизм в настоящее время чрезвычайно трудно.

Рибосомный синтезирующий механизм определяет последовательность аминокислот в белковой молекуле, т. е. первичную структуру синтезируемого белка. Для образования активного фермента важна также вторичная и третичная структура белка, поскольку активный центр включает несколько участков одной и той же полипептидной цепи или даже разные цепи белковой молекулы, а значит, цепь должна быть правильно свернута и скреплена водородными связями. Это правильное свертывание и сшивание может быть, вероятно, обеспечено самой последовательностью аминокислот. По мнению Анфинсена [74], последовательность аминокислот в молекулах ферментов столь уникальна, что образование активных центров и трехмерных конформаций происходит автоматически и не требует дополнительной генетической информации.

Другие возможные механизмы биосинтеза

Гейл (см. [808]) отделил от бактериальной РНК «фактор включения», который может заменить РНК в опытах по включению аминокислот разрушенными клетками стафилококков. Имеются данные, свидетельствующие о том, что существует несколько таких факторов, различающихся по специ-

фичности; неизвестно, являются ли они истинными компонентами нуклеиновой кислоты или просто адсорбированы на ней. Выделенный фактор стимулирует также синтез РНК в препарате, а потому возможно, что действие *его на включение аминокислот является косвенным и обусловливается* стимуляцией синтеза нуклеиновой кислоты. Установлено, что при расщеплении этого фактора образуется глицерин и что активный фактор может образоваться при инкубации клеточных препаратов с глицерином в течение 1—2 *час*.

Не все полипептидные цепи синтезируются рибосомами. У некоторых бактерий полипептид, входящий в состав клеточной оболочки и имеющий вполне определенную последовательность аминокислот, образуется в результате *действия ряда специфичных синтетаз; последовательность аминокислот* в молекуле этого пептида определяется не матрицей, а специфичностью ферментов, участвующих в его синтезе [1220, 1221]. Пептидная цепь строится ступень за ступенью, начиная от УДФ-ацетилмурамата на N-конце, и каждая ступень катализируется отдельной синтетазой. Каждая синтетазная реакция протекает с расщеплением одной молекулы АТФ до АДФ и фосфата; все ферменты, участвующие в синтезе пептида, высокоспецифичны как по *отношению к уже синтезированному фрагменту цепи, так и по отношению* к присоединяемой аминокислоте. Табл. 36 иллюстрирует этот процесс.

Таблица 36

СИНТЕЗ ПЕПТИДА ПРИ УЧАСТИИ СМЕСИ СИНТЕТАЗ

Соединения, вводимые в систему [1])	Включение			
	L-Ала	D-Глу	L-Лиз	D-Ала-D-Ала
Без добавок	—	—	—	—
УДФ-АМ	++	—	—	—
УДФ-АМ-L-Ала		+++	—	—
УДФ-АМ-L-Ала-D-Глу	—	—	+++	—
УДФ-АМ-L-Ала-D-Глу-L-Лиз	—	—	—	+++
УДФ-АМ-L-Ала-D-Глу-L-Лиз-D-Ала-D-Ала	—	—	—	—

[1]) АМ обозначает ацетилмурамат.

В опыт брали смесь ферментов и определяли по отдельности включение каждой из указанных в таблице аминокислот. Аминокислоты были мечены изотопами, и в таблице показано их включение в состав соединений, которые могли быть адсорбированы углем. (Адсорбировались УДФ-пептиды, а не свободные аминокислоты.) В опытные пробы добавляли ряд промежуточных продуктов, образующихся при построении цепи. Каждый промежуточный *продукт образуется в реакции, приведенной в предшествующей строке.* Включение показано соответствующим числом знаков +, а не в сравнительных величинах (как и в оригинальных статьях), так как эта таблица составлена на основании ряда работ, в которых использовались препараты с различной активностью.

Легко видеть, что на каждой стадии природа присоединяющейся аминокислоты определяется уже синтезированной последовательностью; синтетазы *других аминокислот действовать не* могут, так как *каждая из них* специфична по отношению к одной определенной последовательности. Каждый фермент, кроме того, строго специфичен по отношению к указанным оптическим изомерам. Интересно также, что на последней стадии присоединяется

преформированный дипептид. Сам D-аланин на этой стадии не присоединяется, но имеется особая синтетаза (6.3.2.4), которая образует дипептид из D-аланина.

Не исключено, что процессы такого типа могут играть определенную роль в синтезе белка, дополняя действие рибосомного механизма. Эта система напоминает рибосомную тем, что последовательность аминокислот определяется специфичностью серии лигаз (синтетаз), участвующих в синтезе; отличие же состоит в том, что последовательность фиксирована и не может изменяться в соответствии с природой добавленной матрицы. Поэтому такая система не находится под прямым контролем генов; она в большей мере приспособлена для синтеза продукта, который необходим постоянно. Играет ли эта система какую-либо роль в биосинтезе ферментов, пока не известно.

ИНДУКЦИЯ И РЕПРЕССИЯ

Ранее уже упоминалось, что образование ферментов находится под двойным контролем, а именно под контролем генов и под контролем метаболитов. Для образования данного фермента в клетке присутствие соответствующего структурного гена абсолютно необходимо. Однако во многих случаях наличие в клетке гена еще недостаточно для того, чтобы обеспечить образование фермента; чтобы фермент мог образоваться в значительных количествах, в клетке должны присутствовать («индукция») или отсутствовать («репрессия») определенные низкомолекулярные вещества, имеющие отношение к реакции, катализируемой данным ферментом. Это специфическое влияние метаболитов на образование ферментов — очень важный биологический механизм, с помощью которого обеспечение клетки ферментами регулируется в соответствии с потребностями метаболизма. Вопросы адаптивного синтеза в более широком биологическом аспекте (со специальными ссылками на работы, проведенные с бактериями) детально рассмотрены в обзорах Халворсона [986] и Жакоба и Моно [1224, 1225].

Следует четко отличать репрессию и индукцию под действием метаболитов от торможения или активации, которые вызываются метаболитами, поскольку влияние процессов этого последнего типа также может быть весьма существенным. При репрессии и индукции меняется *количество* образующегося фермента; при торможении и активации меняется не количество, а *активность* фермента. Существует несколько приемов, с помощью которых можно отличить эти явления; к числу таких приемов относится, например, измерение активности фермента после удаления индуктора или репрессора или же фактическое выделение фермента. С помощью изотопного и иммунологического методов было убедительно показано, что появление фермента под действием индуктора связано с синтезом (из отдельных аминокислот) белка, до того не существовавшего в клетке в определимых количествах и отличающегося от других клеточных белков; иными словами, можно сказать, что «индуктор вызывает синтез фермента de novo; молекулы, которые при этом образуются, оказываются новыми как по своей специфической структуре, так и по происхождению своих элементов» [1225].

В статье Моно и Кона [1850, табл. 1] приведен список индуцибельных ферментов микроорганизмов. В этом списке насчитывается более двух десятков различных ферментов.

Кинетика

Образование соответствующего фермента после добавления индуктора к растущей культуре бактерий начинается через 2—3 *мин* и продолжается до тех пор, пока в среде присутствует индуктор; через 2—3 *мин* после того, как индуктор будет удален, образование фермента полностью прекращается

(исключение представляет пенициллиназа; в этой системе индуктор — пенициллин — необратимо связывается клетками [2101]). На характер кривой, отражающей образование фермента во времени, оказывает влияние рост бактерий, в результате которого число клеток и общий вес белка увеличиваются. Картина получается более отчетливой, если строить кривую зависимости количества фермента не от времени, а от общего количества белка (фиг. 133); при таком способе изображения ясно видно, что в присутствии индуктора количество синтезированного фермента составляет некую



Фиг. 133. Ход индуцированного синтеза фермента во времени [1225].
Индукция β-галактозидазы *E. coli* ML 30. Первая стрелка указывает момент внесения в среду $5 \cdot 10^{-4}$ *M* метил-β-D-тиогалактозида (индуктор); вторая указывает момент добавления 10^{-2} *M* фенил-β-D-тиогалактозида (сильный конкурентный ингибитор индуктора) после полного удаления индуктора из системы.

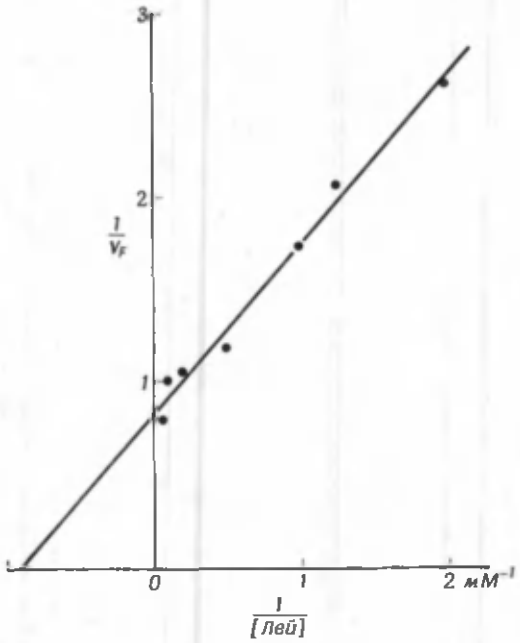
постоянную часть от всего синтезированного белка. Это означает, что если средний вес клетки остается постоянным, то и количество фермента, продуцируемого в минуту в расчете на одну клетку, также будет постоянным.

Подобные же результаты получены и с репрессорами. Когда репрессор удаляют из среды, скорость образования фермента (по отношению к скорости синтеза суммарного белка) сразу же возрастает, иногда в 1000 раз, и в дальнейшем поддерживается на этом высоком уровне. Если затем репрессор добавляют вновь, то скорость образования фермента сразу же падает до того уровня, на котором она находилась ранее, т. е. в присутствии репрессора. В некоторых случаях, когда репрессор является продуктом данной ферментативной реакции, бурное образование фермента, вызванное удалением репрессора, вскоре прекращается, так как сам синтезируемый фермент катализирует образование репрессора [872]. Этого можно избежать, если принять какие-либо меры, препятствующие накоплению репрессора; например, при непрерывной смене среды в хемостате количество синтезируемого фермента будет возрастать линейно.

Специфичность

Как индукция, так и репрессия — чрезвычайно специфические эффекты, и по характеру наблюдаемой специфичности они в высшей степени напоминают взаимодействие фермента с его субстратом. В явлениях этого рода обнаруживается не только очень высокая химическая специфичность, но и строгая стереоспецифичность. Это указывает на то, что молекула индуктора или репрессора должна действовать, связываясь с каким-то специфичным «рецептором», различным для каждого фермента или группы ферментов и специфи-

чески «пригнанным» к структуре молекулы данного индуктора или репрессора, подобно тому как активный центр фермента «пригнан» к структуре его субстрата. Действительно, взаимодействие рецептора и индуктора во многом напоминает фермент-субстратное взаимодействие. Так, например, график, построенный методом двойных обратных величин и отражающий зависимость между концентрацией индуктора и скоростью индуцированного синтеза фермента, представляет собой прямую, подобно графику Лайнуивера — Бэрка. Это указывает на существование обратимого взаимодействия между индуктором и рецептором и позволяет вычислить «константу Михаэлиса», выражающую сродство соединяющихся компонентов (фиг. 134) [1029]. Удается также наблюдать конкурентное торможение действия одних индукторов другими.



Фиг. 134. Влияние концентрации индуктора на ход индуцированного синтеза фермента [1029].

Индуцированный синтез валиндекарбоксилазы у *Proteus vulgaris*. Индуктор — лейцин. V_F — скорость образования фермента, выраженная в произвольных единицах (скорость образования фермента под действием 10 *мМ* лейцина принята за 1).

Поскольку индуктор каждого данного фермента представляет собой либо субстрат этого фермента, либо соединение, очень близкое по своей структуре к субстрату, с которым взаимодействует активный центр фермента, то рецептор, о котором выше шла речь, должен быть очень сходен с активным центром. Естественно было бы допустить, что активный центр фермента сам служит таким рецептором, но, по-видимому, это не так по ряду причин:

1. Имеются определенные различия в специфичности. В тех случаях, когда фермент действует на ряд родственных субстратов, обычно все они могут служить индукторами, но соответствия между этими двумя типами действия не обнаруживается; иными словами, хороший субстрат может быть плохим индуктором, и наоборот.

2. Опыты, в которых было измерено сродство к рецептору (как, например, при изучении валиндекарбоксилазы [1029]), показали, что у субстратов сродство к рецептору значительно выше (иногда в 10 раз выше), чем к активному центру. Действительно, нередко вещества, которые не обнаруживают заметной способности связываться с активным центром фермента, действуют как индукторы, что указывает на их соединение с рецептором.

3. Индукция субстратом все еще оказывается возможной и в тех случаях, когда функция активного центра фермента нарушена мутацией в соответствующем структурном гене и он не способен более соединяться с субстратом. Для образования β-галактозидазы (3.2.1.23) у *E. coli* необходим индуктор (галактозид). Структурный ген для этого фермента (ген *z*) может претерпеть мутацию (z^-), влияющую на активный центр. В результате вместо активного фермента образуется неактивный белок. Этот белок, по-видимому, идентичен ферменту во всех других отношениях, например по своим иммунологическим свойствам. Его удалось выделить, и физическими методами было установлено, что у него утрачена способность связывать галактозиды. Тем не менее синтез этого белка зависит от специфической индукции галактозидами; это говорит

о том, что рецептор в белке сохраняется, несмотря на утрату активного центра [2071]. В диплоидных клетках, содержащих и нормальный и мутантный ген, индуктор одновременно вызывает образование и фермента и неактивного белка.

Значительная часть работ по изучению индукции ферментов выполнена именно на β-галактозидазе *E. coli*. Моно и др. [1849] провели обширные исследования, в которых изучалась специфичность индукции этого фермента. Результаты, которые они получили с двумя различными штаммами *E. coli*, приведены в табл. 37 и 38. И хотя имеются известные (количественные) различия между данными, полученными на этих двух штаммах, основные показатели в обоих случаях сходны. Величины, выражающие количество β-галактозидазы, образовавшейся в результате индукции, даны для двух штаммов в разных единицах. На основании имеющихся данных перевести их в одни и те же единицы невозможно, но в первом приближении можно принять, что числа, приведенные в графе 3 табл. 38 нужно умножить на 75, чтобы сделать их сравнимыми с величинами в графе 3 табл. 37.

Таблица 37

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИНДУКЦИИ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ У *E. COLI* ML НА СРЕДЕ, В КОТОРОЙ ИСТОЧНИКОМ УГЛЕРОДА СЛУЖИЛА МАЛЬТОЗА [1849]

№ п/п	Вещество [1]	Количество синтезированного фермента [2], миллиединицы	Относительное сродство к очищенному ферменту (сродство НФГ принято за 1000)	Способность гидролизоваться очищенным ферментом
1	*Галактоза*	420	30	
	β-D-*галактозиды*			
2	Метил-β-Г	2800	10	+
3	*н*-Бутил-β-Г	2800	400	+
4	Фенил-β-Г	560	600	+
5	*о*-Нитрофенил-β-Г (НФГ)	1060	1000	+
6	β-Нафтил-β-Г	42	200	+
7	4-глюкозо-β-Г (лактоза)	2500	100	+
8	Маннозо-β-Г	2500	10	+
9	4 (*п*-аминофенил-β-глюкозидо)-β-Г	2200	100	+
	α-D-*галактозиды*			
10	Метил-α-Г	140	0	0
11	6-глюкозо-α-Г (мелибиоза)	2400	0	0
12	6-сахарозо-α-Г (раффиноза)	0	0	0
	Метилзамещенные галактозиды			
13	2-метил-β-метил-Г	20	0	0
14	2,6-диметил-β-метил-Г	0	0	0
15	3,4-диметил-β-метил-Г	0	0	0
	Производные D-*галактозы, образующиеся в результате удаления* C-6			
16	L-арабиноза	0	>0	0
17	Метил-β-L-арабинозид	0		
18	*о*-Нитрофенил-α-L-арабинозид	0	50	+
	β-D-*тиогалактозиды*			
19	Фенил-β-тиогалактозид	0	700	0

[1] Г означает D-галактозид. Следующие вещества не являются ни субстратами, ни индукторами фермента: 2- или 6-дезоксигалактоза, D-галактуронаты, метил- или фенил-β-D-глюкозиды, D-ксилоза, D-тагатоза, D-манноза, D-глюкоза, мальтоза и целлобиоза.

[2] Указано количество фермента, синтезированного на 1 *мг* белка после инкубации в течение 4 *час* с 10^{-3} *М индуктором*.

Таблица 38

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИНДУКЦИИ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ У *E. COLI* К12 НА СРЕДЕ, В КОТОРОЙ ИСТОЧНИКОМ УГЛЕРОДА СЛУЖИЛ ГЛИЦЕРИН [1225]

№ по табл. 37 и далее по порядку	Вещество [1]	Синтез β-галактозидазы [2]			Синтез галактозид-ацетилтрансферазы [2]	
		количество синтезированного фермента (с ИПТГ принято за 100)	V (с ФГ принято за 100)	относительное сродство к очищенному ферменту (с ФГ принято за 100)	количество синтезированного фермента (с ИПТГ принято за 100)	V/K_m
1	Галактоза	$<0{,}1$	—	4	<1	<1
4	Фенил-β-Г (ФГ)	15	100	100	11	—
7	4-глюкозо-β-Г (лактоза)	17	30	14	12	35
11	6-глюкозо-α-Г (мелибиоза)	35	0	$<0{,}1$	37	<1
19	Фенил-β-ТГ	$<0{,}1$	0	100	<1	100
20	Метил-β-ТГ (10^{-4} M)	78	0	7	74	30
21	Изопропил-β-ТГ (ИПТГ) (10^{-4} M)	100	0	140	100	80
22	Фенилэтил-β-ТГ	5	0	10 000	3	—
23	Фенил-β-глюкозид	$<0{,}1$	0	0	<1	50

[1] ТГ означает тиогалактозид (10^{-3} M, если не указана другая величина).

[2] V — максимальная скорость реакции, катализируемой данным ферментом. Для ацетилтрансферазы V и K_m нельзя было измерить порознь вследствие малой величины сродства.

Из данных табл. 37 и 38 вытекает следующее: а) функцию индуктора (правда, с различной эффективностью) могут выполнять все галактозидные субстраты (№ 2 — 9); б) вещество может служить субстратом и не быть индуктором (№ 18; если только этот арабинозид действительно является субстратом самой β-галактозидазы); в) вещество, которое не является субстратом, может оказаться мощным индуктором (№ 11, 20 и 21); г) вещества могут быть активными индукторами, несмотря на то что они обладают малым сродством к ферменту или совсем не обладают таким сродством (№ 2, 8, 11 и 20); д) вещество может обладать очень сильно выраженным сродством к активному центру фермента и при этом не быть индуктором (№ 19 и 22); е) все вещества, оказавшиеся в этих опытах индукторами, имеют D-галактозное кольцо; ж) не все вещества, обладающие этим кольцом, способны служить индукторами или субстратами.

Природный субстрат фермента не обязательно оказывается наилучшим индуктором. Так, например, в описанных опытах самым мощным индуктором оказался изопропил-β-D-тиогалактозид (№ 21); если выразить его индуцирующую способность в единицах табл. 37, то даже при концентрации 10^{-4} M она составит 7500, а при концентрации 10^{-3} M она, вероятно, превысила бы 10 000. Скорость индуцированного синтеза фермента обычно пропорциональна концентрации индуктора, но в случае такого мощного индуктора этой пропорциональности может, вероятно, и не быть.

Для осуществления индукции не требуется, чтобы протекала реакция, катализируемая данным ферментом; иными словами, не имеет значения, разрушается ли вещество, связывающееся с ферментом, или же нет (ср., например, № 7 и 11). Не только не обязательно для индуктора быть субстратом фермента, синтез которого он индуцирует, но не обязательно даже, чтобы

фермент образовывался в активной форме, в которой он может действовать на свой субстрат. Если простетической группой фермента служит вещество, которое клетка не может синтезировать сама, и если этого вещества не имеется в среде, то в ответ на воздействие индуктора может образоваться неактивный, но специфичный апофермент. Так, например, некоторые стрептококки в не содержащей пиридоксина среде в присутствии тирозина (но не в его отсутствие) образуют белковую часть тирозиндекарбоксилазы (4.1.1.25), неактивную саму по себе, но способную активироваться при добавлении пиридоксальфосфата [201]. Эти данные говорят о том, что для индуцирования синтеза активность фермента вовсе не обязательна, вопреки тому, из чего исходили некоторые теории. Более того, мы видели, что индукция может происходить и тогда, когда образующийся фермент не обладает каталитической активностью вследствие какой-либо мутации гена, нарушившей строение его активного центра.

Установлено, что для индукции не имеет значения не только реакция в активном центре, но даже и связывание индуктора с активным центром; по крайней мере между индуцирующей способностью и эффективностью связывания индуктора никакой корреляции нет. Это ясно видно из табл. 38. Все приведенные данные говорят о различии между активным центром фермента и рецептором для индуктора, а следовательно, и о том, что изучение структуры активного центра вряд ли может дать какие-либо ценные сведения относительно механизма индукции. Отмеченные различия не должны, однако, затушевывать важнейшую особенность индукции, а именно тот факт, что синтез каждого из множества индуцибельных ферментов специфически индуцируется только субстратом этого фермента или веществами, близкими к субстрату. Данное вещество индуцирует образование только тех ферментов, которые катализируют реакции, имеющие определенное отношение к этому веществу. Таким образом, между реакцией, обычно катализируемой данным ферментом, и индуцированным синтезом этого фермента имеется специфическая связь, хотя индукция и не зависит от осуществления реакции. Поэтому удовлетворительной можно признать только ту теорию процесса индукции, которая способна объяснить эту связь.

Иногда добавление того или иного вещества индуцирует синтез не одного фермента, а целой группы ферментов, связанных по своему действию, т. е. участвующих в превращениях данного вещества через серию промежуточных продуктов обмена.

Репрессия отличается от индукции в двух отношениях: а) действие репрессора не вызывает, а, наоборот, предотвращает синтез фермента; б) индуктор — это обычно субстрат фермента или близкое к нему вещество, тогда как репрессором служит продукт соответствующей ферментативной реакции или вещество, близкое к продукту. Таким образом, эти два процесса представляют собой два взаимодополняющих регуляторных механизма биосинтеза ферментов. Если какого-либо фермента, участвующего в определенном метаболическом процессе, не хватает, то концентрация его субстрата будет нарастать, и это вызовет усиленный синтез фермента; и наоборот, если в системе имеется избыток фермента, то возрастать будет концентрация продукта соответствующей ферментативной реакции, и это приведет к репрессии синтеза. В обоих случаях уровень различных ферментов будет приспосабливаться к потребностям метаболизма.

Возникает вопрос, контролируется ли образование данного фермента обоими этими механизмами (иными словами, может ли синтез одного и того же фермента индуцироваться одним веществом и репрессироваться другим) или индуцибельные и репрессибельные ферменты принадлежат к двум отдельным классам. Очень скудные предварительные данные, которыми мы располагаем, свидетельствуют, по-видимому, о том, что в большинстве случаев образование индуцибельных ферментов не регулируется репрессорами,

и наоборот. Известны, однако, один или два случая, когда образование определенного фермента регулируется за счет репрессии в одном организме и за счет индукции — в другом.

Часто утверждают, что конечные продукты метаболических процессов вызывают репрессию ферментов, участвующих в образовании этих продуктов. Это утверждение не вполне обоснованно. В сложной сети метаболических реакций трудно вычленить отдельные соединения, которые можно было бы с полным правом назвать конечными продуктами того или иного метаболического пути (особенно если эти соединения подвергаются дальнейшим превращениям). Положение будет, вероятно, выражено более точно, если мы скажем, что аминокислота (или реже нуклеотид), образующаяся в процессе метаболизма, служит репрессором ферментов, участвующих в ее образовании. Из табл. 39 видно, что почти все известные случаи репрессии — это репрессия аминокислотами тех ферментов, которые участвуют (у микроорганизмов) в биосинтезе этих аминокислот.

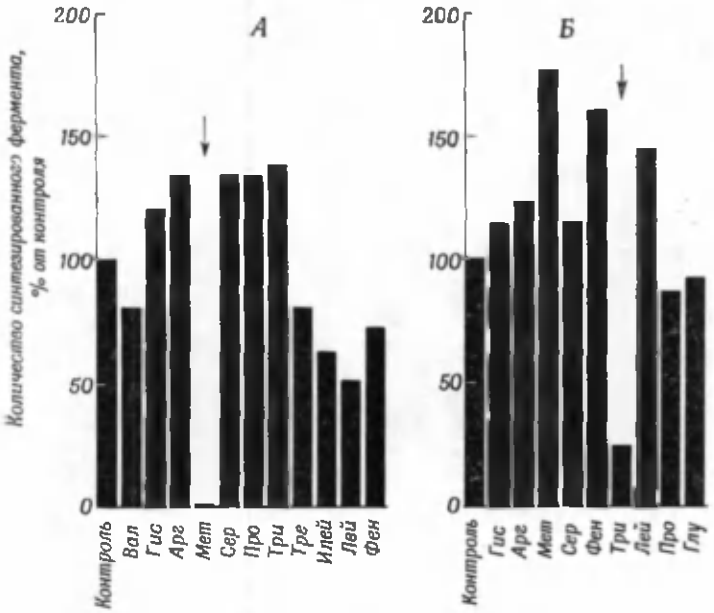
Таблица 39

РЕПРЕССИЯ СИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ

Репрессирующее вещество	Фермент, синтез которого репрессируется	Организм	Источник данных
L-аргинин	Ацетилорнитин-деацетилаза (3.5.1.d)	*E. coli* W	[872, 873, 2740]
	Орнитин-карбамоилтрансфераза (2.1.3.3)		
	Аргининсукцинат-лиаза (4.3.2.1)		
L-гистидин	Имидазолглицерофосфат-дегидратаза (4.2.1.19)	*Salmonella typhimurium*	[62]
	Гистидинолфосфат-аминотрансфераза (2.6.1.9)		
	Гистидинолфосфатаза (3.1.3.15)		
	Гистидинолдегидрогеназа (1.1.1.23)		
L-лизин	Аспартаткиназа (2.7.2.4)	*E. coli*	[2498]
L-метионин	Гомоцистеин-метилтрансфераза	То же	[475, 2864]
L-пролин	Пирролин-5-карбоксилат-редуктаза (1.5.1.2)	*Neurospora crassa*	[2954]
L-триптофан	Триптофан-синтаза (4.2.1.20)	*Aerobacter aerogenes*	[1848]
L-тирозин	Фенилаланин-4-гидроксилаза (1.99.1.2)	Крыса	[96]
L-аспарагин	Аспарагинсинтетаза (6.3.1.1)	*Lactobacillus arabinosus*	[2185]
L-глутамин	Глутаминсинтетаза (6.3.1.2)	Клетки HeLa	[589]
Креатин	Глицин-амидинотрансфераза (2.6.2.1)	Птицы, крысы	[2771]
ГМФ	ИМФ-циклогидролаза (3.5.4.10)	*Salmonella typhimurium*	[1558]
	ИМФ-дегидрогеназа (1.2.1.14)	*Aerobacter aerogenes*	
УМФ	Аспартат-карбамоилтрансфераза (2.1.3.2)	*E. coli* B	[2946]
	Уридосукциназа (3.5.1.7)		
	Дигидрооротатдегидрогеназа (1.3.3.1)		
Фосфат	Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)	*E. coli* W, ML или K12	[814[

Репрессирующее действие специфично, т. е. на ферменты действует именно та аминокислота, которая образуется при их участии (фиг. 135).

Исследования по репрессии ферментов (так же как и работы по индуцированному синтезу ферментов) были проведены в основном на различных штаммах *E. coli*, у которых этот феномен особенно четко выражен. Обычно приходится использовать в таких опытах мутант с генетическим блоком (выпадением какого-нибудь фермента) в метаболическом пути, ведущем к образованию репрессора; в противном случае клетки в самом процессе метаболизма образуют достаточное количество репрессора, и тогда при удалении репрессора из среды наблюдать ускорение синтеза фермента не удается.



Фиг. 135. Специфичность репрессии аминокислотами [475, 1848].

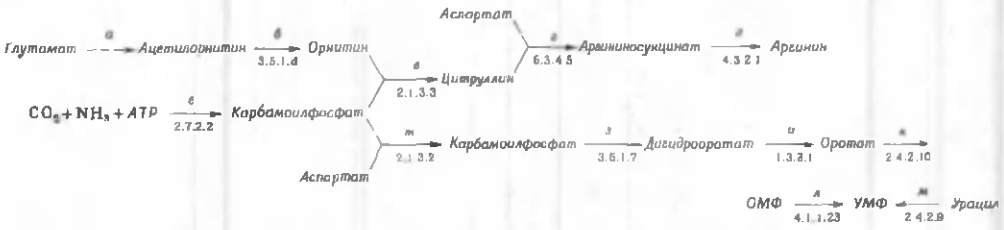
Синтез ферментов при выращивании бактерий в присутствии различных аминокислот (синтез фермента в контроле принят за 100). *А*. Синтез «метионин-синтазы» у *E. coli* ML (концентрация аминокислот — *M*/150). *Б*. Синтез триптофан-синтазы у *Aerobacter aerogenes* L_3 (концентрация аминокислот варьирует от *M*/200 до *M*/500).

В среду, где растет выбранный для опыта мутант, добавляют некоторое количество репрессора для удовлетворения потребностей роста. Если добавленное количество невелико, то *сначала клетки растут, не образуя соответствующего фермента*, и так продолжается до тех пор, пока не будет использован весь репрессор. Затем рост внезапно резко замедляется и в то же время начинается синтез фермента. Этот синтез может протекать с такой большой скоростью, что количество образующегося фермента будет составлять около 5% всего синтезируемого белка. Если затем вновь добавить репрессор, то синтез фермента сразу же прекратится и количество фермента останется таким, *каким оно было к моменту добавления репрессора*.

При отсутствии генетического блока добавление любых промежуточных продуктов данного метаболического пути может вызвать репрессию просто потому, что эти промежуточные продукты будут превращаться в репрессирующее вещество под влиянием соответствующих ферментов. При наличии генетического блока результаты будут зависеть от его положения: промежуточные продукты, образующиеся на любой стадии после блока, будут по-прежнему превращаться в *репрессор*, *но промежуточные продукты*, образующиеся до блока, не смогут подвергнуться дальнейшим превращениям и потому не будут вызывать репрессию.

Нередко и при индукции и при репрессии одно и то же вещество влияет на синтез нескольких ферментов. Добавление определенного метаболита

может индуцировать не один фермент, а группу метаболически связанных ферментов, при помощи которых это вещество может подвергнуться превращениям через серию промежуточных продуктов. Подобным же образом репрессор может препятствовать синтезу ряда различных ферментов, участвующих в его образовании. Так, например, добавление β-галактозида индуцирует у *E. coli* синтез не только β-галактозидазы, но и галактозидацетилтрансферазы (2.3.1.b) [2956] — фермента с неизвестной функцией, а также «галактозидпермеазы»— фермента неизвестной природы, каким-то образом связанного с проникновением галактозидов в клетку. (Одно время полагали, что этот фермент идентичен ацетилтрансферазе [1224].) Как видно из табл. 38, индуцированный синтез ацетилтрансферазы и галактозидазы протекает с одинаковой интенсивностью при действии большого числа индукторов. Структурные гены, контролирующие образование всех этих ферментов, локализованы на хромосоме в области *lac*. Другая группа ферментов, также связанная с галактозой, контролируется генами области *gal*. Эта



Фиг. 136. Репрессия ферментов у *E. coli*.

Аргинин вызывает репрессию образования ферментов *б*, *в* и *д*, но не вызывает репрессии фермента *е*; урацил и его производные вызывают репрессию ферментов *ж*, *з* и *и*, но не вызывают репрессии фермента *е*.

группа ферментов ответственна за превращение в глюкозу и включает галактокиназу (2.7.1.6), гексозо-1-фосфат — уридилилтрансферазу (2.7.7.12) и УДФ-глюкозо-эпимеразу (5.1.3.2). Все три фермента индуцируются в одинаковой степени (но независимо от предыдущей группы) 6-дезоксигалактозой (D-фукоза), но не индуцируются одним из наиболее сильных индукторов β-галактозидазы, а именно метил-β-тиогалактозидом, причем последний даже тормозит индукцию, вызываемую D-фукозой [373].

Аналогичный эффект наблюдался и при действии репрессоров. Например, у *Salmonella* L-гистидин вызывает репрессию четырех ферментов, катализирующих четыре последовательные стадии его биосинтеза (табл. 39), и репрессирует их все в равной степени. Этот феномен известен как «координированная репрессия» [62]. У *E. coli* L-аргинин вызывает репрессию трех ферментов, участвующих в его биосинтезе, а урацил или его производные репрессируют образование трех ферментов, участвующих в биосинтезе УМФ (фиг. 136). Сам урацил в отличие от аргинина не является конечным продуктом этих ферментативных реакций, но он может быть превращен в конечный продукт — УМФ, который, по-видимому, и служит истинным репрессором.

Важно отметить, что репрессия образования фермента может иметь место даже и в том случае, если один из действующих в цепи ферментов и конечный продукт реакции отсутствуют в результате генетического блока. Например, УМФ вызывает репрессию фермента *ж* (фиг. 136) у мутанта, у которого отсутствует какой-либо из ферментов *з* — *л*, хотя любой из этих ферментов метаболически отделен от УМФ блоком.

Станиер [2504] предложил одно возможное объяснение процесса индуцированного образования серии ферментов, а именно механизм «серийной индукции». При этом промежуточные продукты, образующиеся в ходе последовательных реакций, в свою очередь служат индукторами для ферментов, катализирующих их превращение. Добавленное вещество индуцирует обра-

зование фермента, который превращает это вещество в первый промежуточный продукт; этот промежуточный продукт индуцирует образование другого фермента, который превращает его во второй промежуточный продукт, и так далее до тех пор, пока не будет индуцирована вся серия ферментов, катализирующих последовательные реакции в данной метаболической цепи. При этом некоторые из ферментов действуют уже на субстраты, имеющие очень малое сходство с первым (исходным) индуктором. Например, триптофан, добавленный к культуре *Pseudomonas*, индуцирует синтез примерно десятка ферментов, катализирующих его превращение — через кинуренин, антранилат, катехин и муконат — в 3-оксоадипат [2505]; все эти ферменты отсутствуют у организма, не подвергавшегося действию индуктора.

Описанный механизм, по-видимому, не является главным, хотя он и может играть некоторую роль. Не только при индукции, но и при репрессии затрагивается иногда целая группа родственных ферментов, однако ясно, что при репрессии подобный механизм действовать не может. Можно было бы представить себе «серийную репрессию», при которой репрессия одного фермента вызывала бы накопление промежуточного продукта, образующегося под действием предшествующего фермента, а этот фермент в свою очередь репрессировался бы накопившимся продуктом. Но если бы дело обстояло именно так, то все промежуточные продукты должны были бы быть репрессорами ферментов, катализирующих их образование; между тем этого нет. Далее, у штаммов с генетическим блоком процесс должен был бы прерываться в точке, где имеется блок, но и этого в действительности не наблюдается. Более того, индукция или репрессия различных ферментов определенной группы протекает не последовательно, а одновременно. Таким образом, необходимо искать какое-нибудь другое объяснение этих процессов.

Опероны

У бактерий структурные гены для группы ферментов, катализирующих реакции одной и той же метаболической цепи, располагаются вдоль хромосомы по большей части рядом друг с другом, как это мы уже видели на примере областей *lac* и *gal* у *E. coli* (у высших организмов эта тенденция выражена, по-видимому, не столь сильно). Более детальные хромосомные карты (составленные с помощью обычных генетических методов) позволяют уловить и еще одну закономерность; оказывается, гены внутри группы могут располагаться в определенном порядке, который зависит от последовательности действия ферментов, контролируемых этими генами. Гартман и др. [1014] показали, что у *Salmonella* структурные гены для серии ферментов, катализирующих последовательные реакции биосинтеза гистидина, располагаются на хромосоме точно в том же порядке, в каком следуют друг за другом соответствующие реакции. Если записать серию реакций, приводящих к биосинтезу гистидина, под картой хромосомы, то над каждой реакцией будет стоять ген, контролирующий синтез фермента, который катализирует эту реакцию. Таким образом, хромосома содержит достаточную информацию не только о структуре ферментов (во внутренней структуре гена), но также и о последовательности метаболических реакций, катализируемых этими ферментами (в последовательности генов на хромосоме). Это тем более поразительно, что между структурой гена и химической реакцией, катализируемой соответствующим ферментом, нет прямой связи; ген сам по себе не катализирует эту реакцию, и природа ее становится явной только после того, как информация, закодированная в гене, будет переведена в определенную последовательность аминокислот в ферменте.

У разных организмов гены, однако, группируются по-разному. Например, гены, связанные с биосинтезом гистидина, у *Salmonella* собраны в одну группу, а у *Neurospora* и дрожжей разбросаны в разных местах [62]. Гены,

ведающие образованием ферментов биосинтеза аргинина у *E. coli* (по крайней мере у некоторых штаммов), тоже разбросаны по всей хромосоме.

Группа пространственно сцепленных генов, функционирующих как некая единица на хромосоме, носит название «оперон» [1225]. Примером могут служить гены, ответственные за образование ферментов, которые катализируют последовательные стадии биосинтеза гистидина у *Salmonella*, или группа структурных генов у *E. coli*, известных как гены *z* и *y* и ответственных за синтез β-галактозидазы и галактозид-ацетилтрансферазы соответственно. На последнем опероне проведено наибольшее количество исследований. Все ферменты, гены которых расположены в одном опероне, индуцируются или подвергаются репрессии в одинаковой степени («координированная индукция или репрессия»). Если же гены, обусловливающие синтез ферментов, расположены в разных оперонах, то обычно и влияние на ферменты оказывается различным («некоординированная индукция или репрессия»), даже если действует одно и то же вещество.

Данный факт наводит на мысль о том, что в каждый период времени для каждого из ферментов в опероне всегда образуется одинаковое количество информационной РНК. А это в свою очередь, вероятно, означает, что при репликации той части ДНК, которая составляет оперон, т. е. при образовании информационной РНК, весь оперон ведет себя как единое целое; процесс начинается на одном его конце и распространяется к другому концу.

Убедительные доказательства в пользу такого механизма получили Жакоб и Моно [1224] путем изучения некоторых мутаций. Точка на опероне, с которой начинается образование информационной РНК, известна как «оператор» (*o*); для оперона *lac* при составлении карты было показано, что оператор находится на том конце гена *z*, который удален от гена *y*, другими словами — на одном из концов оперона. Определенные мутации оператора (обозначаемые как o^0) делают его неактивным, так что образование РНК уже не может более начинаться с этой точки. Вследствие этого активность утрачивает весь оперон, так что ни один из ферментов не образуется (даже в присутствии индукторов). Ген *y* не может, следовательно, образовать РНК, хотя он и остается нормальным; построение информационной РНК должно начинаться на операторе. В то же время неактивный оперон не мешает действию нормального оперона, расположенного в другой хромосоме той же клетки, а нормальный оператор этого второго оперона не может активировать первый оперон.

Таким образом, оператор представляет собой контрольный пункт для регуляции синтеза всех ферментов данной группы; индукция и репрессия осуществляются, видимо, путем воздействия на этот контрольный пункт.

Эффект мутаций в самих генах *y* и *z* также доказывает, что построение РНК есть направленный процесс, который начинается с оператора и продолжается вдоль всего оперона. По большей части такие мутации оказывают независимые воздействия на структуру ацетилтрансферазы или галактозидазы соответственно. Однако одна или две мутации в гене *z*, по-видимому, подавляют образование РНК (возможно, вследствие появления бессмысленных комбинаций), и эти мутации нарушают также образование ацетилтрансферазы, управляемое геном *y*. В то же время никакие мутации гена *y* не влияют на действие гена *z*. Это говорит о том, что ген *z*, в состав которого входит оператор, копируется раньше, чем ген *y* (см. [1224]).

Возникает вопрос, представлен ли весь оперон одной молекулой информационной РНК, и если это так, то можно ли считать, что весь набор ферментов синтезируется на рибосоме в один этап. Ферменты — это, во всяком случае, совершенно различные белки, которые можно легко разделить, например фракционированием с помощью сульфата аммония; поэтому на каком-то этапе синтеза должны происходить разрывы либо в пептидной цепи, либо в цепи РНК. Легче предположить, что разрывы происходят при

образовании РНК (по всей вероятности, в точках, соответствующих определенным сочетаниям нуклеотидов), т. е. что молекула РНК распадается на фрагменты, которые соответствуют отдельным ферментам. В противном случае необходимо допустить образование очень большой молекулы информационной РНК, в которой были бы представлены структурные последовательности всех ферментов, контролируемых данным опероном.

Опероны обнаружены пока только у бактерий, хотя нет никаких оснований думать, что у других организмов их не имеется. Наличие оперона не составляет, однако, непременной особенности механизма индукции или репрессии, ибо синтез целой группы ферментов может индуцироваться или репрессироваться одним-единственным веществом даже и в том случае, когда структурные гены этих ферментов не сгруппированы в виде оперона. При этом, вероятно, каждый ген имеет свой собственный оператор, но все операторы, принадлежащие разным генам, в структурном отношении чем-то похожи один на другой.

Гены-регуляторы

Хромосомы содержат, помимо структурных генов, определяющих структуру ферментов, еще и гены-регуляторы, которые специфически контролируют скорость синтеза различных ферментов или групп ферментов. Структурные гены определяют только последовательность аминокислот в синтезируемых ферментах, но они не контролируют скорости синтеза. В отсутствие такого контроля структурные гены продуцируют информационную РНК (а следовательно, и фермент) с постоянной скоростью; если в клетке находятся два или четыре гена z, то они продуцируют галактозидазу в два или четыре раза быстрее, чем один такой ген [2000]. Гены-регуляторы не оказывают влияния на структуру ферментов, синтез которых они контролируют, но определяют скорость, с которой эти ферменты продуцируются структурными генами. Удельная активность ферментов, синтезируемых под их влиянием, остается постоянной; меняется только количество фермента. Гены-регуляторы не обязательно находятся в хромосоме поблизости от тех структурных генов, которые они контролируют; они могут контролировать гены и в других хромосомах, а следовательно, действие гена-регулятора связано с образованием какого-то внутриклеточного вещества.

Эти гены могут претерпевать мутации, и изучение таких мутаций дает ключ к выяснению механизма индукции и репрессии.

Ген-регулятор оперона, ответственного за синтез галактозидазы у *E. coli* (*ген i*), может мутировать в форму i^-, что приводит к появлению «конститутивного мутанта». Клетки, содержащие нормальную форму i^+, образуют галактозидазу только в присутствии индуктора, но клетки, содержащие только форму i^-, образуют фермент как в присутствии индуктора, так и в его отсутствие. Если в клетке имеется две хромосомы, причем одна из них содержит гены i^+z^- (символ z^- обозначает мутантную форму гена z, неспособную продуцировать активный фермент), а другая — гены i^-z^+, то фермент опять-таки образуется только в присутствии индуктора. Другими словами, форма i^+ является доминантной, а форма i^- — рецессивной.

Таким образом, при отсутствии индуктора синтез фермента может идти только в тех клетках, где нет гена i^+; наличие гена i^+ препятствует синтезу фермента. Этот факт указывает, что ген i^+ образует вещество, которое тормозит синтез фермента («цитоплазматический репрессор»), а ген i^- такого вещества не образует. И действительно, выпадение участка хромосомы, содержащего ген i, вызывает тот же эффект, что и мутация i^-.

Имеется прямое доказательство, полученное в опытах с изотопами [1224], что цитоплазматический репрессор действует, предупреждая образование информационной РНК теми генами, которые этим репрессором контролируются. Естественно предположить, что цитоплазматический репрессор соеди-

няется с оператором и таким образом препятствует образованию РНК. Это предположение подтверждается тем фактом, что сам оператор может претерпевать «конститутивную» мутацию (o^c), в результате которой он теряет способность соединяться с цитоплазматическим репрессором; мутации o^c и i^- сходны, так как отсутствие репрессора и неспособность репрессора проявить свое действие приводят к одинаковому результату.

Индуктор должен, по-видимому, препятствовать действию цитоплазматического репрессора, и многие исследователи принимают гипотезу, согласно которой индуктор специфически связывает этот репрессор, так что последний уже не может больше соединиться с оператором. В свете этой гипотезы индукция представляет собой «дерепрессию», и это дает возможность рассматривать индукцию и репрессию фермента как варианты одного и того же основного механизма. В обоих случаях образование фермента блокируется в результате соединения цитоплазматического репрессора с оператором. Основное различие сводится к следующему: в индуцибельной системе свободный цитоплазматический репрессор может соединиться с оператором, а репрессор, присоединивший к себе индуктор,— не может; в репрессибельной системе, наоборот, не может соединиться с оператором именно свободный цитоплазматический репрессор, и для того, чтобы такое соединение произошло, репрессор должен предварительно присоединить к себе аминокислоту или какое-нибудь другое вещество, способное вызвать репрессию [2591]. Таким образом, действие индуктора заключается в том, чтобы деблокировать оператор, а действие репрессирующего вещества — в том, чтобы блокировать его [1].

Можно упомянуть еще об одной мутантной форме гена-регулятора, которую принято обозначать i^s. При наличии гена i^s ни один из ферментов оперона не может образоваться даже в присутствии индуктора, несмотря на то что клетка содержит нормальные гены y и z. Нормальный ген i^+ во второй хромосоме не проявляет своего действия; другими словами, ген i^s доминирует над геном i^+. Это можно объяснить тем, что ген i^s образует модифицированную форму цитоплазматического репрессора, утратившую способность соединяться с индуктором, но способную соединяться с оператором. Таким образом, оператор во всех случаях оказывается блокированным. Эффекты всех рассмотренных мутаций перечислены в табл. 40.

Что касается химической природы цитоплазматического репрессора, то имеются некоторые факты, которые наводят на мысль о том, что он представляет собой низкомолекулярную РНК, несколько напоминающую s-РНК. Факты эти следующие: а) цитоплазматический репрессор образуется на ДНК гена-регулятора и его структура специфически определяется структурой этой ДНК; б) между структурой цитоплазматического репрессора и ДНК контролируемого им оператора существует специфическое сродство; в) образование цитоплазматического репрессора не связано с синтезом белка (это доказывается тем, что на него не действует хлорамфеникол, который тормозит синтез белка); г) для осуществления репрессии цитоплазматический репрессор должен соединиться с каким-то другим веществом, и это практически во всех известных случаях вещества того типа (аминокислоты или нуклеотиды), которые соединяются с РНК при помощи ферментов (например, лигаз, образующих аминоацил-РНК); д) связывание цитоплазматического репрессора с соответствующей аминокислотой высокоспецифично, и это напоминает двоякую специфичность упомянутых лигаз.

[1] Терминология, принятая в этой области, весьма далека от совершенства. Термин «репрессор» употребляется почти без разбора для обозначения а) первичного репрессирующего вещества, например аминокислоты, б) цитоплазматического репрессора (РНК?), образуемого геном-регулятором, и в) продукта соединения цитоплазматического репрессора с репрессирующим веществом, т. е. того продукта, который блокирует оператор. Для различения этих трех случаев предлагались термины: а) «корепрессор», б) «апорепрессор» и в) «репрессор», но эти термины пока не вошли в широкое употребление.

Таблица 40

МУТАЦИИ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ У *E. COLI*

Мутация	Участок, на котором произошла мутация	Эффект	Конечный результат
—	—	Оператор блокирован репрессором; репрессор удаляется в результате присоединения индуктора	Фермент образуется только в присутствии индуктора
z^-	Структурный ген — участок, контролирующий образование активного центра фермента	Изменена структура активного центра	Активный фермент не образуется. Неактивный фермент образуется только в присутствии индуктора
o^0	Структурный ген — участок, занятый оператором	Оператор неактивен, даже если он не соединен с репрессором; информационная РНК не образуется	Фермент не образуется даже в присутствии индуктора
o^c	То же	Оператор активен и не способен соединяться с репрессором	Фермент образуется даже в отсутствие индуктора
i^-	Ген-регулятор	*Репрессор не образуется*	То же
i^s	То же	Образуется измененный репрессор, неспособный *соединяться с индуктором*	Фермент не образуется даже в присутствии индуктора

Если эта гипотеза относительно природы цитоплазматического репрессора верна, то можно думать, что репрессорная РНК содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную оператору, т. е. тому концу первого структурного гена в опероне, который определяет N-концевой участок соответствующего фермента. В тех случаях, когда один и тот же репрессор контролирует образование нескольких ферментов, у которых гены не сгруппированы, а разбросаны по всей хромосоме, можно предположить, что все эти гены имеют сходную концевую последовательность нуклеотидов, соответствующую данному определенному репрессору. Если это так, то вполне возможно (такое предположение высказали Жакоб и Моно [1224]), что в молекулах всех ферментов, на которые действует этот репрессор, на N-конце стоит одна и та же аминокислота. Это, разумеется, не обязательно для ферментов, представленных одним опероном (так как в этом случае репрессор соединяется только с одним геном).

Репрессия всех ферментов одного оперона может быть только координированной, так как в процессе копирования образуются эквимолекулярные количества информационной РНК для всех этих ферментов. Однако там, где *гены не объединены в группы и где репрессор действует на ряд независимо* функционирующих генов, вряд ли все ферменты, контролируемые этими генами, будут репрессироваться в одинаковой степени. В этом случае естественно было бы ожидать существования *некоординированной репрессии* и ее действительно наблюдали.

Основываясь на изложенной выше теории индукции и репрессии, упомянутый на стр. 437 «рецептор» следует идентифицировать как определенную репрессорную РНК, с которой соединяется индуцирующее или репрессирующее вещество. Это, однако, не объясняет высокой специфичности соединения, равно как и наиболее интересной особенности процесса индукции, а именно отчетливо выраженного химического и стерического сходства

между индуктором и субстратом фермента. Не получает, например, объяснения тот факт, что галактозидаза индуцируется только веществами, содержащими D-галактозное кольцо. Фермент-субстратная специфичность, с которой очень сходна специфичность, обнаруживающаяся при индукции,— это свойство, характерное для белка, так как она определяется конфигурацией активного центра фермента. Вряд ли можно надеяться, что удастся обнаружить центры с подобной специфичностью в полинуклеотидах, и еще менее вероятно, чтобы существовала тесная связь между веществами, которые связываются полинуклеотидами, и веществами, которые связываются полипептидными центрами ферментов, находящихся под контролем этих полинуклеотидов.

Чтобы обойти это затруднение, можно (правда, без каких-либо доказательств) допустить, что специфичность по отношению к индуцирующим веществам или к веществам, вызывающим репрессию, определяется не комплементарностью между ними и репрессорной РНК (по типу «ключ — замок»), а действием специфичного фермента. Если, например, соединение репрессорной РНК с данной аминокислотой осуществляется при участии какого-то фермента, то специфичность соединения может определяться этим ферментом точно так же, как специфичность связывания аминокислоты с *s*-РНК определяется соответствующей лигазой. Согласно этой точке зрения, специфическое взаимодействие данной репрессорной РНК с оператором структурного гена, который она контролирует, определяется комплементарной последовательностью полинуклеотидов, но ее взаимодействие с аминокислотой определяется специфичностью фермента, катализирующего реакцию присоединения. Это значит, что специфичным рецептором аминокислоты, вызывающей репрессию, должен быть специфичный к данной аминокислоте центр этого фермента, а не репрессорная РНК. Таким образом можно было бы объяснить сходство в свойствах рецептора и активных центров ферментов и вместе с тем избежать такой трудности, как необходимость приписывать нуклеиновым кислотам специфичность фермент-субстратного типа.

Можно было бы предположить, что одни присоединяющие ферменты взаимодействуют с аминокислотой-репрессором, а другие — с аминокислотой-индуктором, но это не обязательно должны быть разные ферменты. Действительно, соединение аминокислоты с репрессорной РНК в такой мере напоминает реакцию, катализируемую лигазами подгруппы 6.1.1, что возник вопрос, не осуществляются ли эти реакции одними и теми же ферментами и не идентична ли репрессорная РНК для данной аминокислоты нормальной *s*-РНК данной аминокислоты. Если это предположение верно, то для того, чтобы объяснить специфичность репрессии, вызываемой аминокислотами, достаточно было бы допустить, что операторы, контролирующие образование ферментов, которые синтезируют любую данную аминокислоту, содержат нуклеотидную последовательность, комплементарную к *s*-РНК этой аминокислоты (не обязательно кодирующую последовательность). Любая теория должна исходить из существования какой-нибудь такой специфической последовательности нуклеотидов в операторах. Биосинтез различных аминокислот должен при этом автоматически контролироваться концентрациями различных аминоацил-*s*-РНК, присутствующих в системе синтеза белка; если, например, в системе не хватает триптофана, то будет падать концентрация триптофанил-*s*-РНК, и это освободит от репрессии гены триптофансинтезирующих ферментов.

Если дело обстоит именно так, то это должно означать, что все *s*-РНК выполняют двойную функцию и что они образуются генами-регуляторами.

Имеются данные в пользу того, что репрессия щелочной фосфатазы протекает по описанному выше механизму с участием присоединяющего фермента. Репрессия неорганическим фосфатом зависит от совместного действия двух генов-регуляторов, причем полагают [814], что первый ген

образует предшественник истинного репрессора, а второй образует фермент, который превращает этот предшественник и фосфат в репрессор, иными словами — второй ген образует *присоединяющий фермент*.

В процессах индукции и репрессии пока еще много неясного. Нет теории, *объясняющей тот факт*, что некоторые репрессорные РНК соединяются с соответствующими операторами, только если они соединены с репрессирующими веществами, тогда как другие репрессорные РНК соединяются с соответствующими операторами, только если они *не* соединены с индукторами. Возможно, что в некоторых случаях механизм более сложен, чем предполагают. Например, Эйзенштадт и др. [684] продемонстрировали индуцированный синтез β-галактозидазы системой из *E. coli*, содержащей рибосомы, растворимые ферменты и ДНК, в которой имелся ген *z*. Для того чтобы этот процесс протекал, требовалось не только наличие индуктора; сама ДНК должна была быть получена из клеток, которые выросли в присутствии индуктора.

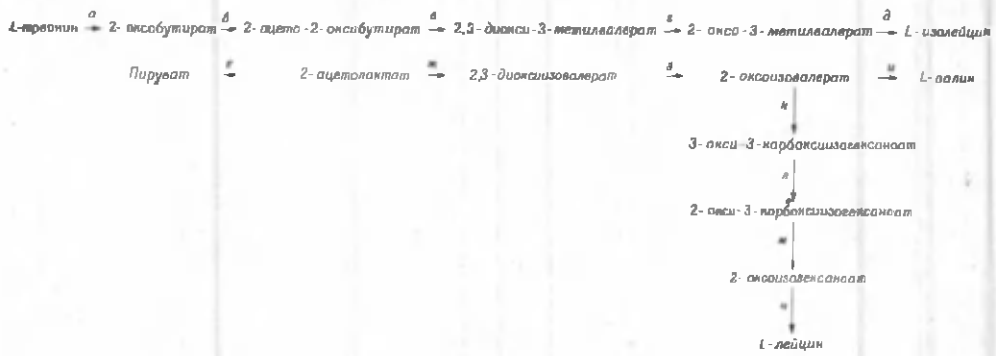
Основные теории, предложенные для объяснения индукции и репрессии биосинтеза ферментов, были разработаны *на основе наблюдений над* очень небольшим числом систем. Отнюдь не исключено, что в других системах *действуют какие-нибудь другие* механизмы. В отчете симпозиума [1224], на котором было зачитано сообщение Жакоба и Моно, обсуждаются также и некоторые другие гипотезы.

Наконец, следует упомянуть и о более общем репрессирующем эффекте, который вызывается глюкозой и некоторыми другими источниками углерода. Этот эффект был обнаружен Эппсом и Гейлом [704]. Для его объяснения было выдвинуто несколько теорий, критическое рассмотрение которых можно найти у Магасаника [1676]. Ходж (см. обсуждение в работе Магасаника и др. [1676]) полагает, что такое действие можно объяснить неспецифическим блокированием процесса освобождения синтезированных ферментов из рибосом.

Система биосинтеза с многими путями

Очень интересные явления наблюдаются в тех случаях, когда фермент, подвергающийся действию репрессора, принимает участие не в одной последовательности биосинтетических реакций, а в нескольких, ведущих к разным продуктам. У *E. coli* аспартаткиназа (2.7.2.4) участвует в реакциях образования лизина и треонина из аспартата. Если бы оба эти конечных продукта независимо друг от друга вызывали репрессию синтеза данного фермента, то избыток лизина приводил бы к недостатку треонина, и наоборот. Эта система была изучена Стэдменом и др. [2498]; авторы нашли, что имеются две аспартаткиназы, которые могут быть отделены друг от друга при фракционировании сульфатом аммония. Оба фермента катализируют одну и ту же реакцию и идентичны по кинетике действия. Однако L-лизин вызывает репрессию образования первого фермента и *не влияет на образование* второго. Лизин также неконкурентно тормозит активность первого фермента и не оказывает *такого влияния на второй* фермент. L-треонин не действует на первый фермент, но конкурентно тормозит активность второго, хотя он и не репрессирует *его синтез*. Таким образом, первая аспартаткиназа находится под контролем лизина, а вторая — под контролем треонина. Значение этого явления состоит в том, чтобы определенным образом ограничить репрессирующее действие лизина; как бы ни было сильно это действие, второй фермент остается незатронутым и предупреждает треониновую недостаточность. Возможно даже, что эти два пути пространственно разобщены, так что каждая киназа связана только со своей системой реакций. Интересно, что у дрожжей, где образование лизина идет не через аспартат, первый из этих ферментов отсутствует. По-видимому, у них имеется только одна аспартаткиназа и L-треонин вызывает как репрессию ее *образования*, так и *торможение ее активности*; лизин же не действует на нее вообще.

В только что описанном случае два биосинтетических пути имеют одну общую ферментативную реакцию, которая катализируется двумя сходными ферментами. Противоположная ситуация наблюдается, когда аналогичные реакции, имеющиеся на разных путях обмена, катализируются одним и тем же ферментом или ферментами. Подобный случай был изучен Фрейндлихом и др. [776] у *E. coli* и *Salmonella typhimurium*. Последние четыре этапа в процессе образования изолейцина из 2-оксобутирата (образуется из треонина) и валина из пирувата аналогичны, с той только разницей, что участники первой серии реакций имеют на одну метильную группу больше. Эти четыре этапа в обеих сериях реакций катализируются одними и теми же ферментами, т. е. реакции *б* и *е* (фиг. 137) катализируются одним ферментом, *в* и *ж* — другим и т. д. до реакций *д* и *и*. Путь, ведущий к L-лейцину, ответвляется на стадии 2-оксоизовалерата; ферменты, катализирующие реакции от *к* до *н*,



Фиг. 137. Система, иллюстрирующая поливалентную репрессию у бактерий.

участвуют только в этой цепи реакций. Не все ферменты были точно идентифицированы. Авторы исследовали репрессию образования трех ферментов, а именно ферментов, катализирующих реакции *а*, *г* (и *з*) и *м*.

Было обнаружено, что изолейцин и валин порознь не вызывают репрессии, тогда как лейцин вызывает только репрессию фермента, катализирующего стадию *м*. Можно вызвать очень сильную репрессию двух других ферментов, но для этого требуется смесь всех трех продуктов, а именно лейцина, валина и изолейцина. Таким образом, репрессию фермента, который участвует в образовании одной аминокислоты, вызывает только эта одна аминокислота, но фермент, который участвует в образовании каждой из трех аминокислот, репрессируется только смесью всех трех аминокислот, а не каждой аминокислотой в отдельности. Этот феномен был назван «поливалентной» репрессией. Он необходим для того, чтобы избыток каких-либо продуктов в системе не мог вызвать недостатка других.

Торможение по типу обратной связи

От внимания читателя, вероятно, не ускользнул тот факт, что репрессия синтеза ферментов не обеспечивает полного контроля над уровнем ферментов в системе, ибо этот механизм действует только «в одном направлении». Полная репрессия лишь предотвращает дальнейшее образование фермента, так что количество его в системе начиная с этого момента остается постоянным. Если фермента синтезировано больше, чем нужно, или если уменьшилась потребность в продукте, который этот фермент образует (вследствие, например, замедления роста), то репрессия не может привести к уменьшению количества фермента, не может скорректировать его «перепроизводство».

Поэтому контроль с помощью процессов индукции и репрессии дополняется другим контролем — так называемым торможением по типу обратной

связи. Известен ряд случаев, когда аминокислота (или нуклеотид) — конечный продукт определенной цепи реакций — играет роль специфического ингибитора по отношению к ферменту, катализирующему первую реакцию этой цепи, даже если сама она значительно отличается по своей структуре от субстрата данного фермента. Это обеспечивает контроль, которого иначе бы не существовало, ибо, хотя конечный продукт и не может путем репрессии уменьшить количество фермента, катализирующего какую-нибудь начальную стадию процесса, он может как ингибитор значительно уменьшить его активность.

Описанный механизм нужно четко отличать от репрессии, что, к сожалению, делают не всегда. Различия проявляются в том, что этот механизм а) тормозит активность фермента, уже синтезированного; б) действует практически мгновенно; в) действует обратимо; г) может быть продемонстрирован с очищенным ферментом; д) контролирует только тот фермент, который осуществляет первую реакцию, ведущую к образованию данного конечного продукта (ингибитора), а не все ферменты в цепи. (Последний пункт сформулирован, однако, на основе небольшого числа известных случаев, и возможно, что это не является общим правилом.)

Репрессию можно рассматривать как сравнительно медленно действующий механизм, который регулирует общий уровень метаболизма не мгновенно, а лишь по истечении известного времени, так как скорость, с которой действует этот механизм, ограничена скоростью синтеза фермента. Торможение по типу обратной связи, напротив, осуществляется быстро и может регулировать кратковременные колебания в уровне метаболизма. Достаточно ингибировать первый фермент в цепи, чтобы ингибировать всю цепь, даже если остальные ферменты не будут затронуты (разумеется, промежуточные продукты не должны при этом поставляться извне).

Первый фермент в цепи может контролироваться конечным продуктом с помощью только репрессии, только торможения по типу обратной связи или с помощью обоих этих механизмов одновременно. Напомним пример с двумя аспартаткиназами *E. coli*, который мы разбирали выше. Лизин в этом случае вызывает у первого фермента и репрессию и торможение по типу обратной связи, тогда как треонин у второго фермента вызывает только торможение по типу обратной связи. Реакция *а* на фиг. 137 конкуретно тормозится изолейцином; ни валин, ни другие аминокислоты не вызывают торможения этого фермента (исключение составляет лейцин, хотя он действует в 100 раз слабее, чем изолейцин). В то же время валин тормозит фермент, катализирующий реакцию *е*. Мартин и др. [1738] выделили первый фермент из серии ферментов, катализирующих реакции биосинтеза гистидина у *Salmonella typhimurium*. Это фермент катализирует образование N-1-(5′-фосфорибозил)-АТФ из АТФ и фосфорибозилпирофосфата. Было обнаружено, что гистидин в концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ *M* вызывает 50%-ное торможение этого фермента; но тот же гистидин даже в концентрации 10^{-3} *M* не оказывает никакого влияния на следующие четыре фермента этой серии. Все эти ферменты представлены в одном опероне и все они репрессируются гистидином.

В системе реакций, изображенной на фиг. 136, фермент, катализирующий реакцию *ж*, тормозится ЦМФ (но не урацилом или УМФ), причем ЦМФ конкурирует с карбамоилфосфатом и (в меньшей степени) с аспартатом. УМФ, как уже упоминалось, вызывает репрессию этого фермента. В клетках (но не в экстрактах) УМФ может превращаться в ЦМФ, а потому возможно, что ЦМФ обусловливает оба эти эффекта.

Первый фермент, который участвует только в синтезе пуриновых нуклеотидов,— это фермент, катализирующий реакцию 3 табл. 58. Он был выделен из печени голубя, и выяснилось, что его торможение вызывают АТФ, АДФ, АМФ, ГДФ, ГМФ и ИМФ, которые конкурируют с фосфорибозилпирофосфатом, но не конкурируют с глутамином [2922]. Умбаргер [2695],

обсуждая весь вопрос в целом, упоминает о ряде других аналогичных случаев.

Продукт, тормозящий активность фермента, часто почти или совсем не имеет сходства с его субстратом и не имеет, очевидно, связи с той реакцией, которую данный фермент катализирует. Ферменты, подчиняющиеся такому контролю, должны иметь два специфичных центра, один — активный центр, специфичный по отношению к субстрату, и другой — центр для ингибитора, специфичный по отношению к продукту того метаболического пути, который начинается с действия данного фермента. Эти центры могут в какой-то степени перекрываться, но могут и не перекрываться; если они перекрываются, то торможение носит конкурентный характер. В некоторых случаях можно блокировать центр для ингибитора с помощью химических средств без того, чтобы это повлияло на каталитическую активность фермента. Тот же эффект может иметь и мутация. Некоторые аналоги аминокислот ведут себя как бактериостатические вещества, потому что они тормозят образование аминокислот, и в то же время не могут использоваться вместо них как ростовые факторы. Мутанты с блоком, о котором сказано выше, устойчивы к таким веществам, ибо у них эти вещества не могут тормозить синтез аминокислот [1888].

Изучение биологического контроля, осуществляемого путем регулирования действия ферментов, по сути дела, еще только начинается, но не приходится сомневаться, что этот вопрос станет со временем одним из самых важных. Такой контроль может играть большую роль не только потому, что он дает возможность микроорганизмам приспособить свой обмен к составу окружающей среды; он может иметь значение и для высших организмов при дифференцировке тканей и даже (вследствие дифференцированной регуляции скорости роста) при формообразовании. С точки зрения энзимолога основная отличительная особенность опухолевой ткани состоит в том, что ее клетки вышли из-под нормального организующего контроля, действовавшего в исходной ткани.

Структура обоих специфичных центров фермента, подчиняющегося торможению по типу обратной связи, определяется структурным геном этого фермента. Гены поразительно много «знают» о последовательности химических процессов, из которых слагается метаболизм. Можно задать вопрос, каким образом ген, ответственный за синтез фермента 2.4.2.14, «знает», что фосфорибозилпирофосфат будет превращен последовательным действием десяти или более различных ферментов в пуриннуклеотид (табл. 58), или откуда ген первого фермента в цепи при биосинтезе гистидина, действующий на то же соединение, «знает», что его продукт будет превращен в гистидин другой серией ферментов. Каким образом эти гены, даже имея эту информацию, «знают», какая последовательность аминокислот в их ферментах будет действовать в качестве специфичных центров, соединяющихся с пуриннуклеотидами или гистидином соответственно?

Очевидно, должен существовать какой-то механизм, с помощью которого информация, полученная из самих метаболических процессов, возвращается к генам и трансформируется в последовательность нуклеотидов. Вопрос о том, как впервые возник такой механизм и как он действует,—это, несомненно, один из наиболее увлекательных и важных вопросов в биологии.

Образование ферментов из предшественников

Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта вырабатываются в виде неактивных белков, которые лишь впоследствии превращаются в активные ферменты. Пепсин, реннин, трипсин, химотрипсин и карбоксипептидаза А секретируются в виде своих неактивных предше-

ственников — пепсиногена, провеннина, трипсиногена, химотрипсиногена и прокарбоксипептидазы А. Это, несомненно, следует рассматривать как приспособление, предотвращающее самопереваривание тех тканей, которые вырабатывают данные ферменты. Пепсиноген, трипсиноген и химотрипсиноген были получены в виде чистых кристаллических белков. Методы, применявшиеся для их очистки, и свойства этих белков описаны в работе Нортропа, Кунитца и Херриотта [1996]. Возможно, что и некоторые другие ферменты (например, ферменты, участвующие в процессе свертывания крови) также продуцируются в форме неактивных белков; однако следует отметить, что прохождение стадии неактивного предшественника характерно, по-видимому, только для протеолитических ферментов.

Превращение предшественников в активные ферменты происходит каталитически под действием либо соответствующих ферментов, либо ионов водорода. Пепсиноген и провеннин активируются, например, ионами водорода; пепсиноген — ионами водорода или самим пепсином; химотрипсиноген и прокарбоксипептидаза А — трипсином; трипсиноген — трипсином или энтеропептидазой. Важная особенность активации пепсиногена и трипсиногена состоит в том, что эта активация осуществляется тем же ферментом, который в результате активации образуется; следовательно, процесс является аутокаталитическим и скорость его неуклонно, и притом очень быстро, возрастает. Изучению механизма различных процессов активации посвящено большое число исследований; во всех изученных случаях процесс, по-видимому, заключается в разрыве пептидных связей с отщеплением или без отщепления свободных пептидов.

Выяснение механизма активации и различий между предшественником и соответствующим активным ферментом может дать очень важные сведения о природе и расположении активных центров ферментов. По-видимому, процесс активации включает демаскирование активного центра, и если удастся установить различия между двумя столь сходными белками, то это может послужить ключом к разгадке структуры, от которой зависит ферментативная активность. Рассмотрим каждый случай подробно.

АКТИВАЦИЯ ПЕПСИНОГЕНА

Природа этого процесса окончательно еще не выяснена; наблюдаемые изменения довольно сложны, и не ясно, в какой мере они обусловливаются собственно процессом активации и в какой мере — последующим процессом переваривания. Пепсиноген и пепсин свиньи были получены в кристаллическом состоянии Нортропом и другими авторами. Молекулярный вес пепсиногена равен 42 000, а пепсина — приблизительно 34 500 [303]. Пепсин — значительно более кислый белок, нежели пепсиноген; он движется как отрицательно заряженный ион даже при pH 1, тогда как изоэлектрическая точка пепсиногена лежит при pH 3,7. Следовательно, при активации пепсиногена отщепляется приблизительно одна пятая часть молекулы, и эта отщепляющаяся часть имеет основной характер.

Кинетика активации пепсиногена свиньи была изучена Херриоттом [1081]. Активация пепсиногена начинается либо при подкислении раствора, либо при добавлении пепсина, и ниже pH 5 она протекает аутокаталитически. Кривая хода процесса активации описывается уравнением

$$\frac{d\,[\text{Пепсин}]}{dt} = k\,[\text{Пепсиноген}]\,[\text{Пепсин}], \qquad \text{(XI.3)}$$

откуда, интегрируя, получаем

$$kt = \frac{2{,}3}{[\text{Пепсин}]_\infty}\lg\frac{[\text{Пепсин}]_t\,[\text{Пепсиноген}]_0}{[\text{Пепсин}]_0\,[\text{Пепсиноген}]_t}. \qquad \text{(XI.4)}$$

Процесс имеет максимальную скорость при pH 2.

Данные титрования показывают, что при образовании активного пепсина из пепсиногена расщепляется до 9 пептидных связей на молекулу. В результате образуется шесть небольших пептидов; наибольший из них («ингибитор пепсина») остается присоединенным к пепсину при pH $> 5{,}4$, так что в этих условиях процесс не является аутокаталитическим. При более низких значениях pH происходит обратимая диссоциация комплекса фермент — ингибитор. Это взаимодействие между ферментом и ингибитором определяет приложимость так называемого закона Шютца, поскольку в неочищенных препаратах пепсина обычно присутствует ингибитор (гл. IV, раздел А). Херриотт [1082] очистил и получил в кристаллическом виде ингибитор пепсина свиньи, а также исследовал равновесие между пепсином и ингибитором; соединение пепсина и ингибитора обратимо, и положение равновесия в значительной степени зависит от pH. Первоначально считали, что ингибитор имеет молекулярный вес в пределах 4000—10 000 и представляет собой основной полипептид с высоким содержанием аргинина, но без триптофана и тирозина. Исследования, проведенные Ван-Вунакисом и Херриоттом [2723], изменили, однако, эти представления. В настоящее время методом Сэнгера показано, что молекулярный вес ингибитора равен 3240 и что его молекула содержит 29 аминокислотных остатков, среди которых имеется только один остаток аргинина, но также один остаток тирозина и четыре остатка лизина. В состав молекулы входят и кислые группы: было обнаружено четыре остатка аспарагиновой и два остатка глутаминовой кислоты.

Эти же исследователи изучали и другие продукты, образующиеся наряду с ингибитором в процессе активации пепсиногена. Они обнаружили пять нейтральных пептидов, состоящих в среднем из 10 аминокислотных остатков и имеющих суммарный молекулярный вес около 4000. Образование этих пяти пептидов и ингибитора пепсина и является причиной различия между молекулярными весами пепсиногена и пепсина; оно же объясняет и разрыв шести пептидных связей (напомним, что в процессе активации на каждую молекулу их разрывается девять).

Анализ концевых групп показывает, что и у пепсиногена и у пепсина молекула представляет собой одиночную пептидную цепь. С помощью карбоксипептидазы было установлено [2722], что последовательность аминокислот на С-конце полипептидной цепи одинакова у обоих белков (R-валиллейцилаланин). Таким образом, представляется весьма вероятным, что пепсин занимает С-концевое положение в молекуле пепсиногена. Поэтому теоретически пепсиноген может быть превращен в пепсин просто путем гидролиза той единственной пептидной связи, которая соединяет данный («пепсинный») фрагмент с остальной частью цепи. Расщепляются ли другие восемь связей до или после гидролиза этой связи, не известно. Известно, однако, что образовавшийся пепсин может в дальнейшем гидролизовать другие продукты. В частности, при стоянии препарата сам ингибитор также гидролизуется пепсином с образованием небольших пептидов; оптимум pH для этого процесса лежит при 3,5. Весь процесс образования пепсина из пепсиногена свиньи можно изобразить следующим образом:

$$\text{Пепсиноген} \xrightarrow{\text{пепсин}} \text{Комплекс (пепсин — ингибитор)} + 5\ \text{Пептид}, \qquad \text{(XI.5)}$$

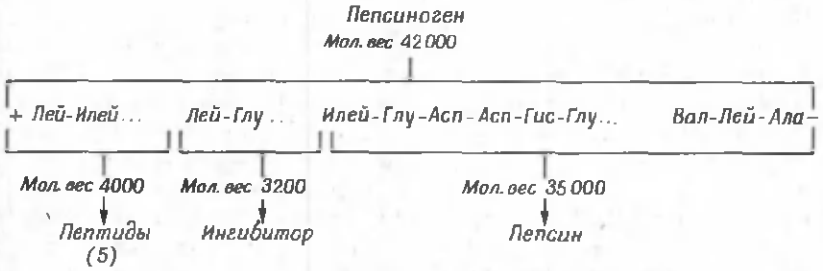
$$\text{Комплекс (пепсин — ингибитор)} \underset{\text{pH}>5{,}4}{\overset{\text{pH}<5{,}5}{\rightleftharpoons}} \text{Пепсин} + \text{Ингибитор}, \qquad \text{(XI.6)}$$

$$\text{Ингибитор} \xrightarrow{\text{пепсин}} 4\ \text{Пептид}. \qquad \text{(XI.7)}$$

Ван Вунакис и Херриотт [2724] определили также последовательность аминокислот на N-конце цепи пепсиногена, ингибитора и пепсина: лейцилизолейцил-R′, лейцилглутамил-R″ и изолейцилглицил-R‴ соответ-

ственно. Это показывает, что ингибитор не занимает N-концевого положения в пепсиногене. Последовательность шести аминокислот на N-концевом участке пепсина определили Уильямсон и Пассман [2874]. Имеющиеся данные о строении цепи пепсиногена схематически представлены на фиг. 138, где концевые NH_3^+- и COO^--группы обозначены соответственно знаками + и —.

Пепсин свиньи и пепсин быка представляются идентичными на основании всех обычных тестов, таких, как форма кристаллов, растворимость, физические свойства, ферментативная активность (измеренная по отношению к нескольким различным субстратам) и даже иммунологические реакции (последним, впрочем, не следует придавать слишком большого значения, так как реакции преципитации проводились с денатурированными ферментами). Имеется, однако, один тест, который, по-видимому, указывает на то, что мы все же имеем дело с разными белками. Хотя растворимость



Фиг. 138. Образование пепсина из пепсиногена.

этих белков одинакова, каждый из них растворяется независимо от присутствия другого, так что растворимость смеси оказывается вдвое больше растворимости каждого отдельного белка. Пепсин курицы отличается от пепсина свиньи меньшей скоростью инактивации при pH 9. Этот факт был использован при изучении активации пепсиногена одного вида животных пепсином другого вида. Было обнаружено, что при активации пепсиногена свиньи пепсином курицы образуется пепсин свиньи, и наоборот. Имеется видовая специфичность и в действии ингибиторов пепсина; ингибитор из пепсиногена свиньи одинаково ингибирует пепсины свиньи и быка, но не действует на пепсин курицы; пептид, отщепляющийся от пепсиногена курицы, тоже ингибирует пепсины свиньи и быка, но, как это ни странно, не действует на пепсин курицы. Таким образом, отличия в поведении пепсина по отношению к ингибитору связаны, вероятно, со свойствами самого пепсина, а не ингибитора; пепсины свиньи и быка поддаются действию ингибитора, а пепсин курицы — нет, независимо от того, каков источник этого ингибитора.

АКТИВАЦИЯ ПРОРЕННИНА

Существование прореннина было обнаружено в 1932 г. Клайнером и Таубером [1396], но ни они, ни авторы, работавшие позднее их, не сумели получить его в чистом виде. Активацию прореннина изучали Клайнер и Таубер, а также Эдж и Лундстин [677] в 1934 г.; позднее, насколько нам известно, этим вопросом никто не занимался. О природе процесса известно очень немногое. Мы знаем, что он катализируется кислотой (очень медленно при pH 5 и с весьма большой скоростью при pH < 3). Неизвестно, может ли активация осуществляться ферментативным путем. Некоторые из экспериментальных кривых, приведенных Эджем и Лундстином, свидетельствуют как будто о довольно четко выраженном аутокаталитическом характере процесса, и это наводит на мысль, что образующийся реннин может оказы-

вать активирующее действие. Те же авторы сообщают, что прореннин активируется «панкреатином» при pH 5,5, т. е. в условиях, когда кислотная активация невозможна.

АКТИВАЦИЯ ТРИПСИНОГЕНА

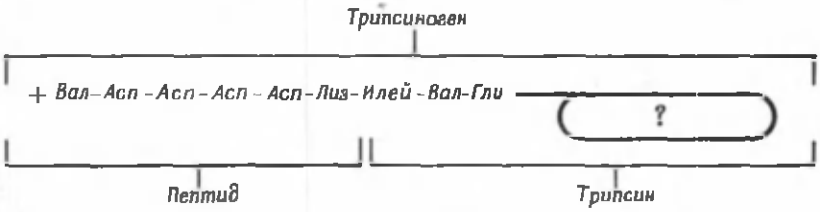
Поджелудочная железа образует и выделяет не трипсин, а трипсиноген. В очистке трипсиногена и трипсина, а также в исследовании кинетики превращения главная заслуга принадлежит школе Нортропа (см. [1996]). Кристаллический трипсиноген может быть активирован самим трипсином (ср. пепсиноген), так что при соответствующих условиях процесс оказывается аутокаталитическим. Трипсиноген может также активироваться энтеропептидазой — протеолитическим ферментом, присутствующим в секрете слизистых желез кишечника, и, кроме того, подобными же ферментами, полученными из других источников, например «киназой» из *Penicillium* sp. [1488]. При всех условиях образуется один и тот же трипсин.

Аутокатализ осложняется альтернативной реакцией, в результате которой трипсиноген превращается не в трипсин, а в неактивный белок [1655]. Реакция образования активного трипсина конкурирует с реакцией образования неактивного белка; распределение трипсиногена между этими двумя реакциями зависит от pH и от присутствия некоторых ионов. Ионы кальция, в частности, ускоряют первую реакцию и тормозят вторую, так что в присутствии 0,02 *M* $CaCl_2$ реакция, начавшаяся под действием небольшого количества энтеропептидазы, протекает далее как чисто аутокаталитическая. От распределения трипсиногена между этими двумя реакциями зависит выход активного фермента; высокому выходу способствует присутствие кальция, а также низкий pH (<4), хотя скорость активации при таком pH оказывается меньше. Таким образом, добавление кальция дает возможность получить высокий выход активного фермента с достаточной скоростью.

«Киназа» плесневых грибов заметно отличается от других «киназ» тем, что действует в кислой среде (оптимум pH 3,5), в которой трипсин неактивен; поэтому в данном случае активация не является аутокаталитическим процессом, а подчиняется закону мономолекулярной реакции. Энтеропептидаза лучше всего действует при pH 6—8, но, поскольку сам трипсин активен в этой области и катализирует превращение трипсиногена как в трипсин, так и в неактивный белок, трудно сказать определенно, в какой мере активация осуществляется за счет трипсина и в какой мере — за счет энтеропептидазы. Приближение активации к таким условиям, когда действует одна энтеропептидаза, т. е. к условиям чистой мономолекулярной реакции, достигается, если использовать небольшое количество трипсиногена и относительно большое количество энтеропептидазы, особенно при $pH < 6$. И наоборот — процесс, приближающийся по своему характеру к активации одним трипсином (иными словами, чисто аутокаталитический процесс), наблюдается при использовании больших количеств трипсиногена и следовых количеств энтеропептидазы.

Молекулярные веса трипсиногена и трипсина быка идентичны в пределах ошибки опыта; они равны для обоих белков приблизительно 24 000. Имеются, однако, небольшие различия в величинах поглощения в ультрафиолете и в аминокислотном составе фермента и профермента, а это указывает, что превращение трипсиногена в трипсин сопровождается, очевидно, отщеплением небольшого участка молекулы. Молекула обоих белков состоит из одной пептидной цепи; в составе трипсиногена и трипсина определяют одну α-аминогруппу [2262], однако с помощью карбоксипептидазы не удается определить свободную С-концевую аминокислоту. Последнее обстоятельство заставляет предполагать наличие циклической структуры

на этом конце молекулы, хотя тот же факт можно объяснить и простой стерической недоступностью концевой аминокислоты для карбоксипептидазы. N-концевые аминокислоты у трипсина и трипсиногена быка различны, как показали Роувери, Фабр и Дэньюэл [2262]; первый на N-конце имеет изолейцин, а второй — валин. Эти данные также говорят о том, что в процессе активации от N-конца цепи трипсиногена отщепляется небольшой пептид; и действительно, Дэви и Нейрату [553] удалось выделить этот пептид и показать, что он является гексапептидом. Таким образом, процесс активации трипсиногена трипсином по характеру сходен с процессом активации пепсиногена и состоит в отщеплении части молекулы с N-конца цепи; правда, процесс активации трипсиногена проще и отщепляемая часть здесь



Фиг. 139. Образование трипсина из трипсиногена.

значительно меньше, чем в случае активации пепсиногена. Аналогичные результаты получены для активации трипсиногена энтеропептидазой [2935, 2937]. Два варианта процесса можно записать в следующем виде:

$$\text{Трипсиноген} \xrightarrow[\text{или «киназы»}]{\text{трипсин}} \text{Трипсин} + \text{Гексапептид}, \qquad \text{(XI.8)}$$

$$\text{Трипсиноген} \xrightarrow{\text{трипсин}} \text{Неактивный белок} + ? \qquad \text{(XI.9)}$$

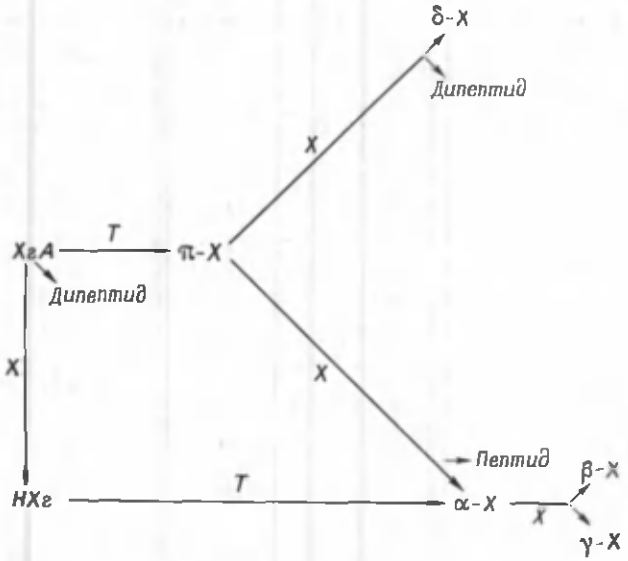
Сведения о последовательности аминокислот в молекуле бычьего трипсиногена, трипсина и гексапептида позволили достаточно ясно представить химическую картину процесса активации. В схематическом виде эти данные представлены на фиг. 139. Активация трипсиногена состоит, таким образом, в расщеплении одиночной пептидной связи между лизином и изолейцином. Во время этого процесса или в результате его демаскируется активный центр. Демаскировка может быть обнаружена химически, так как трипсин в отличие от трипсиногена способен присоединять одну молекулу диизопропилфторфосфата на молекулу белка.

Позднее Роувери и Дэньюэл [2260] исследовали трипсиноген из поджелудочной железы свиньи. N-концевым остатком этого трипсиногена оказался фенилаланин, и аутокаталитическая активация его состоит в расщеплении одной пептидной связи и освобождении октапептида Фен-(Тре, Про, $Асп_4$)-Лиз. С-концевую последовательность аминокислот у трипсиногена и у трипсина свиньи (в отличие от трипсиногена и трипсина быка) определить легко. С-концевая последовательность, не затрагиваемая при превращении трипсиногена в трипсин,— это либо Илей-Ала-Асп(NH_2), либо Илей-Ала-Глу(NH_2).

АКТИВАЦИЯ ХИМОТРИПСИНОГЕНА

Отличительной чертой системы химотрипсиноген — химотрипсин является существование ряда различных активных форм. Большую часть этих форм удалось получить в кристаллическом виде. Обычный химотрипсиноген поджелудочной железы, который Кунитц и Нортроп [1494] выделили в кристаллическом виде, известен под разными названиями: «химо-

трипсиноген», «химотрипсиноген А» (это название мы предпочитаем), «химотрипсиноген α» и «α-химотрипсиноген». Второй химотрипсиноген из поджелудочной железы — химотрипсиноген В — был получен в кристаллическом виде Лясковским и др. [342]. Химотрипсиноген В кристаллизуется труднее, и поэтому первоначально считали, что в соке поджелудочной железы он содержится в небольшом количестве. Однако Дэньюэл [596] показал, что в соке поджелудочной железы быка содержатся приблизительно равные количества химотрипсиногенов А и В. Оба химотрипсиногена активируются трипсином и не активируются химотрипсином, хотя химотрипсин может вызывать последующие изменения. Поэтому процесс активации не принадлежит к числу аутокаталитических. При активации химотрипсиногена А образуются (но не в указанном порядке) α-, β-, γ-, δ- и π-химотрипсины:



Фиг. 140. Соотношения в системе химотрипсина.
X — химотрипсин; Xг — химотрипсиноген; НXг — неохимотрипсиноген; Т — трипсин.

α-, β- и γ-химотрипсины были получены как таковые в кристаллическом виде, а δ-химотрипсин удалось получить в виде диизопропилфосфатного производного. Химотрипсиноген В при активации переходит в химотрипсин В; последний также был получен в кристаллическом виде.

Вероятный ход превращений химотрипсиногена А при различных условиях представлен на фиг. 140.

Если химотрипсиноген А активируется небольшим количеством трипсина, так что процесс протекает сравнительно медленно, то скорость активации пропорциональна количеству добавленного трипсина и активация протекает как мономолекулярная реакция. В этих условиях образуется преимущественно α-химотрипсин, который получили в кристаллическом виде Кунитц и Нортроп [1494]; однако в такой форме может быть получено не более 50% образующегося химотрипсина. Кунитц [1487] показал, что при стоянии маточного раствора в течение нескольких дней получаются кристаллы различной формы; это смешанные кристаллы, состоящие из β- и γ-химотрипсина с небольшой примесью неактивного белка. Путем перекристаллизации при другом значении pH γ-фермент может быть получен в чистом виде. При более высокой концентрации соли после удаления γ-фермента можно получить смешанные кристаллы β-фермента с неактивным белком; если раствор этих кристаллов сохранять при температуре 35° и pH 8,

то β-фермент переварит неактивный белок, после чего этот β-фермент можно будет закристаллизовать в чистом виде. Образование β- и γ-ферментов из α-фермента, по-видимому, не вызывает сомнения, так как любой из них можно получить, если оставить стоять при соответствующих условиях раствор перекристаллизованного α-фермента. При кратковременной инкубации раствора в условиях более высоких значений pH и при более высоких температурах предпочтительно образуется α-фермент; для образования β-фермента требуются противоположные условия. При соответствующем регулировании условий α-фермент может быть по желанию почти полностью превращен либо в β-, либо в γ-фермент, если судить о превращении по ферментативной активности (хотя до 35% белка α-фермента в процессе превращения теряется). Однажды полученные растворы β- и γ-ферментов могут быть перекристаллизованы без изменений; отсюда ясно, что эти ферменты не превращаются друг в друга и не могут вновь превратиться в α-фермент.

По своим ферментативным свойствам α-, β- и γ-химотрипсины неразличимы: они обладают одинаковой специфичностью и приблизительно одинаковой активностью по отношению к ряду различных субстратов. Иммунологически они также неразличимы. Тем не менее эти белки имеют и вполне определенные отличия: они различаются своей растворимостью, скоростью инактивации и величиной молекулярного веса. Объяснить причину различия их молекулярных весов довольно сложно вследствие того, что по крайней мере α-фермент существует главным образом в виде димера.

Если активация химотрипсиногена А осуществляется под действием большого количества трипсина при 0°, то кинетика реакции становится более сложной. На основании глубокого изучения кинетики Якобсен [1227] пришел к заключению, что данный процесс идет в этом случае иным путем, причем вначале в результате гидролиза одной пептидной связи образуется очень активный и очень нестабильный химотрипсин, который он назвал «π-химотрипсином». Активность этого компонента в 2,5 раза больше активности α-химотрипсина. π-Химотрипсин в результате гидролиза второй пептидной связи быстро превращается в другой фермент, δ-химотрипсин, с активностью, в 1,5 раза большей, чем у α-фермента. Тот же π-фермент в результате гидролиза, очевидно, трех пептидных связей может превратиться в α-фермент; однако при быстрой активации выход α-химотрипсина составляет меньше 1%. Это заключение подтвердили Беттельгейм и Нейрат [242], которые действительно выделили π- и δ-формы фермента в виде неактивных диизопропилфосфатных производных практически в чистом виде (δ-фермент был получен также в виде загрязненных кристаллов). Для того чтобы получить π-фермент, необходимо было затормозить действие химотрипсина добавлением специфичного ингибитора β-фенилпропионата. На основании этих и некоторых других данных названные авторы сочли, что вопреки мнению Якобсена превращение π-фермента в δ- и α-ферменты катализируется самим химотрипсином. Они нашли, что активности π- и δ-ферментов приблизительно одинаковы. δ-Фермент отличается не только более высокой величиной V, но по сравнению с α-ферментом также и более высоким сродством к синтетическим субстратам; эти данные говорят о том, что рассматриваемые ферменты различаются не только по числу активных центров [2350].

Выяснению природы изменений, происходящих в процессе активации химотрипсиногена, в большой мере способствовали работы по анализу концевых групп у различных форм, особенно работы школы Дэньюэла и Нейрата (см. [241, 242, 596, 1957]). Обычными методами не удалось определить концевые аминокислоты в химотрипсиногене А; поэтому вначале предполагалось, что он содержит замкнутую цепь. Однако Беттельгейм [241] показал, что после окисления на N-конце молекулы химотрипсиногена обнару-

живается остаток цистеина; отсюда он сделал заключение, что N-концевое положение в этой молекуле занимает остаток полуцистина. При действии на нативный химотрипсиноген карбоксипептидазой не удавалось также определить С-концевую аминокислоту; однако после восстановления дисульфидных связей на С-конце обнаружили остаток аспарагина [1777, 2263] (тот же результат получился и после денатурации химотрипсиногена мочевиной). При расщеплении дисульфидных связей в химотрипсиногене А его молекулярный вес не менялся; следовательно, его молекула состоит из одиночной открытой цепи, которая начинается полуцистином и оканчивается аспарагином. Цепь содержит приблизительно 240 аминокислотных остатков, и в настоящее время уже достигнуты большие успехи в расшифровке полной последовательности входящих в нее аминокислот (см. [1012]). Третичная структура химотрипсиногена А, по-видимому, такова, что концевые аминокислоты недоступны для химических веществ и для действия ферментов.

Превращения, происходящие в процессе активации химотрипсиногена А и сопровождающиеся появлением новых концевых групп, приведены на фиг. 140. Ниже указаны аминокислоты, которые занимают концевое положение в различных формах химотрипсина.

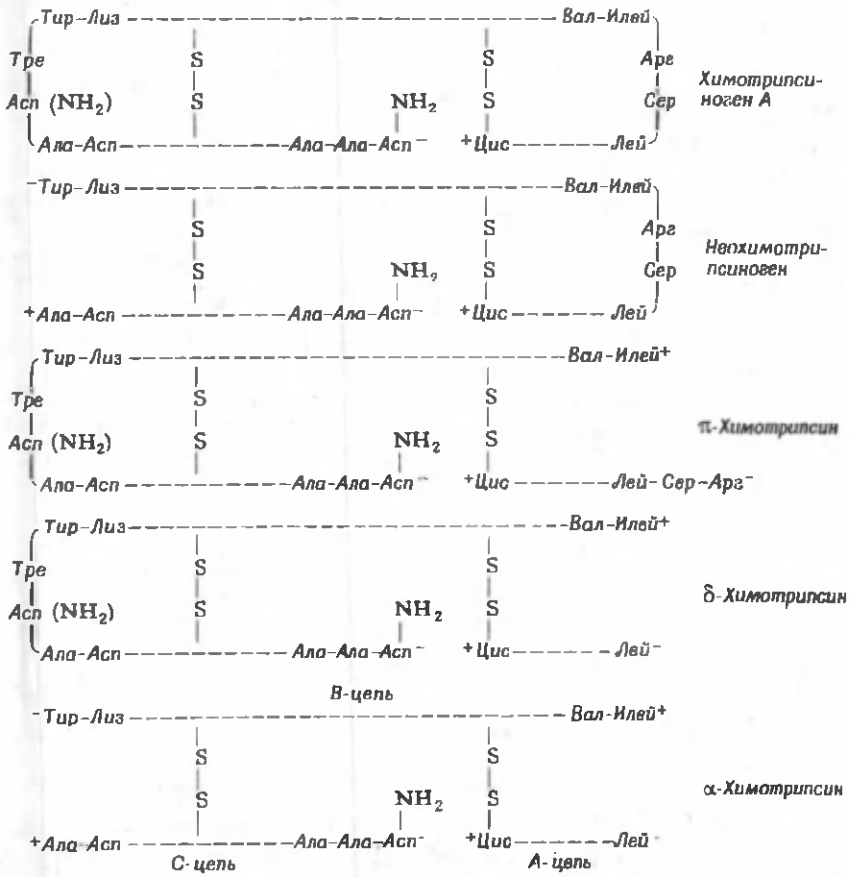
Форма химотрипсина	*N-конец*	*С-конец*
Химотрипсиноген А	Полуцистин	Аспарагин
Неохимотрипсиноген	Полуцистин	Аспарагин
π-Химотрипсин	Аланин	Тирозин
δ-Химотрипсин	Полуцистин	Аспарагин
α-, β- и γ-Химотрипсины	Изолейцин	Аргинин
	Полуцистин	Аспарагин
	Изолейцин	Лейцин
	Полуцистин	Аспарагин
	Изолейцин	Лейцин
	Аланин	Тирозин

Превращение π-химотрипсина в δ-химотрипсин сопровождается освобождением дипептида, идентифицированного Дрейером и Нейратом [654] как сериларгинин; превращение химотрипсиногена А в неохимотрипсиноген под действием самого химотрипсина сопровождается освобождением еще одного дипептида — треониласпарагина [2264]. Эти результаты вместе с данными анализа концевых групп говорят о том, что все процессы активации могут быть сведены к гидролизу четырех пептидных связей, а именно связей между тирозином и треонином, аспарагином и аланином, лейцином и серином и аргинином и изолейцином. На фиг. 141 приведено несколько возможных структур различных форм химотрипсина.

Из этой фигуры видно, что одиночная цепь химотрипсиногена расщепляется на три открытые цепи в α-химотрипсине. Они удерживаются вместе дисульфидными мостиками, но могут быть получены в виде отдельных пептидов при окислении этих мостиков надмуравьиной кислотой, как показал Мидом [1776]. Так как химотрипсин гидролизует молекулу химотрипсиногена недалеко от С-конца, а трипсин — недалеко от N-конца, три цепи α-химотрипсина (А-, В- и С-цепи по Мидому) резко различаются по своей длине. А-цепь состоит из 13 аминокислотных остатков и имеет на N-конце полуцистин, а на С-конце — лейцин; С-цепь состоит приблизительно из 50 остатков и имеет на N-конце аланин, а на С-конце — аспарагин. В-цепь, включающая около 180 остатков, составляет большую часть молекулы и содержит необходимый для активности гистидин, хотя чувствительный к ДФФ серин, по-видимому, находится в С-цепи [1012]. Изменения, происходящие под влиянием трипсина в правой части структуры, которая изображена на фиг. 141, приводят к демаскированию или к образованию

активного центра. Эти превращения сопровождаются, по-видимому, глубокими изменениями в третичной структуре белка, следствием чего оказывается значительное уменьшение оптического вращения [1958]. Активация может происходить независимо в различных частях молекулы, которые при сближении становятся частью активного центра [596].

Изменения в левой части структуры происходят под влиянием самого химотрипсина. Они не нужны для процесса активации; более того, они



Фиг. 141. Возможные структуры химотрипсинов.

Следует отметить, что вследствие написания структуры в циклической форме верхняя строчка (в отличие от общепринятого способа написания) имеет справа N-концевую аминокислоту; таким образом, последовательность остатков на правом конце будет изолейцилвалил, а не валилизолейцин.

даже приводят, по-видимому, к снижению удельной активности фермента. Эти два ряда изменений, протекающих под действием протеолитических ферментов, могут осуществляться в любом порядке, в зависимости от того, какой активатор присутствует. Высокий выход наиболее активной формы, π-химотрипсина, может быть получен только при «быстрой активации» высокими концентрациями трипсина (благодаря этому сводится к минимуму автолиз образующимся химотрипсином). В то же время действие относительно большого количества чистого α-химотрипсина на чистый химотрипсиноген А приводит к образованию трех неохимотрипсиногенов [2264, 2265], которые сами не обладают активностью, но могут активироваться, превращаясь в α-химотрипсин. Эти неохимотрипсиногены образуются при расщеплении связей между тирозином и треонином, а также между аспа-

рагином и аланином, что предшествует истинной активации. В процессе «медленной активации» химотрипсиногена А низкими концентрациями трипсина одновременно расщепляются как те, так и другие связи, поэтому главным продуктом оказывается α-химотрипсин.

О структуре химотрипсиногена В или о химии его превращения в химотрипсин В под действием трипсина известно пока немногое. Имеется сообщение [1312] о том, что в процессе активации на С-конце молекулы появляется аргинин, как и при активации химотрипсиногена А.

Активация прокарбоксипептидазы

Существование предшественника карбоксипептидазы А в соке поджелудочной железы было продемонстрировано Ансоном [77], которому удалось частично его очистить. Позднее Келлер, Коэн и Нейрат [1352, 1353] получили этот предшественник в почти чистом виде и провели сравнение его физических свойств с физическими свойствами карбоксипептидазы. Различия между предшественником и ферментом в этом случае значительно больше, чем в других известных случаях. Изоэлектрическая точка прокарбоксипептидазы лежит ниже pH 4,5, тогда как для карбоксипептидазы она лежит при pH 6,0; константы седиментации предшественника и фермента равны 5, 87 и 3,07 соответственно, а молекулярные веса, рассчитанные из данных светорассеяния, равны 96 000 и 34 300. В соответствии с этим ферментативная активность, получаемая при активации 1 *мг* прокарбоксипептидазы А составляет только $^1/_3$ активности 1 *мг* карбоксипептидазы А. По-видимому, в процессе активации прокарбоксипептидазы $^2/_3$ молекулы отщепляется.

Активация прокарбоксипептидазы А — более сложный процес, нежели те, о которых мы говорили раньше, так как она включает расщепление многих пептидных связей. Этот процесс осуществляется в результате комбинированного действия трипсина и эндопептидазы, которая также образуется из прокарбоксипептидазы А [1353]. При этом, очевидно, имеют место следующие этапы:

$$\text{Прокарбоксипептидаза А} \xrightarrow{\text{трипсин}} \text{Эндопептидаза} \longrightarrow$$

$$\xrightarrow{\text{трипсин+эндопептидаза}} \text{Карбоксипептидаза А.}$$

На N-конце карбоксипептидазы А находится аспарагинилсерин, а на С-конце — аспарагин [70, 2643], однако у нас нет уверенности в том, что оба эти конца образуются в результате активации.

Карбоксипептидаза В (3.4.2.2) в соке поджелудочной железы также существует в виде неактивного предшественника и также активируется трипсином. Активированный фермент представлен одиночной полипептидной цепью, у которой на N-конце находится треонилсерин, а на С-конце — аспарагинилтреонин [756].

АКТИВАЦИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА

Мы рассмотрели активацию предшественников протеолитических ферментов в соке поджелудочной железы для каждого из ферментов в отдельности. В пищеварительной системе, однако, эти процессы не протекают независимо один от другого, так как один из предшественников (трипсиноген) образует фермент, который активирует все предшественники. Сок остается неактивным до тех пор, пока он не придет в контакт с достаточно большим количеством энтеропептидазы; тогда начинается быстрая активация всех предшественников, которая по виду протекает аутокаталитически. Этот ее характер обусловлен, однако, тем обстоятельством, что трип-

син образуется в результате аутокатализа (поскольку трипсин превращает трипсиноген в трипсин). Процесс активации других предшественников не является аутокаталитическим; они активируются под действием трипсина, количество которого быстро возрастает.

Можно было бы думать, что небольшое число молекул энтеропептидазы сможет осуществить весь процесс активации, вызвав образование небольшого количества трипсина, которое затем будет не только активировать оставшийся трипсиноген, но будет также превращать химотрипсиноген в л-химотрипсин и прокарбоксипептидазы в карбоксипептидазы. Если бы, однако, это было так, то система была бы излишне чувствительна к активации и активация могла бы наступать прежде, чем сок попадет в кишечник. Действительно, показано, что добавлением только небольшого количества энтеропептидазы не удается активировать панкреатический сок. Это объясняется тем, что в этом соке присутствует ингибитор трипсина; он представляет собой пептид с молекулярным весом около 10 000 и действует, связывая трипсин в форме неактивного комплекса. Кунитц и Нортроп [1495] выделили ингибитор и комплекс трипсина с ингибитором в кристаллическом виде. Процесс образования комплекса протекает не мгновенно, а требует для своего завершения примерно 30 *мин.* Поэтому активация не наступает, если трипсин добавляется к соку поджелудочной железы постепенно, небольшими порциями, между тем как если то же количество трипсина добавить сразу, то активация произойдет немедленно. Тот же ингибитор в какой-то степени подавляет и химотрипсин. Из плазмы человека [359] и быка [2921] были выделены и очищены другие ингибиторы трипсина, имеющие более высокий молекулярный вес. Имеется ряд работ, посвященных изучению многих других пептидов, которые ведут себя как ингибиторы трипсина (см. [1524]).

ДРУГИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ И ИХ АКТИВАЦИЯ

Выше описаны системы, которые в настоящее время достаточно хорошо охарактеризованы. Можно думать, однако, что в форме неактивных предшественников существуют и некоторые другие ферменты и что эти ферменты тоже активируются путем частичного протеолиза. Имеются данные в пользу существования в поджелудочной железе проэстеразы [844], однако нам пока ничего не известно о процессе ее активации.

Чрезвычайно сложная система, принимающая участие в образовании и последующем растворении сгустка крови, состоит из ряда факторов, которые, по-видимому, обладают протеолитическими свойствами; большая часть этих факторов в физиологических условиях встречается в виде неактивных предшественников. Лишь немногие из них удалось выделить, и в некоторых случаях мы, в сущности, не знаем о них ничего, если не считать самого названия; однако кажется вероятным, что некоторые этапы процесса их активации обусловлены гидролизом пептидных связей (см. [2, 1398, 2801]).

ГЛАВА XII

ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ

Биологическое значение ферментных систем

Ферменты — высокоэффективные катализаторы, однако действие каждого из них ограничено в силу их высокой специфичности. Как правило, один фермент может осуществлять только одну реакцию, катализировать только одну какую-либо стадию в цепи обменных реакций. Поэтому любой обменный процесс требует для своего осуществления наличия координированной системы, состоящей из нескольких ферментов. Число ферментов в такой системе определяется числом последовательных реакций, из которых слагается суммарный процесс.

Так как различные пути обмена взаимосвязаны, то следовало бы, в сущности, считать, что весь обмен в целом осуществляется одной большой полиферментной системой; на практике, однако, удобнее рассматривать различные обменные процессы (скажем, образование мочевины или расщепление жира) и связанные с ними ферментные системы не в их взаимной связи, а порознь.

Для того чтобы функционировать, такая система должна содержать несколько ферментов, специфичность которых обеспечивает непрерывную цепь превращений, так что продукт, образованный под действием одного фермента, оказывается субстратом для другого фермента, присутствующего в системе. Благодаря этому на молекулу субстрата могут в определенном порядке последовательно воздействовать все ферменты, находящиеся в системе; каждый фермент вызовет определенные изменения в ее структуре, прежде чем она подвергнется действию следующего фермента, и так будет продолжаться до тех пор, пока, наконец, не закончится весь процесс. Под обменным процессом и понимают совокупность подобных реакций.

Важно, чтобы цепь реакций была полной и непрерывной. Если один из ферментов отсутствует или если он, например, отравлен, то процесс будет блокирован на данном этапе и вся система выйдет из строя.

Весьма маловероятно, чтобы из группы случайно подобранных ферментов можно было составить такого рода организованную систему, в чем легко убедиться, выбрав наугад дюжину ферментов из Списка. Можно, однако, построить цепи реакций постепенно, звено за звеном. Взяв определенный субстрат, мы отыскиваем в списке фермент, который действует на этот субстрат, и одновременно определяем природу продукта, образующегося при данной реакции. Затем мы ищем в Списке другой фермент, способный действовать уже на полученный продукт, и т. д. На бумаге построение таких цепей представляется достаточно увлекательным занятием, и хотя таким путем не всегда удается составить правильные метаболические последовательности (так как легко упустить из виду более важные альтернативные реакции), эти искусственные построения могут иметь определенные биологические параллели. Все в целом несколько напоминает «серийную индукцию» Станиера [2504], о которой мы упоминали в предыдущей главе. Серийная индукция, однако, возможна лишь в определенных границах, поскольку этот процесс контролируется генетической системой клетки,

которая определяет, какие ферменты могут образовываться в результате адаптации в тех или иных клетках, и какие — нет.

Если такая цепь ферментов сформировалась, то она может функционировать до тех пор, пока будет иметься в наличии первый субстрат; недостаток какого-либо из ферментов будет вызывать накопление субстрата, на который действует данный фермент, а это в свою очередь будет стимулировать дополнительное адаптивное образование этого фермента для восстановления нарушенного равновесия.

Превращение, которое предстоит претерпеть данному органическому веществу, зависит не столько от его химических свойств, сколько от присутствия и соотношения в системе определенных ферментов, и, следовательно, генетическая система через посредство ферментных систем определяет направление, по которому должен протекать обменный процесс. Эта направляющая функция ферментных систем имеет очень важное значение.

Координацию и организацию ферментных систем определяют два главных фактора. В системе растворимых ферментов, где различные ферменты находятся в виде смеси в растворе и где все они вполне доступны, существует то, что принято называть *организацией на основе специфичности* [618, стр. 19]. Ферменты, составляющие такую систему, подобраны по своей специфичности так, что продукт, образованный одним из ферментов, может служить субстратом другого присутствующего в системе фермента, который, следовательно, продолжает процесс, направляя его опять-таки по совершенно определенному пути. Эта организация поддерживается не клеточной структурой, а чисто *химической* специфичностью; одной этой специфичности достаточно, чтобы обеспечить упорядоченную работу системы.

В других системах, однако, и главным образом в митохондриальных системах, многие ферменты не свободны, а присоединены к некой нерастворимой структуре, определенным образом ориентированы по отношению друг к другу и вследствие этого менее доступны. Эта топографическая организация обеспечивает дополнительный контроль над последовательностью реакций (в придачу к тому, который обусловливается специфичностью компонентов). Такую *структурную* организацию мы обсудим позднее.

Взаимосвязь ферментов

Можно считать, что каждый фермент в цепи связан со следующим ферментом данной системы через посредство общего субстрата. Это не кажется очевидным до тех пор, пока мы не вспомним, что ферменты катализируют реакции в двух направлениях, так что продукт прямой реакции служит субстратом обратной реакции, катализируемой тем же ферментом. Таким образом, в серии последовательных реакций

$$A \underset{E_1}{\rightarrow} B \underset{E_2}{\rightarrow} C \underset{E_3}{\rightarrow} D \ldots$$

вещество B, служащее субстратом фермента E_2, может также рассматриваться как субстрат фермента E_1, поскольку оно соответствует его специфичности. Мы вправе поэтому сказать, что два фермента, E_1 и E_2, функционально связаны общим субстратом B. Если два фермента не имеют общего субстрата, то они не связаны таким путем и не могут образовать систему.

Рассмотрим теперь систему, состоящую из двух ферментов, связанных общим субстратом. Отметим прежде всего, что здесь может существовать два диаметрально противоположных случая. Один из них, о котором мы уже говорили,— это тот случай, когда второй фермент превращает вещество B, образованное первым ферментом, в новое вещество C. В этом случае связующее вещество B представляет собой метаболит, претерпевающий

в ходе суммарного процесса ряд последовательных превращений, что может быть проиллюстрировано примерами из табл. 41. Другой случай — это тот, когда второй фермент вызывает обращение реакции, катализируемой первым ферментом. Вместо того чтобы превратить вещество B в вещество C, этот второй фермент превращает его снова в вещество A (естественно, в результате другой, отличной от первой реакции, поскольку эти два фермента не идентичны). Если, например, первый фермент фосфорилирует A с образованием B, то второй фермент дефосфорилирует B, так что вновь образуется A; если первый фермент восстанавливает данное вещество, то второй вновь окисляет его, и т. д. В табл. 46 приведено два подобных примера; здесь первый фермент восстанавливает НАД, тогда как второй фермент вновь окисляет его, и здесь же второй фермент восстанавливает глиоксилат и гликолат, а третий фермент вновь окисляет гликолат до глиоксилата.

Различие между этими двумя типами реакций является весьма существенным. В реакциях первого типа связующее вещество есть часть метаболизируемого материала, и потому оно вовлекается в дальнейшие превращения; в реакциях второго типа связующее вещество есть часть каталитического механизма, т. е., по сути дела, кофермент, и потому оно сохраняется как более или менее постоянный компонент системы.

Реакции второго типа сводятся обычно к присоединению или отщеплению некоторых групп, например фосфатной группы, причем каждая реакция является бимолекулярной и второе вещество действует в ней как донор или акцептор этих групп. Ясно, что такие реакции не могут быть мономолекулярными, ибо в таком случае реакция $B \rightarrow A$ была бы простым обращением реакции $A \rightarrow B$, а, следовательно, оба фермента были бы идентичны.

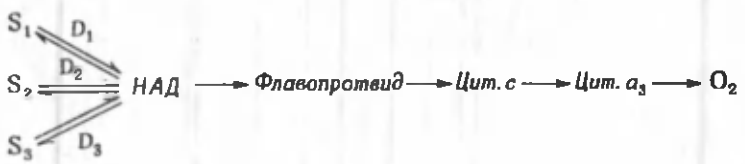
Таким образом, в системе второго типа мы имеем дело с механизмом переноса, в котором некая группа переносится с молекулы на молекулу в результате серии последовательно протекающих реакций, а связующее вещество действует как переносчик этой группы. В табл. 46 приведена система, переносящая водород; два атома водорода переносятся здесь с исходного субстрата на O_2 в результате трех последовательных переносов с участием двух промежуточных переносчиков водорода.

В системах этого типа, так же как и в системах первого типа, встречаются довольно длинные цепи реакций. Особенно длинными они бывают в случае переноса водорода. В некоторых дыхательных системах участвуют, например, четыре или пять последовательно сменяющих друг друга переносчиков, и водород переносится с одного на другой в серии последовательных ферментативных реакций, прежде чем он наконец прореагирует с кислородом. Такие цепи реакций обычно изображают тем же способом, который используют для систем первого типа, а именно

$$A \xrightarrow[E_1]{} B \xrightarrow[E_2]{} C \xrightarrow[E_3]{} D \ldots$$

но только здесь стрелки имеют иное значение. В первом случае символ $A \rightarrow B$ означает, что A превращается в B; во втором случае он означает, что A восстанавливает B (или фосфорилирует, или метилирует — в зависимости от того, о какой реакции идет речь), и стрелка показывает здесь направление переноса водорода (или фосфата, или метильной группы).

Наиболее важный тип системы клеточного дыхания можно, очевидно, изобразить в упрощенном виде при такой форме записи следующим образом:



где S_1, S_2 и S_3 — различные вещества, окисляемые НАД в присутствии соответствующих дегидрогеназ D_1, D_2 и D_3. Так как НАД реагирует с большим числом различных дегидрогеназ (вероятно, с 70 или более), то он собирает водород, образующийся при многих различных процессах биологического окисления, и передает его далее через флавопротеидный фермент (НАД·H_2-цитохром-*c*-редуктаза, 1.6.2.1) на цитохром *c*. Последний в свою очередь восстанавливает цитохром a_3 (цитохромоксидаза, 1.9.3.1), который затем восстанавливает O_2 до воды, заканчивая таким образом цепь реакций. НАДФ действует тем же способом, что и НАД, но в сочетании с другой группой дегидрогеназ и с другой цитохром-*c*-редуктазой (1.6.2.3). Эту цепь реакций мы уже рассматривали, когда обсуждали действие цитохромов в гл. IX.

Системы дегидрогеназ, связанные с коферментом

При отсутствии O_2 восстановленный кофермент не может быть вновь окислен с участием указанной системы переносчиков. В этом случае реакции протекают благодаря взаимодействию кофермента с различными дегидрогеназами; кофермент восстанавливается одной дегидрогеназой, а затем вновь окисляется в обратной реакции другой дегидрогеназы. Именно этим путем катализируются реакции различных типов брожения. Такая система, состоящая из двух дегидрогеназ и кофермента (*дегидрогеназная система, связанная с коферментом*), является, вероятно, наиболее важным типом двуферментной системы. Она может быть схематически изображена следующим образом:

$$S_1^r \xrightarrow[D_1]{} Ко \xrightarrow[D_2]{} S_2^o.$$

Здесь восстановленная форма субстрата первой дегидрогеназы отдает два атома водорода коферменту, а вторая дегидрогеназа переносит два атома водорода с восстановленного кофермента на окисленную форму своего субстрата.

Можно привести множество примеров таких реакций. Два наиболее известных (в обоих случаях участвует глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа) относятся к системе гликолиза (реакции 8, 9 и 14 табл. 41) и спиртового брожения (реакции 8, 9 и 17 табл. 41) соответственно. Схематически их можно изобразить следующим образом:

Глицеральдегидфосфат + Фосфат —(глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12))→ НАД —(лактатдегидрогеназа (1.1.1.27))→ Пируват

и

Глицеральдегидфосфат + Фосфат —(глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12))→ НАД —(алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1))→ Ацетальдегид.

Продуктами этих реакций являются дифосфоглицерат и лактат или соответственно спирт.

Можно упомянуть несколько других, менее известных случаев, для того чтобы продемонстрировать характер действия дегидрогеназных систем, связанных с коферментами. В ряде случаев образование определенного рода молекул при действии первой дегидрогеназы компенсируется потреблением этих же молекул в реакции, катализируемой второй дегидрогеназой. Например, в системе

Изоцитрат —(изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42))→ НАДФ —(малатдегидрогеназа (1.1.1.40))→ Пируват + CO_2

изоцитрат окисляется в 2-оксоглутарат + CO_2 и образующаяся CO_2 потребляется в реакции, катализируемой малатдегидрогеназой; поэтому CO_2 не фигурирует в суммарной реакции, которую можно написать в следующем виде:

$$\text{Изоцитрат} + \text{Пируват} = \text{2-Оксоглутарат} + \text{Малат}.$$

В системе

$$\text{Изоцитрат} \xrightarrow[\text{изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42)}]{} \text{НАДФ} \xrightarrow[\text{глутаматдегидрогеназа (1.4.1.3)}]{} \text{2-Оксоглутарат} + NH_3$$

изоцитрат окисляется в 2-оксоглутарат + CO_2, и 2-оксоглутарат, образованный первым ферментом, потребляется в реакции, катализируемой вторым ферментом, так что реакцию в целом можно написать так:

$$\text{Изоцитрат} + NH_3 = \text{Глутамат} + CO_2.$$

В подобных случаях вещество, которое не фигурирует в суммарном уравнении, должно добавляться в реакционную смесь до начала реакции; количество его остается постоянным в течение всего процесса, и потому его следует рассматривать как часть каталитического механизма. 2-оксоглутарат и CO_2 в только что рассмотренных системах служат такими же коферментами для этих систем, как, например, глюкозодифосфат для фосфоглюкомутазы (2.7.5.1).

Известно несколько случаев, когда две дегидрогеназы катализируют последовательные ступени окисления одного и того же вещества; например, алкогольдегидрогеназа окисляет спирты до альдегидов, а альдегиддегидрогеназа окисляет альдегиды до кислот. Таким образом, промежуточная форма (альдегид) представляет собой окисленную форму субстрата одного фермента и восстановленную форму субстрата другого фермента. Если эти два фермента связаны друг с другом переносчиком водорода, то подобная система катализирует реакцию дисмутации

$$\text{Альдегид} + H_2O \xrightarrow[\text{альдегиддегидрогеназа (1.2.1.3)}]{} \text{НАД} \xrightarrow[\text{алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1)}]{} \text{Альдегид},$$

и суммарная реакция будет иметь следующий вид:

$$2\ \text{Альдегид} = \text{Кислота} + \text{Спирт}$$

(см. [2147]). Раньше считали, что превращения в этой системе катализируются одним ферментом —«альдегидмутазой» [616, 628].

Иногда в одной или обеих частях реакции участвует еще дополнительный компонент, так что реакция, строго говоря, не может считаться дисмутацией; в сущности, даже при дисмутации альдегидов в одной части реакции участвует молекула воды. В дисмутации триозофосфата (реакции, очень важной в процессе глицеринового брожения) принимает участие фосфат:

$$\begin{matrix}\text{Глицеральдегидфосфат} \\ + \text{Фосфат}\end{matrix} \xrightarrow[\text{глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12)}]{} \text{НАД} \xrightarrow[\text{глицерофосфатдегидрогеназа (1.1.1.8)}]{} \text{Диоксиацетонфосфат}.$$

Эта реакция не воспринимается как дисмутация, пока мы не вспомним, что глицеральдегидфосфат и диоксиацетонфосфат представляют собой две формы триозофосфата, легко переходящие друг в друга под действием фермента триозофосфатизомеразы (5.3.1.1). Суммарная реакция может быть написана в следующем виде:

$$2\ \text{Триозофосфат} + \text{Фосфат} = \text{Дифосфоглицерат} + \text{Глицерофосфат}.$$

Кофермент А участвует в реакциях дисмутации пирувата (реакции 18—21 и 14 табл. 41) и 2-оксоглутарата (реакции 7 и 8 табл. 42; реак-

ция 21 табл. 41; реакция 1 табл. 54); в последней из перечисленных реакций должен участвовать также аммиак. Обе системы включают, однако, как дополнительный переносчик водорода (липоат), так и дополнительные ферменты:

$$\text{Пируват} + \text{КоА} \xrightarrow[\text{и липоат-ацетилтрансфераза (2.3.1.12)}]{\text{пируватдегидрогеназа (1.2.4.1.)}} \text{Липоат} \xrightarrow[\text{(1.6.4.3)}]{\text{липоамиддегидрогеназа}} \text{НАД} \xrightarrow[\text{(1.1.1.27)}]{\text{лактатдегидрогеназа}} \text{Пируват}.$$

Суммарная реакция может быть написана в следующем виде:

$$2\ \text{Пируват} + \text{КоА} = \text{Ацетил-КоА} + \text{Лактат} + CO_2.$$

Для системы с участием 2-оксоглутарата реакция будет выглядеть следующим образом:

$$\text{2-Оксоглутарат} + \text{КоА} \xrightarrow[\text{(1.2.4.2) и липоат-ацетилтрансфераза (2.3.1.12)?}]{\text{оксоглутаратдегидрогеназа}} \text{Липоат} \xrightarrow[\text{(1.6.4.3)}]{\text{липоамиддегидрогеназа}} \text{НАД} \xrightarrow[\text{(1.4.1.2)}]{\text{глутаматдегидрогеназа}} \text{2-Оксоглутарат} + NH_3$$

Суммарная реакция будет при этом выражаться уравнением

$$2\ \text{2-Оксоглутарат} + \text{КоА} + NH_3 = \text{Сукцинил-КоА} + \text{Глутамат} + CO_2.$$

Существует и другая возможность, когда две дегидрогеназы окисляют различные оптические изомеры одного и того же вещества, образуя один и тот же продукт окисления. Например, система

$$\text{L-Лактат} \xrightarrow[(1.1.1.27)]{\text{лактатдегидрогеназа}} \text{НАД} \xrightarrow[\text{(1.1.1.28)}]{\text{D-лактатдегидрогеназа}} \text{Пируват}$$

действует как рацемаза [593], катализируя общую реакцию

$$\text{L-Лактат} = \text{D-Лактат}.$$

Здесь L-лактат окисляется до пирувата, а пируват восстанавливается до D-лактата; поэтому пируват не фигурирует в итоговом уравнении и действует как кофермент указанным выше способом.

Число связанных с коферментом дегидрогеназных систем, которые могут быть образованы из известных дегидрогеназ, очень велико. Из n различных дегидрогеназ может быть образовано $^1/_2 n\ (n-1)$ различных систем. В Списке ферментов представлено более 70 различных дегидрогеназ, реагирующих с НАД; они могли бы образовать свыше 2400 таких связанных с коферментом систем. Имеется также более 40 дегидрогеназ, реагирующих с НАДФ, и эти также в свою очередь могли бы образовать более 700 систем. Если же при этом учесть, что дегидрогеназы, специфичные в отношении НАД, могут действовать совместно с дегидрогеназами, специфичными в отношении НАДФ, то число возможных систем еще более возрастет и, очевидно, превысит 5000. Однако число встречающихся в природе систем значительно меньше указанного выше, так как никогда все дегидрогеназы не встречаются вместе в одной и той же живой клетке.

Если НАД-специфичная дегидрогеназа связывается с НАДФ-специфичной, то образуется система, в которой эти два кофермента действуют как два последовательных переносчика водорода в цепи. Такая система могла бы быть образована ферментом, способным связать два кофермента в общей

последовательности реакций. В качестве кандидата на эту роль может быть названа НАД(Ф)-трансгидрогеназа (1.6.1.1), которая должна быть в состоянии осуществить процесс следующего типа:

$$S_1^r \xrightarrow[D_1]{} \text{НАДФ} \xrightarrow[\text{НАД(Ф)-трансгидрогеназа (1.6.1.1)}]{} \text{НАД} \xrightarrow[D_2]{} S_2^o.$$

Имеются данные, свидетельствующие о том, что окисление изоцитрата в митохондриях протекает таким путем [2127]:

$$\text{Изоцитрат} \xrightarrow[\text{изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42)}]{} \text{НАДФ} \xrightarrow[\text{НАД(Ф)-трансгидрогеназа (1.6.1.1)}]{} \text{НАД} \xrightarrow[\text{система окисления НАД}\cdot H_2]{} O_2.$$

Для осуществления реакции требуются оба кофермента, и скорости отдельных реакций адекватны, тогда как окисление изоцитрата за счет НАД и окисление $НАДФ \cdot H_2$ за счет кислорода протекают с очень незначительной скоростью. Имеется и другая возможность — связь через дегидрогеназу, способную реагировать с обоими коферментами, например через глутаматдегидрогеназу:

$$S_1^r \xrightarrow[D_1]{} \text{НАДФ} \xrightarrow[\text{глутаматдегидрогеназа (1.4.1.3)}]{} \text{2-Оксоглутарат} \xrightarrow[+\,NH_3]{} \xrightarrow[\text{глутаматдегидрогеназа (1.4.1.3)}]{} \text{НАД} \xrightarrow[D_2]{} S_2^o.$$

В этой гипотетической системе глутамат служит переносчиком водорода, претерпевая попеременное окисление и восстановление, т. е. он действует в значительной мере как кофермент.

Иные возможности для связи существуют между теми дегидрогеназами, которые не реагируют с коферментами. Несколько соответствующих реакций было обнаружено в препаратах тканей, однако механизм их пока точно не выяснен. В этих случаях вместо коферментов действуют, вероятно, другие вещества. Любая обратимо восстанавливающаяся молекула, обладающая способностью реагировать с двумя различными дегидрогеназами, теоретически должна быть способна действовать в качестве посредника при условии, что ее окислительно-восстановительный потенциал лежит в соответствующей области.

Распределительная функция ферментов переноса

Мы рассматривали те превращения субстрата, которые протекают с участием только двух дегидрогеназ. Если же в системе присутствует много дегидрогеназ, причем все они способны реагировать с одним и тем же коферментом, то последний будет играть роль «депо», в которое поступает имеющийся водород, с тем чтобы потом распределиться между различными субстратами в соответствии с константами равновесия отдельных реакций. Эта распределительная функция свойственна не только ферментным системам, переносящим водород. То же явление наблюдается при переносе фосфатных, аминных, метильных и ацильных групп, а также, вероятно, и при переносах другого типа. Для каждого типа реакций имеется одно вещество, которое действует в качестве главного депо определенных активных групп и таким путем связывает все ферменты данного класса, но не последовательно, а параллельно. В переносе водорода участвуют дегидрогеназы, а $НАД \cdot H_2$ (или, во второй группе ферментов, $НАДФ \cdot H_2$) служит главным депо активного водорода. Киназы участвуют в переносе фосфата, а АТФ является главным депо активных фосфатных групп. С переносом аммиака

(аминогрупп) связаны аминотрансферазы, и L-глутамат играет роль переносчика аминогрупп. Ацильные группы переносятся ацилтрансферазами, и в этом процессе участвует ацил-КоА. Перенос метильных групп катализируется метилтрансферазами, и аденозилметионин служит общим переносчиком метильных групп. Тетрагидрофолат функционирует как переносчик формальдегидных (оксиметильных) или формильных групп.

Таким образом, связанные с коферментами дегидрогеназные системы при всем их большом самостоятельном значении следует рассматривать лишь как частный случай гораздо более общего явления, крайне важного для биохимии. Можно говорить о системах киназ, связанных с АТФ, системах ацилтрансфераз, связанных с КоА, и т. д. Отметим, что в каждом случае вещество, играющее роль депо, по своей функции близко к коферменту и составляет неотъемлемую часть каталитической системы. Быть может, следует также указать, что лишь после того, как были открыты эти вещества, стало возможным выделение и изучение связанных с ними ферментов. Вполне возможно, что со временем будут открыты новые вещества, принадлежащие к той же категории.

Время переноса

В системе, состоящей из двух ферментов, например в связанной с коферментом дегидрогеназной системе, кофермент-переносчик переходит от одного фермента к другому, а затем обратно, и только после этого завершается каталитический цикл. Очевидно, что скорость суммарной реакции является при этом не только функцией скоростей двух отдельных ферментативных реакций, но также и функцией *времени переноса*, т. е. времени, которое требуется коферменту для указанного перехода. Даже в том случае, если бы эти две ферментативные реакции протекали с бесконечно большой скоростью, скорость суммарной реакции процесса не была бы бесконечно большой; в этом случае она определялась бы исключительно величиной, обратной времени переноса.

Указанное обстоятельство требует введения в кинетику системы нового фактора. Влияние этого фактора будет в заметной степени зависеть от того, с какой системой мы имеем дело — с «растворимой», у которой отдельные компоненты находятся в свободном растворе, или с «нерастворимой», у которой отдельные компоненты связаны вместе в результате присоединения к *какой-либо нерастворимой структуре* (или как-нибудь иначе).

В первом случае по мере разбавления раствора расстояние между двумя молекулами фермента возрастает и время переноса приобретает все большее значение. Эффективность переноса увеличивается с увеличением общей концентрации системы *до некоего максимального значения, которое достигается* тогда, когда временем переноса можно пренебречь. Во втором случае расстояние между молекулами двух ферментов при разбавлении не меняется и эффективность переноса остается постоянной.

Структурная организация ферментных систем

Лимитирующее влияние времени переноса в растворимой системе сказывается тем сильнее, чем выше молекулярный вес переносчика, так как скорость диффузии изменяется в обратной зависимости от молекулярного веса. Поэтому в системах, где участвуют такие высокомолекулярные переносчики, как цитохром *c*, это лимитирующее влияние должно быть особенно резко выражено. Видимо, в этом кроется одна из главных причин того, что

цитохромная система не распределена в цитоплазме, а сконцентрирована во внутриклеточных частицах — в митохондриях животных и растительных тканей и в аналогичных частицах других клеток. Ферменты этой системы удерживаются таким образом в достаточной близости друг от друга и это уменьшает время переноса до минимума. В этом случае даже цитохром *c*, выполняющий функции переносчика, локализуется в определенных участках системы. При достаточно осторожной экстракции митохондрий разбавленными растворами KCl практически весь цитохром *c* можно извлечь без большого повреждения окислительных и фосфорилирующих ферментов. После удаления цитохрома *c* система уже больше не поглощает O_2 в присутствии сукцината или родственных субстратов, но если вновь добавить цитохром *c*, то утраченная активность восстанавливается. Скорость поглощения O_2 оказывается при этом пропорциональной количеству добавленного цитохрома *c*, и эта пропорциональность сохраняется до тех пор, пока не будет добавлено количество, равное экстрагированному; в этот момент на кривой появится резкий перегиб, и в дальнейшем добавление цитохрома *c* уже не будет оказывать влияния. Весь цитохром *c*, добавленный до этого момента, прочно связывается и не может быть вымыт растворами сахарозы. Это дает возможность титровать участки, связывающие цитохром *c*, самим цитохромом [1226].

В целом ряде работ было показано, что многие сложные ферментные системы, принимающие участие в окислительных процессах, локализованы в митохондриях. Помимо системы цитохромов и других переносчиков водорода митохондрии содержат многие из ферментов цикла лимонной кислоты (табл. 42), жирового обмена (табл. 44) и окислительного фосфорилирования. Кроме того, митохондрии (если только их препараты приготовлены достаточно тщательно) содержат также большое число веществ с низким молекулярным весом, обычно считающихся растворимыми, например коферментов, участвующих в реакциях, которые катализируются данными ферментными системами. Это можно объяснить либо тем, что митохондрии окружены мембраной, либо тем, что они содержат высокий процент липидов (благодаря чему они напоминают по структуре эмульсию с диспергированной водной фазой), либо, наконец, каким-то химическим взаимодействием. Низкомолекулярные вещества почти не диффундируют из митохондрий до тех пор, пока структура митохондрий не нарушена. Таким образом, ферментные системы митохондрий остаются активными даже в тех случаях, когда эти частицы суспендированы в большом объеме соответствующей среды; частицы могут быть промыты на центрифуге этой средой без какой-либо утраты активности. Однако митохондрии чувствительны к изменениям среды, и при непормальных условиях, например при промывании чистой водой, некоторые компоненты, например цитохром *c* и коферменты, могут из них вымываться [2337]. Распределение ферментов между внутриклеточными частицами обсуждается в гл. XIII.

Для того чтобы выявить, какая среда наиболее благоприятна для выделения митохондрий, было проведено большое число исследований. Наибольшая ферментативная активность сохраняется у митохондрий в том случае, когда средой служит 0,25 *M* раствор сахарозы, хотя микроскопическая картина оказывается ближе к норме в 0,88 *M* растворе. Подробное описание методики получения активных митохондрий можно найти в ряде работ [52, 1126, 2112].

Полного разрушения структуры митохондрий можно добиться постепенно, в несколько этапов. Митохондрии могут быть разрушены в результате обработки в гомогенизаторе Уоринга, путем растирания с песком, под действием ультразвука или каким-либо иным способом; при этом освобождаются многие растворимые вещества, но в более мелких нерастворимых частицах сохраняется еще много ферментов [813]. С помощью центрифу-

тирования эти частицы можно получить в чистом виде [1]. Классическим примером такого рода препарата может служить препарат цитохромоксидазы Кейлина и Хартри [1340, 2985]; позднее Грин назвал полученные ими частицы *электронпереносящими частицами* (ЭПЧ).

Эти частицы были использованы в качестве исходного материала для очень большого числа работ на системе дыхательных ферментов. Предполагают, что они образуются из мембран или крист митохондрий при их разрушении. Было показано [813], что при механическом разрушении митохондрий печени образуются фрагменты, сильно отличающиеся по размеру, но с одинаковыми значениями удельной ферментативной активности, что говорит в пользу относительно равномерного распределения компонентов в мембранах. Частицы, полученные при механическом разрушении митохондрий, сохраняют вполне активную систему цитохромов, но утрачивают способность к окислительному фосфорилированию; если, однако, разрушение митохондрий проводить с помощью дигитонина, то в полученных таким путем частицах способность к окислительному фосфорилированию сохраняется. Каталитические механизмы окислительного фосфорилирования более подробно обсуждаются в главе XIII.

Можно разрушить частицы, выделенные по методу Кейлина — Хартри, а затем разделить этот материал на фракции и таким способом получить отдельные сегменты каталитической дыхательной цепи. Ваинио, использовав обработку холатом, выделил две основные фракции: одна из них содержала сукцинатдегидрогеназу и цитохром *b*, а другая — цитохромы *a*, цитохромоксидазу и медь. Другим исследователям удалось подтвердить результаты Ваинио и добиться дальнейшего разделения этих фракций (см. [1252]). Хэтэфи и др. [1026] разделили данную систему на четыре фракции, катализирующие соответственно реакции между сукцинатом и убихиноном, НАД·H_2 и убихиноном, убихиноном и цитохромом *c* и цитохромом *c* и O_2 (о чем уже упоминалось в гл. IX). Можно осуществить рекомбинацию этих фрагментов; при этом убихинон и цитохром *c* выступают в качестве связующих агентов.

В последние годы эти работы получили дальнейшее развитие в связи с разработкой методов разрушения липопротеидных комплексов и более широким использованием поверхностноактивных веществ, в частности дезоксихолата и т. п. Как уже упоминалось выше, в настоящее время разделены и очищены все компоненты системы цитохромов, а также ряд ферментов, имеющих отношение к рассматриваемой системе. Кроме того, Грин и др. [906] выделили *структурный белок* митохондрий, служащий, очевидно, той нерастворимой основой, на которой удерживаются цитохромы. Это — бесцветный белок, нерастворимый в воде, но растворимый при pH 10,5 и в этих условиях имеющий молекулярный вес ~25000. Он отличается необычно высоким содержанием неполярных боковых цепей и обладает способностью специфически связывать цитохромы *a*, *b* и c_1 (но не цитохром *c*), а также липиды. Цитохромы связаны с ним в виде мономеров; сле-

[1] Некоторые исследователи пользуются при рассмотрении таких корпускулярных систем терминологией, которую обычно применяют только к индивидуальным ферментам. Они дают им названия с окончанием «аза» и именуют их «высокоочищенными». «Сукцинатоксидаза» содержит, например, сукцинатдегидрогеназу и цитохромооксидазу, а также убихинон и ряд других цитохромов. «ДПН-Н-цитохром-*c*-редуктазу» называют ферментом, хотя эта система включает флавопротеид, цитохромы *b* и c_1, убихинон и другие компоненты. Такая практика привела к ряду недоразумений, и Комиссия по ферментам рекомендует, чтобы «названия, предназначенные для обозначения ферментов, особенно те, которые оканчиваются на «аза», употреблялись только для индивидуальных ферментов; их не следует применять для обозначения систем, содержащих более одного фермента. Если желательно обозначить такую систему термином, основанным на катализируемой ею суммарной реакции, то в такое наименование должно быть включено слово «система...», например «сукцинатоксидазная система».

довательно, этот белок вызывает их деполимеризацию. Структурный белок составляет около $^1/_3$ всего белка митохондрий. Если цитохромы действительно расположены в пространстве в том же порядке, в каком они функционируют в дыхательной цепи, то это расположение, по всей вероятности, определяется последовательностью аминокислот в структурном белке.

Вопрос об организации ферментов во внутриклеточных частицах многократно обсуждался с тех пор, как Кейлин и Хартри [1342] в 1940 г. высказали на этот счет предположения. Касаясь сукцинатдегидрогеназо-цитохромной системы, они писали: «Активность этой системы зависит не только от свойств отдельных ее компонентов, но и от свойств тех коллоидных белковых частиц, с которыми данные ферменты более или менее тесно связаны. Возможно, что каждая коллоидная частица служит опорой для полной системы и, таким образом, гарантирует взаимную связь ее компонентов».

Значительно позже это предположение, сводящееся, в сущности, к тому, что между отдельными компонентами системы существует тесная связь, было расширено, в основном Грином. Так возникла концепция о топографии ферментов, согласно которой ферменты располагаются в пространстве в соответствии с последовательностью тех реакций, которые они катализируют. По поводу системы митохондрий Грин писал: «Мы были убеждены в том, что имеем дело с организованной мозаикой ферментов, в которой каждый фермент особым образом локализован для того, чтобы эффективно обеспечить определенную последовательность реакций».

Авторы, однако, не считают, что имеющиеся данные говорят о столь строгой организации ферментов во внутриклеточных частицах. Для эффективной работы ферментной системы было бы, по всей вероятности, достаточно, чтобы ее компоненты просто удерживались на близком расстоянии друг от друга, за счет чего должно было бы сократиться время переноса. Точную степень структурной организации ферментов в клетках можно будет, очевидно, установить только на основе дальнейших исследований. Сама мысль об упорядоченном расположении отдельных единиц, конечно, отнюдь не представляет собой чего-либо нового в биологии. Для примера сошлемся на фиксированное положение генов в хромосомах, которое давно хорошо установлено.

Прикрепление ферментных систем к внутриклеточным частицам благоприятствует реакциям между отдельными компонентами таких систем; однако это же обстоятельство может оказаться препятствием для реакций между ферментами, локализующимися в частицах, и ферментами, находящимися в цитоплазме, так как мембраны, окружающие частицы, могут быть и относительно слабо проницаемыми. Особенно важно это для митохондрий, поскольку их мембраны, достаточно проницаемые для ряда субстратов, непроницаемы для НАД·H_2 (если они не повреждены). Ферменты, восстанавливающие НАД, размещаются как внутри, так и вне митохондрий, но цитохромоксидазная система имеется только в митохондриях. Поэтому окисление НАД·H_2 (с помощью цитохрома) внутри митохондрий не составляет проблемы, но трудно понять, каким путем может происходить окисление НАД·H_2, образуемого ферментами цитоплазмы. Недавно Боксер и Девлин [304] очень подробно проанализировали этот вопрос. Интактные митохондрии печени не способны окислять добавленный НАД·H_2, а митохондрии сердца, напротив, окисляют его легко; способность к окислению приобретают и митохондрии печени, если изменить проницаемость их мембран (для чего их промывают чистой водой). Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что окисление НАД·H_2 внутри и вне митохондрий печени идет разными путями: окисление НАД·H_2, находящегося внутри митохондрий, сопряжено с фосфорилированием и тормозится антимицином А и амиталом, тогда как окисление НАД·H_2, находящегося вне митохондрий, не связано с фосфорилированием и нечувствительно к вышеупомянутым

веществам. Имеются также доводы в пользу того, что обмен НАД·H_2, находящегося вне митохондрий, может быть связан с обменом внутримитохондриального НАД·H_2 при посредстве различных «челночных» механизмов. Высказывались предположения, что веществом, играющим роль «челнока», может быть митохондриальный цитохром b_5 [2186, 2187], система ацетоацетат — D-3-оксибутират [1536] или глицерофосфат [304]. Каждое из этих веществ восстанавливается с внешней стороны митохондриальной мембраны и окисляется с внутренней ее стороны. Возможно также, что механизмом, контролирующим биологическое окисление, служат изменения проницаемости митохондрий, происходящие с достаточной быстротой.

Некоторые свойства полиферментных систем

В метаболической системе, которая состоит из ряда ферментов, катализирующих ряд последовательных реакций, все реакции после установления стационарного состояния должны протекать с одинаковой скоростью. Когда реакции протекают с разной скоростью, концентрации промежуточных веществ меняются в таком направлении, что система стремится достигнуть стационарного состояния. Если, например, в системе

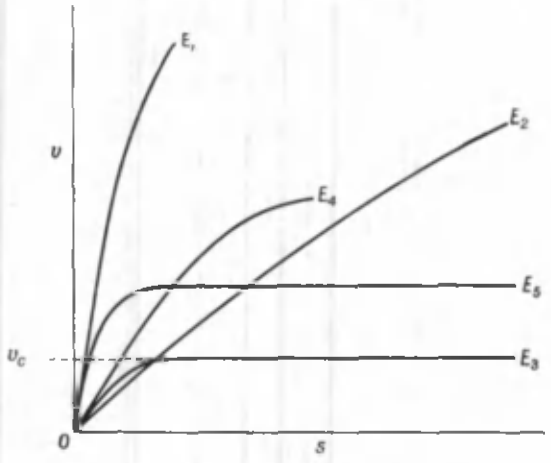
$$A \xrightarrow[E_1]{} B \xrightarrow[E_2]{} C \xrightarrow[E_3]{} D \xrightarrow[E_4]{}$$

в определенный момент времени реакция, катализируемая ферментом E_3, начнет протекать медленнее, чем реакции, катализируемые ферментами E_1 и E_2, то вещество C, очевидно, будет накапливаться. Увеличение концентрации вещества C будет способствовать увеличению скорости реакции, катализируемой ферментом E_3, как это следует из уравнения Михаэлиса. Оно будет также создавать видимость уменьшения скорости реакции, катализируемой ферментом E_2, в результате увеличения скорости обратной реакции. Этот процесс выравнивания (который не зависит от изменения количества фермента в результате адаптации) будет продолжаться до тех пор, пока скорости всех реакций в данной цепи не станут одинаковыми; после этого концентрация вещества C установится на каком-то постоянном уровне.

Для каждого фермента полиферментной системы зависимость скорости реакции от концентрации субстрата характеризуется своей особой кривой, форма которой определяется константой Михаэлиса, и каждая ферментативная реакция имеет свою предельную скорость при данном количестве фермента, как это показано на фиг. 142. Приведенные на этой фигуре кривые характеризуют скорости соответствующих ферментативных реакций при данной концентрации ферментов в системе. Шкала скоростей одна и та же для всех кривых; s — в каждом случае концентрации соответствующего субстрата. Высота плато на каждой рассматриваемой кривой зависит от количества данного фермента, присутствующего в системе. Если один из ферментов, например E_3, присутствует в небольшом количестве (или если соответствующая ферментативная реакция характеризуется низкой максимальной скоростью), то как бы мы ни увеличивали концентрацию субстрата, скорость реакции, катализируемой данным ферментом, все равно не сможет превысить некий постоянный предел (v_c). Скорость реакции, катализируемой этим ферментом, оказывается лимитирующим фактором в системе и в конечном счете определяет скорость всей цепи реакций. В любой системе последовательных ферментативных реакций скорость суммарной реакции всегда будет определять фермент, у которого кривая всего раньше образует плато. Скорости всех других ферментативных реакций этой цепи

не смогут превысить v_c, и концентрация субстрата каждого фермента в конце концов достигнет такого значения, которое соответствует этой предельной скорости. Другими словами, абсцисса точки, в которой кривая каждого из ферментов пересекает линию v_c, дает концентрацию субстрата для соответствующего фермента в период, когда вся система находится в стационарном состоянии.

Некоторые соотношения, наблюдаемые in vivo, объясняются, вероятно, этой зависимостью. Между количеством данного фермента и количеством его субстрата в определенной системе должна существовать обратная зависимость; если какой-нибудь фермент присутствует в очень большом количестве, то концентрация его субстрата будет крайне мала, и наоборот. Можно ожидать, что это должно оказывать выравнивающее влияние, ибо если в системе возникнет дефицит какого-либо определенного фермента, то концентрация его субстрата начнет возрастать и в результате индуцированного



Фиг. 142. Кривые Михаэлиса для отдельных ферментов сложной системы, показывающие условия конечного стационарного состояния.

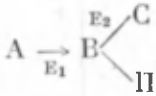
синтеза запас этого фермента пополнится; концентрация субстрата наиболее активных ферментов будет, наоборот, очень низкой, и поэтому будет меньше стимула для их образования. Таким образом, индукция должна вести к ликвидации «узких мест» и к такому изменению количеств отдельных ферментов, которое обеспечивало бы выравнивание максимальных скоростей соответствующих ферментативных реакций.

Этот эффект может быть усилен репрессией фермента — процессом, который приводит к уменьшению количества ферментов, присутствующих в избытке.

Если один из ферментов в цепи отравлен специфическим ядом, то его субстрат будет накапливаться; в конце концов его, вероятно, можно будет обнаружить химическим путем и даже выделить, хотя бы в норме он и присутствовал в количествах, не поддающихся обнаружению. Это явление оказалось очень ценным, так как на нем основывается методика, с помощью которой можно изучать отдельные промежуточные этапы метаболических процессов. Ценные результаты дает также исследование ферментативных реакций у мутантов, у которых недостает того или другого фермента.

На основании сказанного можно ожидать, что отравление какого-либо из ферментов должно (в силу увеличения количества его субстрата, т. е. благодаря индукции) стимулировать образование данного фермента. Это явление, по-видимому, имеет важное значение в развитии устойчивости к лекарственным веществам.

Важное биологическое значение имеет следующий факт. Если после малоактивного фермента действует очень активный фермент, то время жизни молекул промежуточного субстрата будет очень коротким, так как второй фермент будет атаковать их сразу же после того, как они образуются. Это обеспечивает возможность эффективного использования очень неустойчивых промежуточных продуктов, которые в противном случае подвергались бы спонтанному распаду. Если, например, вещество B в системе



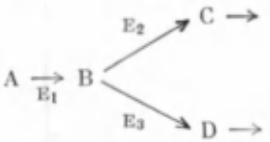
нестабильно, то два процесса — спонтанный распад этого вещества и превращение его в вещество C под влиянием фермента E_2 — будут конкурировать *между собой. Чем больше количество присутствующего в системе* фермента E_2, тем меньшая доля B будет исчезать в результате распада, и при достаточном увеличении количества E_2 распад может практически свестись к нулю. Этот эффект особенно важен в связи с биологическим использованием энергии, освобождающейся в результате определенных обменных реакций, так как благодаря ему обеспечивается утилизация «богатых энергией» промежуточных продуктов, нестабильных по своей природе.

До некоторой степени сходная ситуация встречается и в том случае, когда достаточное увеличение количества соответствующего фермента дает возможность эффективно использовать те из промежуточных продуктов реакции, которые по условиям равновесия могут присутствовать лишь в исчезающе малых количествах. Так, например, в системе

$$A \underset{E_1}{\rightleftharpoons} B \xrightarrow[E_2]{} C$$

равновесие первой реакции может быть столь сильно сдвинуто влево, что в любой данный момент в этой системе будет присутствовать только очень небольшое количество вещества B. Тем не менее если количество E_2 в достаточной мере возрастет, то превращение даже этого малого количества вещества B в вещество C будет происходить с достаточной скоростью; расход вещества B будет сразу же пополняться за счет действия фермента E_1, так что превращение A в C в конечном счете будет идти быстро. Это явление должно иметь очень большое значение в обменных процессах.

В тех случаях, когда цепи метаболических реакций в каких-то точках разветвляются, важное значение приобретает конкуренция между ферментативными реакциями (в связи с направляющей функцией ферментов, о которой мы говорили выше). Если, например, на вещество B действуют два различных фермента, E_2 и E_3, образующих соответственно вещества C и D, каждое из которых вступает затем на свой особый путь превращений,



то ясно, что распределение веществ между этими двумя путями, а следовательно, и весь путь обмена вещества A будет зависеть от относительных *количеств и активностей* E_2 *и* E_3.

Однако относительные количества ферментов не являются единственным фактором, обусловливающим это распределение. В конкурирующих реакциях могут принимать участие какие-нибудь другие реагенты. Превращение вещества B в вещество C может, например, происходить в результате дегидрогенирования, для которого необходим акцептор водорода,

и тогда наличие или отсутствие этого акцептора будет определять направление метаболизма.

Хороший пример, иллюстрирующий сказанное, приведен в табл. 41. В этом случае за пируват, образующийся в реакции 13, конкурирует не менее трех ферментативных реакций, и дальнейший путь обмена пирувата определяется как количеством трех участвующих в этих реакциях ферментов, так и условиями, в которых протекает метаболизм. В анаэробных условиях НАД·H_2 будет играть роль донора водорода для реакции превращения пирувата в лактат с участием лактатдегидрогеназы мышц (реакция 14 табл. 41). В аэробных условиях эта реакция не будет идти, и пируватдегидрогеназа будет катализировать реакцию между пируватом и липоатом (реакции 18—20 табл. 41), направляя таким образом пируват в цикл лимонной кислоты (табл. 42). В мышцах недостает пируватдекарбоксилазы, но дрожжи содержат ее в достаточно большом количестве, и, следовательно, в дрожжевых клетках может с успехом протекать конкурентная реакция, так что здесь в анаэробных условиях пируват подвергается декарбоксилированию (реакции 15—16 табл. 41) и в конце концов превращается в спирт.

Пояснения к таблицам

Теперь мы можем подробнее рассмотреть наиболее важные полиферментные системы.

В табл. 41 представлены отдельные реакции гликолиза и указаны ферменты, катализирующие эти реакции; кроме того, указаны номера, по которым эти ферменты можно отыскать в Списке ферментов. Если процесс начинается с гликогена, то на первом этапе процесса концевой остаток глюкозы переносится с полисахаридной цепи на фосфат. Вторая ступень состоит в переносе фосфатной группы из положения 1 дифосфата в положение 6 глюкозо-1-фосфата. При этой интересной реакции одна молекула дифосфата образуется и одновременно одна исчезает, так что суммарная реакция не отражает участия дифосфата и выглядит как превращение одной молекулы гликозо-1-фосфата в одну молекулу гликозо-6-фосфата.

Если же процесс начинается с глюкозы, то глюкозо-6-фосфат образуется непосредственно в результате переноса фосфатной группы от АТФ. Таким образом, в обоих случаях образуется глюкозо-6-фосфат. Этот последний (в результате внутримолекулярного переноса двух атомов водорода от С-2 к С-1) превращается во фруктозофосфат. За этой реакцией следует перенос другой фосфатной группы с АТФ в положение 1 фруктозо-6-фосфата. Затем молекула фруктозодифосфата расщепляется альдолазой на две половины; при этом образуются две молекулы триозофосфата,—одна альдоза и одна кетоза. Кетоза под действием фермента изомеразы превращается в альдозу в результате еще одного внутримолекулярного переноса двух атомов водорода, на этот раз от С-1 к С-2, так что в конечном итоге образуются две молекулы глицеральдегидфосфата. Альдегидная группа последнего соединяется затем с SH-группой дегидрогеназы; при этом два атома водорода переносятся с образующегося комплекса на НАД. В результате этой реакции образуется соединение, имеющее в своем составе богатую энергией тиоэфирную связь. Затем фосфоглицерильная группа переносится с фермента на фосфат, что приводит к образованию дифосфоглицериновой кислоты — соединения, имеющего смешанную ангидридную, богатую энергией связь. Киназа, вступающая в действие на этом этапе, переносит фосфат с дифосфоглицерата на АДФ, образуя АТФ и 3-фосфоглицерат. Таким образом, в приведенных реакциях окисление сопряжено с синтезом АТФ.

На следующем этапе фосфоглицерат вступает в реакцию, напоминающую реакцию, катализируемую фосфоглюкомутазой (реакция 2 табл. 41): фос-

фатная группа переносится из положения 3 дифосфата в положение 2 монофосфата. В результате молекула 3-фосфоглицерата исчезает и появляется одна молекула 2-фосфоглицерата, количество же дифосфата остается без изменений. Затем от 2-фосфоглицерата отщепляется молекула воды и образуется фосфоенолпируват. В результате этой необычной реакции образуется богатая энергией фосфатная связь, так что фосфат при участии пируваткиназы может быть теперь перенесен на АДФ с образованием АТФ.

Образующийся пируват в зависимости от обстоятельств может далее следовать по одному из трех возможных путей. В мышцах в отсутствие кислорода восстановленный кофермент, образующийся в реакции 8 табл. 41, восстанавливает его до лактата с помощью лактатдегидрогеназы. В дрожжевых клетках, где присутствует лактатдегидрогеназа другого типа, не реагирующая с этим коферментом, пируват в присутствии пируватдекарбоксилазы присоединяется к тиаминпирофосфату с освобождением CO_2 (как описано на стр. 364). Образовавшееся соединение расщепляется до свободного ацетальдегида, который затем восстанавливается до спирта за счет НАД·H_2 в присутствии алкогольдегидрогеназы.

В присутствии кислорода пируват окисляется пируватдегидрогеназой. При участии этого фермента пируват и тиаминпирофосфат также образуют α-оксиэтилтиаминпирофосфат (как в дрожжевых клетках), но в этом случае образовавшийся продукт реагирует с окисленной формой липоата, который является одновременно и акцептором водорода и акцептором ацильных групп (реакция 19 табл. 41). Эта реакция может протекать в один этап, как показано в таблице, с переносом CH_3CHO-группы, или в два этапа; первый из них состоит в переносе водорода с образованием ацетилтиаминпирофосфата и дигидролипоата, а второй — в переносе ацетильной группы с тиаминпирофосфата на восстановленный липоат. Затем липоат-ацетилтрансфераза переносит ацетильную группу с липоата на SH-группу кофермента А. Восстановленный липоат вновь окисляется НАД при участии липоамиддегидрогеназы и образовавшийся НАД·H_2, подобно коферменту, образующемуся в реакции 8 табл. 41, вновь окисляется при участии цитохромной системы. В дальнейшем ацетил-КоА подвергается превращениям, как показано в табл. 42, или вступает в какие-либо другие реакции.

Следует отметить, что приведенная система иллюстрирует то, о чем мы уже говорили в этой главе, когда указывали на возможность появления связанных с коферментом систем дегидрогеназных реакций в условиях отсутствия O_2. Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа и лактатдегидрогеназа (реакции 8 и 14 табл. 41) образуют систему такого рода при анаэробиозе в мышце, а глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа (реакции 8 и 17 табл. 41) — в дрожжевых клетках.

Почти все реакции, из которых слагается процесс гликолиза,— это реакции переноса; исключение составляют реакции 6, 12 и 16 табл. 41.

В табл. 42 показан путь дальнейшего окисления ацетил-КоА в цикле лимонной кислоты. Первая реакция состоит в переносе ацетильной группы с кофермента А на оксалоацетат с образованием цитрата. Последний под влиянием аконитатгидратазы превращается в изоцитрат в результате процесса, связанного с отщеплением молекулы воды и последующим присоединением ее в другом положении. Затем изоцитрат окисляется с помощью НАДФ при участии соответствующей дегидрогеназы, и образовавшийся оксалосукцинат декарбоксилируется тем же ферментом с образованием 2-оксоглутарата. Последний подвергается окислению, причем механизм его окисления очень сходен с механизмом окисления пирувата, описанным в табл. 41; в нем также участвует липоат. Продуктом реакции в этом случае является сукцинил-КоА, расщепление которого может происходить двумя различными путями. Он может просто гидролизоваться гидролазой, в результате чего образуются кофермент А и сукцинат (реакция 9 табл. 42), или

его расщепление может быть связано с синтезом молекулы АТФ из АДФ через реакции 13 и 14 табл. 42. Мы пока еще не знаем, какой из этих двух возможных путей превращения имеет большее значение. И в том и в другом случае образуется сукцинат; он окисляется в фумарат при участии соответствующей дегидрогеназы, системы цитохромов и O_2, а фумарат превращается под действием фумаратгидратазы в малат. Наконец, малат окисляется соответствующей дегидрогеназой в оксалоацетат, который заменяет оксалоацетат, израсходованный в первой реакции. Таким образом, цикл завершается.

В табл. 43 приведены реакции глиоксилатного цикла, который встречается у микроорганизмов и в растениях (см. [192, 1442]). Этот цикл можно рассматривать как модифицированный цикл лимонной кислоты (табл. 42), в котором реакции 4—11 (включая стадии образования CO_2) заменены другими этапами. Цикл лимонной кислоты по существу представляет собой механизм для окислительного расщепления ацетата до CO_2; образующиеся в ходе цикла C_4-кислоты — это промежуточные продукты. Их количество остается постоянным, и, следовательно, данный процесс не служит источником C_4-кислот для биосинтетических реакций. Глиоксилатный цикл, напротив,— это в основном путь для превращения двух ацетильных групп в C_4-кислоту, которая может быть использована для биосинтеза.

Реакции 1—3 табл. 43 полностью совпадают с реакциями 1—3 табл. 42, но на следующей стадии — в лиазной реакции — от изоцитрата отщепляется молекула сукцината и образуется молекула глиоксилата. Последняя затем реагирует со второй молекулой ацетил-КоА, и в этой реакции, очень сходной с реакцией образования цитрата, образуется малат. Малат окисляется до оксалоацетата, и цикл завершается. Сукцинат, образующийся в цикле, может быть использован для биосинтеза различных веществ. Эта система играет важную роль у микроорганизмов, растущих на среде с ацетатом. Предполагают, что она играет также важную роль при превращении жиров в углеводы, например в прорастающих семенах. В этом случае из жиров образуется ацетил-КоА (табл. 44), который превращается в цикле в сукцинат, а затем в сахар через оксалоацетат и фосфоенолпируват обращением реакций 12—3 табл. 41.

В первой части табл. 44 и показан путь окислительного расщепления жирных кислот до ацетил-КоА, а во второй части показано, каким путем из ацетил-КоА могут быть построены жирные кислоты с длинной цепью.

Первым этапом процесса расщепления является образование тиоэфирной связи между карбоксильной группой жирной кислоты и SH-группой кофермента А; эта реакция катализируется синтетазой, а необходимая для нее энергия поставляется за счет расщепления пирофосфатной связи АТФ. Следующие три реакции напоминают группу реакций цикла лимонной кислоты (реакции 10—12 табл. 42), но они катализируются другими ферментами; кроме того, в них участвуют не свободные дикарбоновые кислоты, а монокарбоновые производные кофермента А. Конечная реакция представляет собой перенос RCO-группы из соединения с ацетил-КоА на другую молекулу КоА; при этом образуется молекула ацил-КоА с цепью на два атома углерода короче, чем у исходного соединения. Этот продукт может затем вновь претерпевать подобную же серию превращений, и это будет повторяться столько раз, сколько необходимо для того, чтобы расщепить всю цепь на двууглеродные фрагменты, т. е. на молекулы ацетил-КоА. Следует отметить, что хотя в этом процессе отсутствует реакция фосфорилирования, однако окисление все же сопряжено с образованием макроэргических связей в виде тиоэфирных связей ацил-КоА, по одной на каждую расщепленную C — C-связь.

Поскольку в определенных условиях отдельные этапы процесса обратимы, можно было бы думать, что синтез жирных кислот с длинной цепью

из ацетил-КоА должен осуществляться путем обращения этого цикла. Однако основной путь синтеза идет через другие этапы (см. [1635]). Первым из них является карбоксилирование ацетил-КоА при участии биотинсодержащей лигазы с образованием малонил-КоА [2753]. Остальные реакции (реакции 7—12 табл. 44) катализируются смесью ферментов, которую пока еще не удалось разделить; при попытке очистить эти ферменты (выделенные из дрожжей и из печени голубя) выяснилось, что они ведут себя как частицы с молекулярным весом около 2 млн. [326, 327, 1635]. Предположение о существовании такого пути выдвинул Линен, который указывает, что имеются важные отличия между этим процессом и синтезом в результате обращения реакций 2—5 табл. 44. Различия эти состоят в следующем.

1. Малонил-КоА выступает вместо ацетил-КоА; декарбоксилирование (реакция 8 табл. 44) вызывает сдвиг равновесия в сторону синтеза.

2. В процессе окислительного расщепления все соединения находятся в форме тиоэфиров КоА, тогда как в процессе синтеза они находятся в форме тиоэфиров SH-ферментов; если бы они являлись производными КоА, то ацетоацетил-КоА, образовавшийся в первом обороте цикла ($R = CH_3—$), расщепился бы под действием фермента 2.3.1.9, и в результате синтез был бы прерван.

3. В процессе синтеза участвует НАДФ (реакции 9 и 11 табл. 44), а в реакциях расщепления принимает участие НАД (реакция 4 табл. 44).

4. Оксикислота, участвующая в реакциях 9—10 табл. 44, представлена D-формой, тогда как ферменты, катализирующие реакции 3—4 табл. 44, специфичны по отношению к L-форме.

5. В реакции 11 табл. 44 участвует ФМН, а реакция 2 табл. 44 протекает с участием ФАД.

Предположение о том, что в процессе синтеза имеет место реакция 12 табл. 44, трудно согласовать с тем фактом, что нам не удается обнаружить жирные кислоты с промежуточной длиной цепи. Поэтому Линен предположил, что кислоты с короткой и средней цепью переносятся не на КоА, а на SH-группу другой молекулы фермента для повторения реакции 8 табл. 44. Он исследовал методом изотопного обмена специфичность фермента, катализирующего реакцию 12 табл. 44, по отношению к жирным кислотам с различной длиной цепи и обнаружил четкий оптимум в отношении ацильных групп с 16 или 18 атомами углерода. Таким образом, цикл действует до тех пор, пока не будет синтезирована цепь такой длины, и только после этого освобождается продукт. Без сомнения, именно благодаря этому в природе преобладают пальмитиновая и стеариновая кислоты.

Бреслер и Вакил [327] недавно выдвинули возражения против некоторых деталей рассмотренной схемы. Они, например, считают, что продуктом является не пальмитоил-КоА, а свободная пальмитиновая кислота.

В табл. 45 приведена чрезвычайно интересная серия ферментативных реакций, посредством которых глюкозо-6-фосфат окисляется до CO_2 при участии НАДФ. Эти реакции обнаруживаются в ряде клеток, в том числе и в клетках некоторых животных тканей [607]. Иногда данную серию реакций называют глюкозофосфатным шунтом, так как реакции 1—8 табл. 45 по существу параллельны реакциям 4—7 табл. 41. Следует, однако, помнить, что эти превращения параллельны только на одном отрезке пути; что гликолитический путь связан с распадом АТФ, тогда как для реакции глюкозофосфатного шунта АТФ не требуется; что продуктом окисления во втором случае оказывается CO_2 и в реакциях принимает участие НАДФ, а не НАД, и, наконец, что почти на всех этапах эти две системы нуждаются в разных ферментах.

В данной системе молекула рибозо-5-фосфата, которая может образовываться в результате реакций 1—3 табл. 45 через реакцию 9 табл. 45, действует как катализатор; так как весь путь превращений довольно сло-

жен, то для большей четкости атомы углерода этой каталитически действующей молекулы рибозофосфата выделены в схеме жирным шрифтом.

Первым этапом процесса является простое окисление молекулы глюкозо-6-фосфата с образованием лактона фосфоглюконовой кислоты, который затем раскрывается ферментом лактоназой. На следующем этапе фосфоглюконат вновь окисляется и декарбоксилируется (по-видимому, одним и тем же ферментом, как в сходном случае НАДФ-специфичных ферментов — малатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы); при этом образуется рибулозофосфат, который превращается в ксилулозофосфат под действием рибулозофосфат-3-эпимеразы. Два первых атома углерода ксилулозофосфата переносятся транскетолазой на молекулу рибозофосфата, играющего роль катализатора; при этом образуется седогептулозо-7-фосфат, *трех*углеродный концевой остаток которого переносится обратно трансальдолазой на оставшийся глицеральдегидфосфат. При этой реакции образуются фруктозофосфат и эритрозофосфат. В результате пентоза, которая образовалась при отщеплении концевого углерода гексозы в виде CO_2, вновь превращается в гексозу, у которой атом углерода в положении 3 происходит из молекулы рибозофосфата, играющей роль катализатора. Затем изомераза превращает фруктозофосфат в глюкозофосфат, который подвергается окислению и декарбоксилированию по тому же пути, что и исходная молекула глюкозофосфата. Для ясности эти реакции, когда они протекают во второй раз, обозначают цифрой со штрихом: реакции 1′—4′ табл. 45; они по существу идентичны реакциям 1—4 табл. 45, если не считать того, что углеродный атом в положении 3 обозначен здесь жирным шрифтом, а это указывает, что он происходит от молекулы рибозофосфата, играющей роль катализатора. Транскетолаза переносит двууглеродный остаток с ксилулозофосфата на эритрозофосфат, образовавшийся в трансальдолазной реакции; при этом образуется одна молекула глицеральдегидфосфата и снова — одна молекула фруктозофосфата. Последняя после превращения в глюкозофосфат подвергается окислению и декарбоксилированию, как и раньше (реакции 1″ — 3″ табл. 45 идентичны реакциям 1—3 табл. 45, но в этом случае жирным шрифтом выделены атомы углерода в положениях 2—6). Теперь уже все пять атомов углерода образовавшегося рибулозофосфата принадлежат исходной, каталитически действующей молекуле рибозофосфата. Наконец, рибозофосфатизомераза превращает рибулозофосфат в рибозофосфат, который может снова повторить каталитический процесс.

В результате этих реакций происходит окисление молекулы глюкозофосфата с образованием трех молекул CO_2 и одной молекулы глицеральдегидфосфата. Если процесс начинается с двух молекул глюкозофосфата, то образуются две молекулы глицеральдегидфосфата, которые могут соединиться и образовать одну молекулу глюкозо-6-фосфата посредством реакций 10—13 табл. 45. Эти реакции представляют собой обращение реакции 7, 6 и 4 табл. 41 с промежуточным гидролизом, осуществляемым фосфатазой. Таким образом, в результате процесса, начавшегося с двух молекул глюкозофосфата, образуется одна новая молекула глюкозофосфата, а суммарный процесс представляет собой полное окисление одной молекулы глюкозофосфата до CO_2 и неорганического фосфата.

В табл. 46 приведена простая система, за счет которой может быть отнесено до 50% дыхательной активности некоторых растений [2966]. Это пример системы переноса водорода, в которой и НАД и глиоксилат действуют как коферменты, или переносчики водорода. Так как последний фермент рассматриваемой схемы является флавопротеидом и действие его связано с восстановлением и последующим окислением его флавиновой группы, то и эта группа также действует как переносчик водорода; таким образом, водород от субстрата передается к O_2 при участии трех последовательно включающихся в реакцию переносчиков.

В табл. 47 представлены реакции обмена тирозина. На первом этапе процесса происходит включение ОН-группы в *п*-положение кольца фенилаланина с образованием тирозина. Природа акцептора водорода, участвующего в этой реакции, еще не совсем ясна. Тирозин превращается в *п*-оксифенилпируват в результате переаминирования с 2-оксоглутаратом. Следующая затем реакция, катализируемая оксидазой, принадлежит к необычному типу; она приводит к окислительному декарбоксилированию боковой цепи и в то же время перемещает эту цепь в соседнее положение в кольце, оставляя на ее месте ОН-группу. Механизм этой реакции еще полностью не выяснен. Образующийся таким путем гомогентизат окисляется затем в оксигеназной реакции, т. е. путем присоединения молекулы O_2 по месту одной двойной связи в кольце. При этой реакции образуется малеилацетоацетат, который затем с помощью изомеразы превращается в фумарилацетоацетат. Кофактором в реакции служит глутатион; возможно, что изомеризация протекает с образованием промежуточного продукта, возникающего в результате присоединения SH-группы глутатиона по месту двойной связи малеилового остатка. Продукт реакции затем гидролизуется с образованием фумарата (который вступает в цикл лимонной кислоты) и ацетоацетата. Последний превращается в ацетоацетилпроизводное кофермента А с помощью трансферазы, которая переносит на него кофермент А с сукцинил-КоА, образующегося в цикле лимонной кислоты. Наконец, трансацетилаза переносит ацетильную группу с ацетоацетил-КоА на другую молекулу кофермента А; при этом образуются две молекулы ацетил-КоА, которые окисляются обычным путем в цикле лимонной кислоты.

В табл. 48 представлена система глиоксалазы. Раньше считали, что приведенная система реакций катализируется одним ферментом, но в настоящее время полагают, что в катализе участвуют два фермента. На первой стадии происходит, очевидно, присоединение SH-группы глутатиона по месту двойной связи енольной формы метилглиоксаля, т. е. типичная лиазная реакция. Продукт этой реакции S-лактилглутатион гидролизуется вторым ферментом с образованием свободной молочной кислоты и глутатиона.

В табл. 49 показан механизм ферментативного взаимопревращения глюкозы и галактозы в результате инверсии при С-4. Фермент эпимераза, катализирующий это превращение, действует только на уридиндифосфатные производные сахаров, так что первым условием является перевод сахаров в эти производные, как это показано в разделе «а». При этом, однако, нет необходимости в том, чтобы весь сахар сразу превращался в УДФ-производные, так как фермент 2.7.7.12 может переносить уридинмонофосфатную группу с уже прореагировавшей молекулы сахара на молекулу, еще не вступившую в указанную реакцию, как это показано в разделе «б». УМФ-группа может рассматриваться поэтому как своего рода непрерывно функционирующий механизм, переносящий молекулу фосфатного производного сахара в процессе инверсии. Таким образом, в этой системе участвует не истинный кофермент, а скорее «кофермент» такого же рода, как и тот, который участвует в фосфоглюкомутазной реакции (реакция 2 табл. 41). Первая ступень образования «кофермента» состоит в фосфорилировании двух компонентов реакции с образованием УТФ и галактозофосфата путем переноса фосфатного остатка с АТФ под действием соответствующих киназ. Затем оба образующихся продукта взаимодействуют по схеме типичной пирофосфорилазной реакции с освобождением неорганического пирофосфата. Реакция может быть представлена в следующем виде:

$$\begin{array}{l} \text{Ур—R—Ф—Ф—Ф—} \\ \quad\quad\quad\quad\quad\; \vdots \\ \text{Гал—Ф} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Ур—R—Ф} \\ \quad\quad\quad\; | \\ \text{Гал—Ф} \end{array} + \text{Ф—Ф} \qquad \text{(XII.1)}$$

где через «Ур» обозначен урацил. В обратной реакции место галактозы займет глюкоза. Реакция 6 табл. 49 может быть представлена следующим образом:

$$\begin{array}{ccc} \text{Гал}-\Phi & & \text{Гал}-\Phi \\ | & & | \\ \text{Ур}-\text{R}-\Phi & = & \text{Ур}-\text{R}-\Phi \\ | & & | \\ \text{Г}-\Phi & & \text{Г}-\Phi \end{array} \qquad \text{(XII.2)}$$

В молочной железе и в мозгу отсутствует уридилилтрансфераза [1768]; следовательно, циклический процесс, показанный в разделе «б», в этих тканях протекать не может.

В табл. 50 представлены некоторые реакции обмена метионина. Первый фермент переносит аденозин АТФ на атом серы метионина. Затем метильная группа переносится одной или другой метилтрансферазой на какой-либо акцептор, а остающийся продукт гидролизуется с образованием гомоцистеина и аденозина, причем последний вновь фосфорилируется. После этого L-сериндегидратаза катализирует реакцию присоединения гомоцистеина к молекуле серина; эта реакция протекает, вероятно, путем отщепления воды от серина и присоединения SH-группы гомоцистеина по месту возникшей двойной связи. Образующийся цистатионин расщепляется гомосериндегидратазой с освобождением цистеина. Первым продуктом этого расщепления оказывается, вероятно, винилглицин; он затем перестраивается с образованием 2-иминобутирата, а этот последний распадается на оксокислоту и аммиак. Оксобутират может испытывать различного рода превращения; он может, например, аминироваться с образованием аминобутирата (известный продукт обмена метионина в животных тканях) или декарбоксилироваться с образованием пропионата.

В табл. 51 приведена схема использования энергии АТФ для синтеза полисахарида. Этот процесс протекает через стадию образования УДФ-глюкозы, после чего глюкоза переносится с УДФ на конец полисахаридной цепи. Фермент, катализирующий эту последнюю реакцию, нуждается в присутствии глюкозо-6-фосфата, возможно для обеспечения точек ветвления при превращении полисахаридов с неразветвленной цепью в разветвленную структуру гликогена. Поскольку при образовании одной глюкозидной связи расщепляются две связи в АТФ, равновесие резко сдвинуто в сторону синтеза.

В табл. 52 представлены взаимопревращения ряда пентоз, которые можно наблюдать в бактериальных клетках при совместном действии киназ, кетол-изомераз и эпимераз. D-ксилулозо-5-фосфат занимает в этих взаимопревращениях ключевое положение, поскольку он может превратиться в D-рибулозофосфат под действием 3-эпимеразы, в L-рибулозофосфат под действием 4-эпимеразы, а также может образовываться при действии ксилулокиназы и расщепляться фосфокетолазой. При образовании D-ксилулозо-5-фосфата из D-рибозы, D-ксилозы и L-арабинозы в каждом случае участвуют киназа и кетол-изомераза, но если во втором и третьем случаях действие кетол-изомеразы предшествует действию киназы, то в первом случае, наоборот, действие киназы предшествует действию кетол-изомеразы. Для превращения D-рибозы и L-арабинозы в D-ксилулозо-5-фосфат необходимо участие эпимеразы, тогда как для превращения ксилозы его не требуется.

В табл. 53 представлена система ферментов, участвующих в синтезе изопреноидных соединений. Реакции, катализируемые ферментами этой группы, имеют большое биологическое значение, а некоторые из них представляют еще и особый интерес. Первая реакция состоит в переносе ацетильной группы из соединения с КоА на метильную группу второй молекулы ацетил-КоА. Затем третья молекула ацетил-КоА реагирует с молекулой ацетоацетил-КоА; эта реакция очень сходна с реакцией синтеза цитрата (реакция 1 табл. 42), так как метильная группа ацетил-КоА в результате

лиазной реакции присоединяется по месту двойной связи C = O и одновременно от другого конца молекулы отщепляется КоА. Группа —CO — КоА оксиметилглутарил-КоА претерпевает двуступенчатое восстановление за счет НАДФ·H_2; эта реакция, по-видимому, протекает при участии одного фермента и без промежуточного образования альдегида (по крайней мере в свободном состоянии). Важная особенность реакций 1—3 табл. 53 состоит в том, что *на каждом этапе процесса освобождается* молекула КоА и при этом разрывается богатая энергией тиоэфирная связь; в силу этого равновесие во всех трех реакциях резко сдвинуто в сторону синтеза. Например, НАДФ·H_2 обычно не восстанавливает карбоксильную группу до альдегидной, и в данном случае именно освобождение КоА позволяет восстановлению идти практически до конца.

На первичную спиртовую группу мевалоната, образовавшегося в результате этой реакции, переносится пирофосфат с АТФ. Этот процесс состоит из двух последовательных реакций, катализируемых двумя различными ферментами. Образовавшийся продукт при участии АТФ претерпевает уникальное ферментативное превращение, в результате которого отщепляются CO_2 и вода. Данную реакцию можно было бы рассматривать как обратную синтетазной реакции. Синтетаза осуществляет соединение двух молекул за счет расщепления АТФ (примером может служить действие карбоксилаз подгруппы 6.4.1), но в данном случае расщепление АТФ (реакция 6 табл. 53) вызывает декарбоксилирование. Образовавшийся изопентенилпирофосфат претерпевает изомеризацию в диметилаллильную форму, после чего следует реакция конденсации двух форм, при которой диметилаллильная группа переносится с пирофосфата на молекулу изопентенилпирофосфата. Эта конденсация сопровождается сдвигом двойной связи, так что образующийся геранилпирофосфат может рассматриваться как замещенный диметилаллилпирофосфат; геранильная группа в свою очередь может быть перенесена на другую молекулу изопентенилпирофосфата диметилаллилтрансферазой. Таким путем могут строиться длинные изопреноидные цепи, но для того, *чтобы процесс начался, необходима молекула диметилаллилпирофосфата.*

При синтезе стероидов этот тип конденсации заканчивается на стадии образования фарнезила; далее две молекулы фарнезилпирофосфата (под действием фермента, который еще недостаточно полно охарактеризован) соединяются с освобождением обеих пирофосфатных групп. В результате подобного соединения по типу «конец в конец» образуется сквален (в реакции 11 табл. 53 место соединения указано стрелкой). Затем в присутствии O_2 и НАДФ·H_2 осуществляется гидроксилирование, сопровождающееся образованием нескольких циклов. Этот процесс, очевидно, протекает одномоментно и катализируется одним ферментом — гидроксилазой. В результате реакции образуется ланостерол, от которого происходят и другие стероиды. Реакция гидроксилирования представляет собой сопряженное окисление, при котором один атом кислорода из O_2 окисляет молекулу сквалена (включаясь в гидроксильную группу), а другой окисляет НАДФ·H_2.

В табл. 54 представлена система образования мочевины (в печени). Ферментативные реакции 1—3 табл. 54 поставляют в этой системе первый атом азота. Предполагают, что источником азота для первой реакции служит аммиак, а для второй (альтернативной) реакции — аминокислоты. В любом случае в результате реакции образуется глутамат, который, вступая в реакцию *переаминирования*, передает аминогруппу на оксалоацетат с образованием аспартата. Таким образом, функция глутамата заключается в переносе аминогрупп. Реакции 4 и 5 табл. 54 поставляют второй атом азота и углерод. (Механизм действия карбаматкиназы животных — фермента, для которого совершенно необходим кофактор (ацетилглутамат) и две молекулы АТФ,— *до настоящего времени не выяснен. Соответствующий бактериальный* фермент требует только одной молекулы АТФ и совсем не нуждается

в ацетилглутамате.) Затем карбамоилтрансфераза переносит карбамоильную группу с фосфата на аминогруппу орнитина, освобождающегося в заключительной реакции этого цикла. Образовавшийся цитруллин в результате синтетазной реакции соединяется с аспартатом, образующимся в реакции 3 табл. 54; для образования связи в этой реакции используется энергия АТФ. Продукт реакции — аргининосукцинат — под действием следующего фермента расщепляется на аргинин и фумарат. Превращение фумарата идет по описанному ранее пути. Аргинин гидролизуется аргиназой на орнитин, который затем вступает в реакцию 5 табл. 54, и мочевину — конечный продукт процесса. Таким образом, мы можем рассматривать 2-оксоглутарат и оксалоацетат как два последовательных переносчика аммиака, а орнитин — как переносчик карбамоила. Эти три соединения действуют подобно коферментам, являясь частью каталитического механизма.

Альтернативный путь включает вместо реакции 10 табл. 54 реакции 11 и 12 табл. 54. В этом случае амидиновая группа аргинина не удаляется в результате гидролиза, а переносится на глицин с образованием гуанидинацетата, который затем метилируется и образует креатин.

В табл. 55 показан путь синтеза лецитина с использованием энергии АТФ. К глицерину последовательно присоединяются один фосфатный остаток и две ацильные группы. Затем в результате гидролиза фосфат отщепляется и образуется 1,2-диглицерид. Тем временем холин фосфорилируется и образующийся холинфосфат реагирует с ЦТФ, согласно уравнению

$$\begin{matrix} \text{Ци}-\text{R}-\Phi-\Phi-\Phi \\ + \\ \text{X}-\Phi \end{matrix} \quad = \quad \begin{matrix} \text{Ци}-\text{R}-\Phi \\ | \\ \text{X}-\Phi \end{matrix} + \Phi-\Phi \qquad \text{(XII.3)}$$

в котором через «Ци» обозначен цитозин, а через «X»— холин. Затем последний фермент переносит остаток фосфохолина из соединения с ЦМФ на свободную ОН-группу диглицерида, в результате чего образуется лецитин.

В первой части табл. 56 показан путь синтеза НАД и НАДФ. Первой ступенью процесса является фосфорилирование рибозы в положении 5 за счет АТФ. Затем происходит пирофосфорилирование по положению 1 рибозного остатка D-рибозо-5-фосфата также за счет АТФ. По-видимому, в большей части клеток следующей ступенью является перенос фосфорибозильной группы с пирофосфата на никотинат (реакция 3 табл. 56), однако в некоторых клетках эта группа переносится на никотинамид и в этом случае образуется НМН (реакция 7 табл. 56). В обоих случаях на следующем этапе фермент 2.7.7.1 переносит аденилильную группу с АТФ на мононуклеотид, образуя НАД или дезамидо-НАД. Последний при участии синтетазы амидируется до НАД, причем донором аминных групп служит в этой реакции глутамин. Наконец, НАД фосфорилируется с помощью АТФ до НАДФ. Интересно, что в этой системе АТФ является а) донором фосфатных групп, б) донором пирофосфатных групп, в) донором аденилильных групп и г) субстратом синтетазной реакции.

При гидролитическом расщеплении НАДФ расщепляться могут либо только некоторые, либо все четыре связи (не считая связей, расщепляемых в АМФ) и порядок гидролиза связей может варьировать в зависимости от обстоятельств; в таблице показаны два вероятных пути.

Реакции ферментативного синтеза кофермента А приведены в табл. 57. Первым этапом является синтетазная реакция, протекающая с расщеплением пирофосфатной связи АТФ; в этой реакции происходит соединение β-аланина и пантоата, и образующийся пантотенат фосфорилируется по своей первичной спиртовой группе под действием специфичной киназы. Затем под действием другой синтетазы к карбоксильной группе фосфопантотената присоединяется цистеин, и остаток цистеина подвергается декарбоксилированию. На следующем этапе аденилильная группа АТФ присоединяется к панте-

теинфосфату в результате трансферазной реакции, аналогичной реакций образования НАД. Наконец, к аденилильному остатку под действием другой специфичной киназы присоединяется еще одна фосфатная группа.

В табл. 58 приведен ряд последовательных ферментативных реакций, посредством которых синтезируются пурины и пиримидины. Эта таблица служит весьма наглядным примером многостадийного пути ферментативного синтеза. В разделе «а» показан синтез пуринов, в осуществлении которого принимают участие пятнадцать различных ферментов, а в разделе «б» — синтез пиримидинов, в котором занято еще 9 ферментов.

Пурины синтезируются не в свободном состоянии, а в соединении с фосфорибозильной группой, т. е. в виде пуриннуклеотида. Первые две реакции в этой системе те же, что и в табл. 56, но на следующем этапе фосфорибозильная группа переносится с пирофосфата на NH_2-группу глутамина. Интересно, что в процессе переноса рибозильная группа претерпевает инверсию — пирофосфат присоединен α-связью, а NH_2-группа присоединяется β-связью, которая характерна для природных нуклеотидов. Затем молекула глицина присоединяется к аминогруппе под действием АТФ-зависимой синтетазы и с тетрагидрофолата переносится формильная группа на аминогруппу глицина. При написании реакции 5 изображены только два атома азота в положениях 5 и 10 тетрагидрофолата (первый — вверху, а второй — внизу).

Следующей ступенью является замещение атома кислорода в СО-группе глицина на NH-группу глутамина, играющего роль донора в этой синтетазной реакции, протекающей с участием АТФ. Затем другая синтетаза замыкает имидазольное кольцо. Построение второго кольца идет с прямым присоединением CO_2, и образовавшаяся карбоксильная группа амидируется путем присоединения аспартата в реакции, катализируемой синтетазой. Затем следует реакция отщепления фумарата, катализируемая лиазой. Еще одна формильная группа переносится с тетрагидрофолата, хотя в этом случае не за счет метенильной формы, как в реакции 5 табл. 58. Наконец, построение пуриновой структуры завершается замыканием кольца, в данном случае — без участия АТФ.

Остальные реакции табл. 58 иллюстрируют образование других нуклеотидов из ИМФ. АМФ образуется в реакциях 13—14, которые напоминают реакции 9—10, с той лишь разницей, что вместо АТФ в них участвует ГТФ. ГМФ может образоваться таким же путем, как и КМФ в реакциях 15—16.

Следует отметить важную роль синтетаз и участие в процессе большого числа молекул АТФ; при образовании одной молекулы аденина расщепляется девять пирофосфатных связей АТФ (напомним, что образование глутамина и ГТФ также связано с распадом АТФ).

Сходство между пуринами и пиримидинами может навести на мысль, что пиримидины тоже синтезируются в соединении с фосфорибозильной группой, но это не так. Сначала образуется пиримидиновое кольцо и только затем это кольцо присоединяется к фосфорибозильной группе, в результате чего образуется нуклеотид. Первой ступенью является образование карбамоилфосфата в ферментативной реакции, уже рассмотренной в табл. 54. Карбамоильная группа переносится затем с фосфата на аспартат, и замыкание кольца карбамоиласпартата (уреидосукцината) дает дигидрооротат. Последний окисляется с помощью НАД до оротата, и только после этого присоединяется фосфорибозильная группа. В результате декарбоксилирования образуется УМФ, и после того как УМФ превратится в УТФ, он может под действием синтетазы аминироваться с образованием ЦТФ.

Вышеописанные реакции приводят к синтезу пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов из простых исходных соединений, но нуклеотиды могут быть и ресинтезированы из продуктов расщепления, например из продуктов, содержащих предобразованные пурины или пиримидины. Этот процесс катализируется другими ферментами. Различные нуклеотиды могут также

претерпевать взаимные превращения в ферментативных реакциях переноса, в результате которых одно основание заменяется другим.

В табл. 59, в разделах «б» и «в», показаны реакции, приводящие к синтезу сахарозы из CO_2. Эта цепь реакций зависит от присутствия АТФ и НАДФ·H_2. В эксперименте АТФ и НАДФ·H_2 могут быть просто добавлены в среду, но в природе они поставляются реакциями фотосинтеза (раздел «а») (см. [383]). Недавно было показано, что в осуществлении реакции 1 табл. 59 участвует помимо хлорофилла еще и ферредоксин — железопротеид [544] с необычно большим отрицательным редокс-потенциалом, а также флавопротеид НАДФ-редуктаза [2597]. На свету хлорофилл восстанавливает ферредоксин с отщеплением O_2 от воды, а флавопротеидный фермент катализирует восстановление НАДФ восстановленным ферредоксином. Механизм реакции 2 табл. 59 еще не уточнен, но полагают [87, 1098], что это циклический процесс, в котором участвует хлорофилл и цитохромы хлоропластов.

В реакции 3 табл. 59 (см. раздел «б») происходит присоединение молекулы CO_2; она присоединяется к центру молекулы рибулозодифосфата, которая распадается — с внутримолекулярным переносом водорода — на две молекулы фосфоглицерата. (Рибулозодифосфат образуется в реакции 14 табл. 59.) Этот последний повторяет в обратном порядке тот путь, которым фосфоглицерат образуется в процессе гликолиза; реакции 4—7 табл. 59 представляют собой, по сути дела, обращение реакций 10—6 табл. 41 и катализируются теми же ферментами, но только вместо НАД фермент листьев использует НАДФ. В результате образуется фруктозодифосфат. Восстановление в реакции 5 табл. 59 осуществляется за счет НАДФ·H_2, образованного в указанной выше фотохимической реакции. Затем одна фосфатная группа удаляется в результате гидролиза под действием специфичной фосфатазы, а транскетолаза переносит концевой двууглеродный остаток от фруктозо-6-фосфата на глицеральдегидфосфат, образованный в реакции 5 табл. 59. В результате образуются эритрозофосфат и ксилулозофосфат. Последний после превращения в рибулозофосфат (реакция 14 табл. 59) и фосфорилирования (реакция 15 табл. 59) образует рибулозодифосфат, который участвует в реакции 3 табл. 59. Эритрозофосфат при участии альдолазы соединяется с диоксиацетонфосфатом (из реакции 6 табл. 59), образуя седогептулозодифосфат. Фосфатаза отщепляет от последнего 1-фосфат, и затем уже монофосфат седогептулозы вступает в реакцию, обратную транскетолазной реакции (реакция 5 табл. 45), взаимодействуя с другой молекулой глицеральдегидфосфата. В результате этой реакции образуется вторая молекула ксилулозофосфата, которая подвергается тем же превращениям, что и ксилулозофосфат, образовавшийся ранее, и рибозофосфат, который под влиянием соответствующей изомеразы превращается в еще одну молекулу рибулозофосфата, завершая, таким образом, цикл. Поскольку при суммировании реакций реакция 8 табл. 59 должна быть повторена 3 раза, а реакция 9 табл. 59 только 2 раза, то в итоге образуется одна молекула фруктозо-6-фосфата.

Третья часть таблицы показывает, каким образом этот фруктозофосфат может затем превратиться в сахарозу. Под действием соответствующей изомеразы фруктозофосфат превращается в глюкозо-6-фосфат, а последний при участии фосфомутазы — в глюкозо-1-фосфат (обращение реакций 4 и 2 табл. 41). Глюкозо-1-фосфат превращается в производное УДФ в результате переноса уридилильной группы с УТФ. Другая молекула фруктозофосфата дефосфорилируется фосфатазой, и на эту молекулу фруктозы под действием глюкозилтрансферазы переносится остаток глюкозы, находящийся в соединении с УДФ, в результате чего образуется молекула сахарозы. Наконец, при участии АТФ регенерируется УТФ.

Следует отметить, что при фотосинтетическом образовании молекулы сахарозы из CO_2 и воды потребляется 37 молекул АТФ по реакции 2 табл. 59 и 24 молекулы НАДФ·H_2 по реакции 1 табл. 59.

Таблица 41

СИСТЕМА ГЛИКОЛИЗА

(1) α-Глюканфосфорилаза (2.4.1.1)

Гликоген + nH_3PO_4 = n Глюкозо-1-фосфат

(2) Фосфоглюкомутаза (2.7.5.1)

Глюкозо-1-фосфат + Глюкозо-1,6-дифосфат = Глюкозо-1,6-дифосфат + Глюкозо-6-фосфат

Если реакция начинается с глюкозы, то реакции (1) и (2) заменяются реакцией (3):

(3) Гексокиназа (2.7.1.1)

Глюкоза + АТФ = Глюкозо-6-фосфат + АДФ

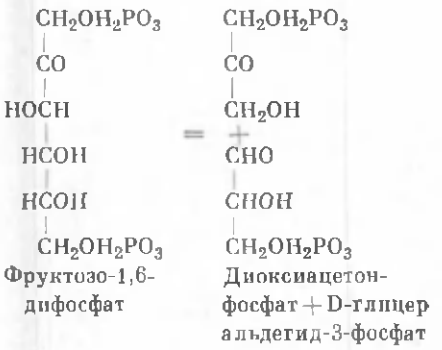
(4) Глюкозофосфат-изомераза (5.3.1.9)

Глюкозо-6-фосфат = Фруктозо-6-фосфат

(5) Фосфофруктокиназа (2.7.1.11)

Фруктозо-6-фосфат + АТФ = Фруктозо-1,6-дифосфат + АДФ

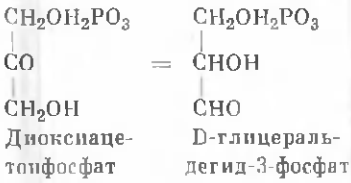
(6) Альдолаза (4.1.2.b)



Фруктозо-1,6-дифосфат

Диоксиацетонфосфат + D-глицеральдегид-3-фосфат

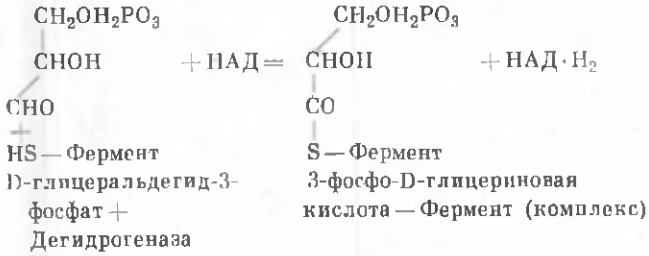
(7) Триозофосфат-изомераза (5.3.1.1)



Диоксиацетонфосфат

D-глицеральдегид-3-фосфат

(8) Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12)

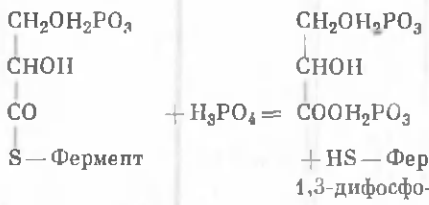


D-глицеральдегид-3-фосфат + Дегидрогеназа

3-фосфо-D-глицериновая кислота — Фермент (комплекс)

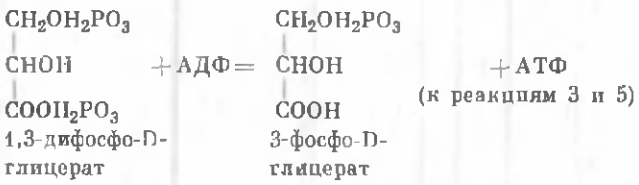
Продолжение табл. 41

(9) Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12)



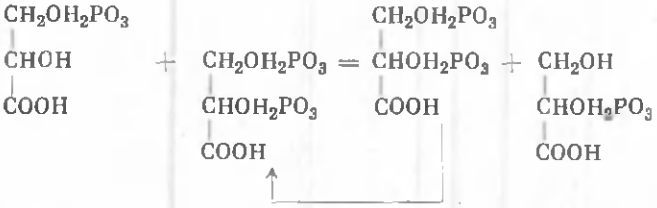
1,3-дифосфо-D-глицерат

(10) Фосфоглицераткиназа (2.7.2.3)



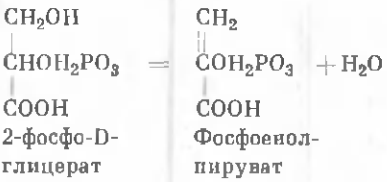
1,3-дифосфо-D-глицерат — 3-фосфо-D-глицерат

(11) Фосфоглицеромутаза (2.7.5.3)



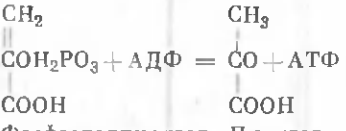
3-фосфо-D-глицерат — 2,3-дифосфо-D-глицерат — 2-фосфо-D-глицерат

(12) Фосфопируват-гидратаза (4.2.1.11)



2-фосфо-D-глицерат — Фосфоенолпируват

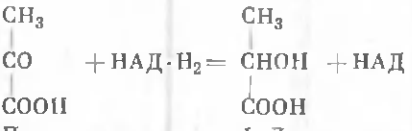
(13) Пируваткиназа (2.7.1.40)



Фосфоенолпируват — Пируват

Если O_2 отсутствует, то НАД·H_2 из реакции (8) окисляется в мышцах (реакция 14) и конечным продуктом является лактат

(14) Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27)

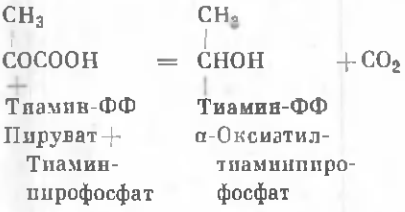


Пируват — L-Лактат

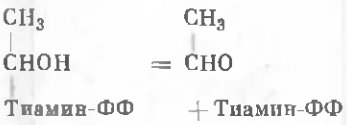
В дрожжевых клетках конечным продуктом является спирт:

Продолжение табл. 41

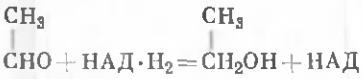
(15) Пируватдекарбоксилаза (4.1.1.1)



(16) Пируватдекарбоксилаза (4.1.1.1)

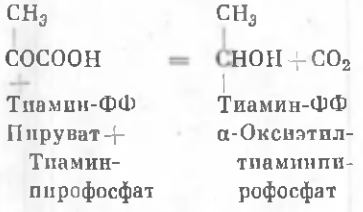


(17) Алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1)

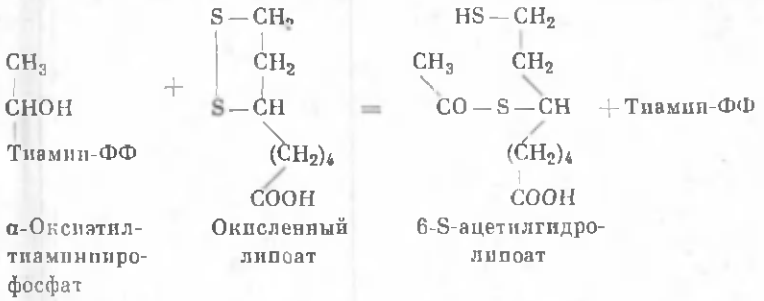


В присутствии O_2 НАД·H_2 окисляется с участием цитохромной системы и не может участвовать в реакциях (14) и (17). За реакцией (13) следуют в этом случае реакции (18—22) и продуктом является ацетил-КоА:

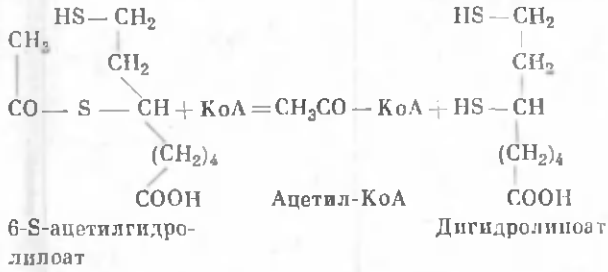
(18) Пируватдегидрогеназа (1.2.4.1)



(19) Пируватдегидрогеназа (1.2.4.1)

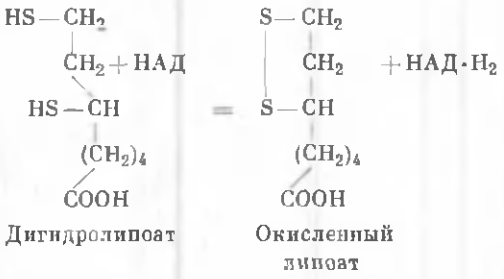


(20) Липоат-ацетилтрансфераза (2.3.1.12)



Продолжение табл. 41

(21) Липоамиддегидрогеназа (1.6.4.3)



(22) НАД·H_2-цитохром-*c*-редуктаза (1.6.2.1) и цитохромоксидаза (1.9.3.1)

$$НАД \cdot H_2 + {}^1/_2O_2 = НАД + H_2O$$

Сумма реакций (3—14):

Глюкоза + 2АДФ + $2H_3PO_4$ = 2 Молочная кислота + 2АТФ + $2H_2O$

Сумма реакций (3—13) и (15—17):

Глюкоза + 2АДФ + $2H_3PO_4$ = 2 Спирт + $2CO_2$ + 2АТФ + $2H_2O$

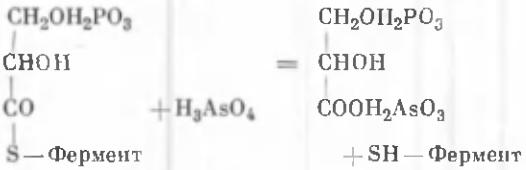
Сумма реакций (3—13) и (18—22):

Глюкоза + 2АДФ + $2H_3PO_4$ + $2O_2$ + 2КоА = 2 Ацетил-КоА + $2CO_2$ + 2АТФ + $6H_2O$

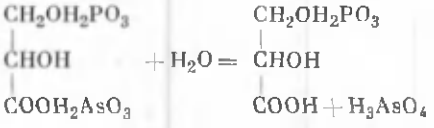
Примечание. Необходимо иметь в виду, что реакции, начиная с реакции (8) и далее, должны повториться два раза, так как из одной молекулы глюкозы образуются две молекулы триозофосфата (реакция 6). По этой причине в реакции (10) образуется такое количество АТФ, которого достаточно, чтобы обеспечить реакции (3) и (5), а АТФ, образующийся в избытке в реакции (13), может использоваться для других целей. Реакция (22) должна быть повторена четыре раза, если учитывать НАД·H_2, образующийся в реакциях (8) и (21).

Если добавлен арсенат, то реакции (9) и (10) заменяются реакциями (23) и (24):

(23) Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12)



(24) (быстрая спонтанная реакция)



Поэтому сопряженного фосфорилирования АДФ не происходит.

Таблица 42

ЦИКЛ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Это основной механизм окисления ацетил-КоА, образующегося в процессе превращения углеводов (реакция 20 табл. 41), жиров (реакция 5 табл. 44) или в каких-либо других метаболических процессах.

(1) Цитрат-синтаза (4.1.3.7)

$CH_3CO-КоА$ + H_2O + $COCOOH$ (CH_2COOH) = CH_2COOH $C(OH)COOH$ CH_2COOH + КоА

(из реакции 12)

Ацетил-Коа + Оксалоацетат — Цитрат

(2) *Аконитатгидратаза* (4.2.1.3)

CH_2COOH $C(OH)COOH$ CH_2COOH = CH_2COOH $CCOOH$ $CHCOOH$ + H_2O

Цитрат — *цис*-Аконитат

(3) Аконитатгидратаза (4.2.1.3)

CH_2COOH $CCOOH$ $CHCOOH$ + H_2O = CH_2COOH $CHOHCOOH$

цис-Аконитат — L_s-изоцитрат

(4) Изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42)

CH_2COOH $CHCOOH$ $CHOHCOOH$ + НАДФ = CH_2COOH $CHCOOH$ $COCOOH$ + НАДФ·H_2

L_s-изоцитрат — *Оксалосукцинат*

(5) НАДФ·H_2-цитохром-*c*-редуктаза (1.6.2.3) и цитохромоксидаза (1.9.3.1)

НАДФ·H_2 + $^1/_2O_2$ = НАДФ + H_2O

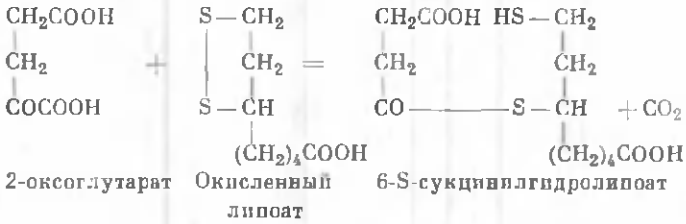
(6) Изоцитратдегидрогеназа (1.1 1.42)

CH_2COOH $CHCOOH$ $COCOOH$ = CH_2COOH CH_2 $COCOOH$ + CO_2

Оксалосукцинат — 2-оксоглутарат

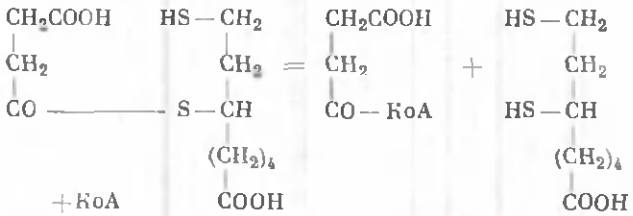
Продолжение табл. 42

(7) Оксоглутаратдегидрогеназа (1.2.4.2) с тиаминпирофосфатом



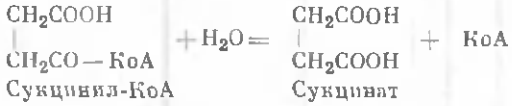
2-оксоглутарат | Окисленный липоат | 6-S-сукцинилгидролипоат

(8) Липоат-ацетилтрансфераза (2.3.1.12)



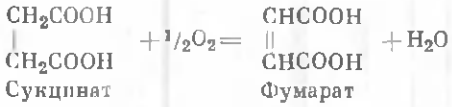
6-S-сукцинилгидролипоат | Сукцинил-КоА | Дигидролипоат (к реакции 21 табл. 41)

(9) Сукцинил-КоА-гидролаза (3.1.2.3)



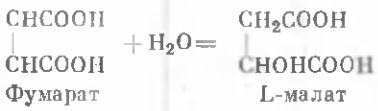
Сукцинил-КоА | Сукцинат

(10) Сукцинатдегидрогеназа (1.3.99.1) и цитохромоксидаза (1.9.3.1)



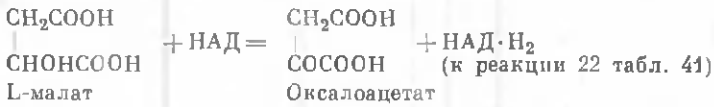
Сукцинат | Фумарат

(11) Фумаратгидратаза (4.2.1.2)



Фумарат | L-малат

(12) Малатдегидрогеназа (1.1.1.37)



L-малат | Оксалоацетат (к реакции 1 табл. 42) | (к реакции 22 табл. 41)

Сумма реакций:

$$\text{Ацетил-КоА} + 2O_2 = 2CO_2 + H_2O + \text{КоА}$$

Эта система может включать образование АТФ из АДФ, если вместо реакции (9) будут протекать реакции (13) и (14):

Продолжение табл. 42

(13) Сукцинил-КоА — синтетаза (6.2.1.4)

$$\begin{matrix}CH_2COOH\\|\\CH_2CO-KoA\\\text{Сукцинил-КоА}\end{matrix} + ГДФ + H_3PO_4 = \begin{matrix}CH_2COOH\\|\\CH_2COOH\\\text{Сукцинат}\end{matrix} + ГТФ + KoA$$

(14) Нуклеозиддифосфаткиназа (2.7.4.6)

$$ГТФ + АДФ = ГДФ + АТФ$$

Ацетил-КоА может участвовать и в других реакциях, например:

а) образование жира (табл. 44);

б) реакции ацетилирования под действием одного из ферментов 2.3.1.1—16, в том числе катализируемое фосфат-ацетилтрансферазой (2.3.1.8) *образование ацетилфосфата у бактерий*;

в) простой гидролиз под действием ацетил-КоА—гидролазы (3.1.2.1) с освобождением ацетата и КоА;

г) образование АТФ из АМФ и пирофосфата под действием ацетил-КоА—синтетазы (6.2.1.1);

д) *образование мевалоната, а от него —ряда изопреноидных соединений* (табл. 53).

е) образование в глиоксилатном цикле C_4-дикарбоновых кислот, используемых для процессов *биосинтеза (табл. 43)*.

Таблица 43

ГЛИКОКСИЛАТНЫЙ ЦИКЛ У РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ

(1) Цитрат-синтаза (4.1.3.7)

$$\begin{matrix}CH_3CO-KoA\\+\\H_2O\\+\\COCOOH\\|\\CH_2COOH\\\text{(из реакции 6)}\\\text{Ацетил-КоА} + \text{Оксало-ацетат}\end{matrix} = \begin{matrix}CH_2COOH\\|\\C(OH)COOH + KoA\\|\\CH_2COOH\\\text{Цитрат}\end{matrix}$$

(2) Аконитатгидратаза (4.2.1.3)

$$\begin{matrix}CH_2COOH\\|\\C(OH)COOH\\|\\CH_2COOH\\\text{Цитрат}\end{matrix} = \begin{matrix}CH_2COOH\\|\\CCOOH\\|\\CHCOOH\\\textit{цис}\text{-Аконитат}\end{matrix} + H_2O$$

(3) Аконитатгидратаза (4.2.1.3)

$$\begin{matrix}CH_2COOH\\|\\CCOOH\\\|\\CHCOOH\\\textit{цис}\text{-Аконитат}\end{matrix} + H_2O = \begin{matrix}CH_2COOH\\|\\CHCOOH\\|\\CHOHCOOH\\L_s\text{-изоцитрат}\end{matrix}$$

Продолжение табл. 43

(4) Изоцитрат-лиаза (4.1.3.1)

CH_2COOH — $CHCOOH$ — $CHOHCOOH$ = CH_2COOH — CH_2COOH + $CHOCOOH$

L_s-изоцитрат = Сукцинат + Глиоксилат

(5) Малат-синтаза (4.1.3.2)

$CH_3CO-KoA$ + H_2O + $CHOCOOH$ = CH_2COOH — $CHOHCOOH$ + KoA

Ацетил-КоА + Глиоксилат = L-малат

(6) Малатдегидрогеназа (1.1.1.37)

CH_2COOH — $CHOHCOOH$ + НАД = CH_2COOH — $COCOOH$ + $НАД \cdot H_2$

(к реакции 22 табл. 41)

L-малат = Оксалоацетат

(к реакции 1 табл. 43)

Сумма реакций:

2 Ацетил-КоА + H_2O + $^1/_2O_2$ = Сукцинат + 2КоА

Таблица 44

РАСЩЕПЛЕНИЕ И СИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

а) *Расщепление*

(1) Ацил-КоА — синтетаза (6.2.1.2 или 3)

$RCH_2CH_2COOH + KoA + АТФ = RCH_2CH_2CO-KoA + АМФ + Пирофосфат$

(2) Ацил-КоА-дегидрогеназа (1.3.2.2) и цитохромоксидаза (1.9.3.1)

$RCH_2CH_2CO-KoA + {}^1/_2O_2 = RCH=CHCO-KoA + H_2O$

(3) Енoил-КоА — гидратаза (4.2.1.17)

$RCH=CHCO-KoA + H_2O = RCHOHCH_2CO-KoA$

(4) 3-оксоацил-КоА — дегидрогеназа (1.1.1.35)

$RCHOHCH_2CO-KoA + НАД = RCOCH_2CO-KoA + НАД \cdot H_2$

(5) Ацетил-КоА — ацилтрансфераза (2.3.1.16)

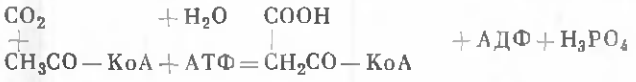
$RCOCH_2CO-KoA + KoA = RCO-KoA + CH_3CO-KoA$

В результате этих реакций происходит укорочение цепи жирной кислоты на два углеродных атома. При последовательном повторении реакций (2—5) может пройти полное расщепление молекулы жирной кислоты до ацетил-КоА. На последних стадиях ферменты 1.3.2.2 и 2.3.1.16 замещаются соответственно ферментами 1.3.2.1 и 2.3.1.9.

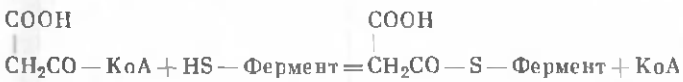
Продолжение табл. 44

б) Синтез (по Линену [1635])

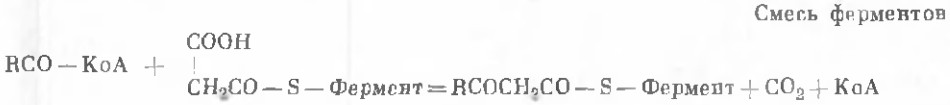
(6) Ацетил-КоА — карбоксилаза (6.4.1.2)



(7) Смесь ферментов



(8) Смесь ферментов



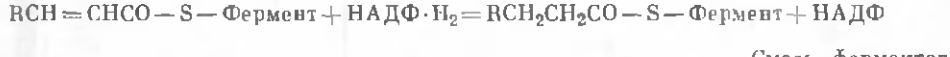
(9) Смесь ферментов



(10) Смесь ферментов



(11) Смесь ферментов



(12) Смесь ферментов

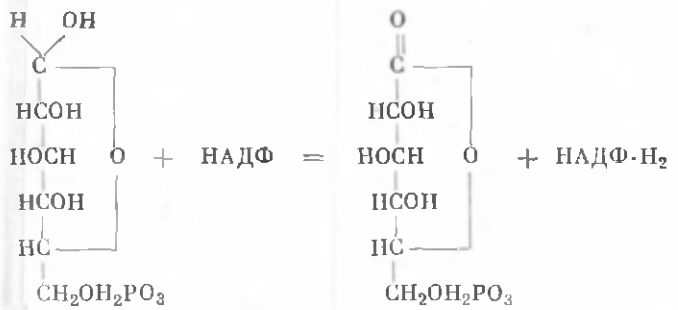


При последовательном повторении реакций (8—12) из *малонил-КоА* могут строиться жирные кислоты с длинной цепью.

Таблица 45

СИСТЕМА ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА

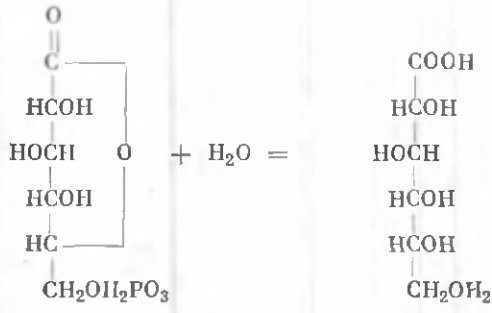
(1) Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (1.1.1.49)



D-глюкозо-6-фосфат D-глюконо-δ-лактон-6-фосфат

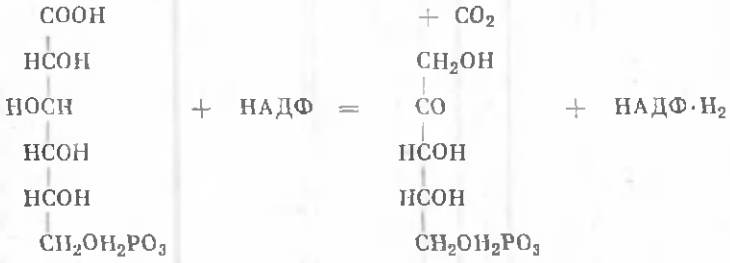
Продолжение табл. 45

(2) Глюконолактоназа (3.1.1.17)



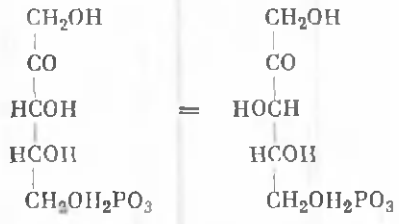
D-глюконо-δ-лактон-6-фосфат — 6-фосфо-D-глюконат

(3) Фосфоглюконатдегидрогеназа (1.1.1.44)



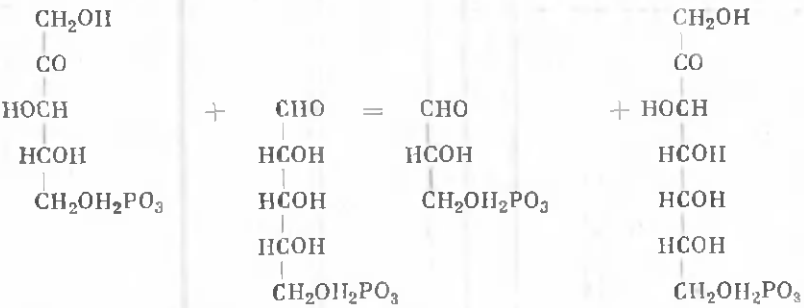
6-фосфо-D-глюконат — D-рибулозо-5-фосфат

(4) Рибулозофосфат-3-эпимераза (5.1.3.1)



D-рибулозо-5-фосфат — D-ксилулозо-5-фосфат

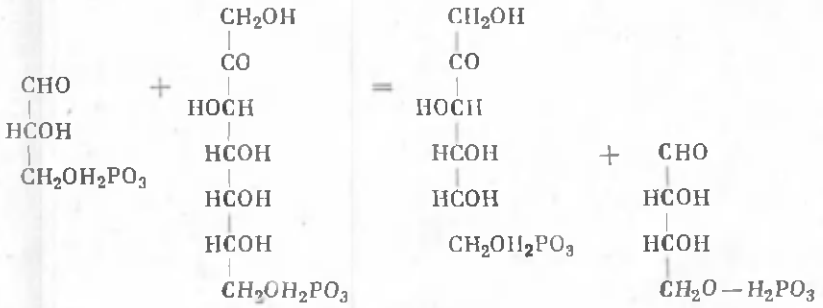
(5) Транскетолаза (2.2.1.1)



(из реакции 9 табл. 45)

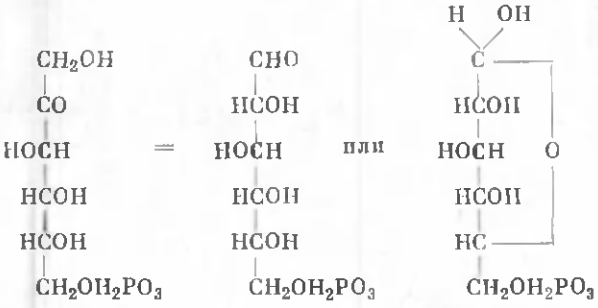
D-ксилулозо-5-фосфат — D-рибозо-5-фосфат — D-глицеральдегид-3-фосфат — D-седогептулозо-7-фосфат

(6) Трансальдолаза (2.2.1.2)



D-глицеральдегид-3-фосфат | D-седогептулозо-7-фосфат | D-фруктозо-6-фосфат | D-эритрозо-4-фосфат

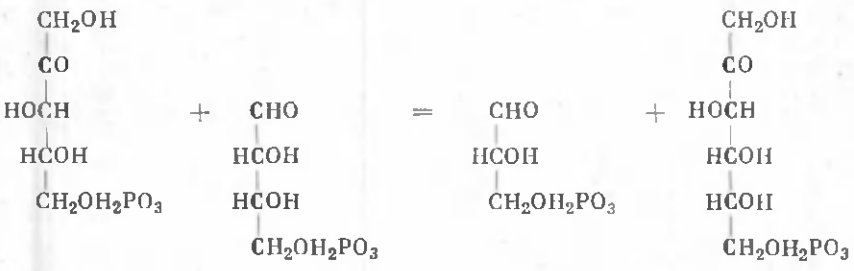
(7) Глюкозофосфат-изомераза (5.3.1.9)



D-фруктозо-6-фосфат

(к реакциям 1′—4′ табл. 45)
D-глюкозо-6-фосфат

(8) Транскетолаза (2.2.1.1)



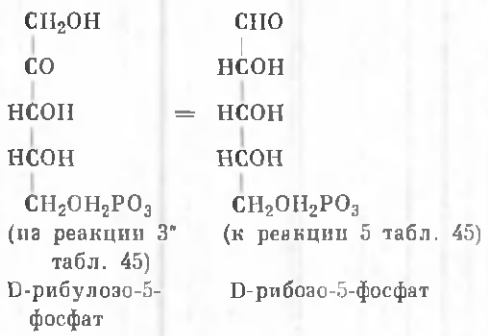
(из реакции 4′ табл. 45)
D-ксилулозо-5-фосфат

(из реакции 6 табл. 45)
D-эритрозо-4-фосфат

D-глицеральдегид-3-фосфат

(к реакциям 7′—3′ табл. 45)
D-фруктозо-6-фосфат

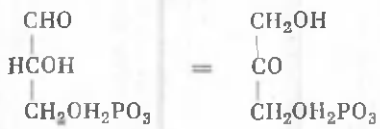
(9) Рибозофосфат-изомераза (5.3.1.6)



(из реакции 3* табл. 45) (к реакции 5 табл. 45)

D-рибулозо-5-фосфат — D-рибозо-5-фосфат

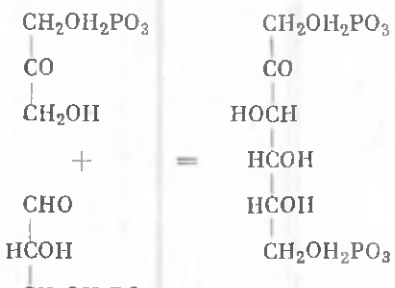
(10) Триозофосфат-изомераза (5.3.1.1)



(из реакции 8 табл. 45)

D-глицеральдегид-3-фосфат — Диоксиацетонфосфат

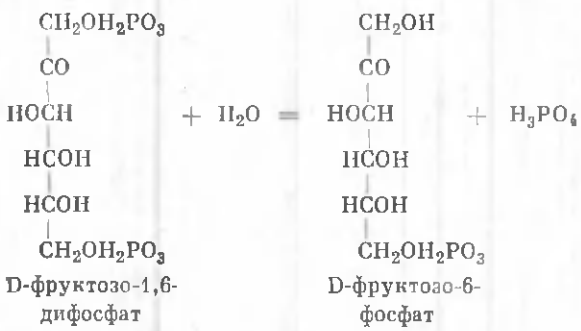
(11) Альдолаза (4.1.2.b)



(из реакции 8)

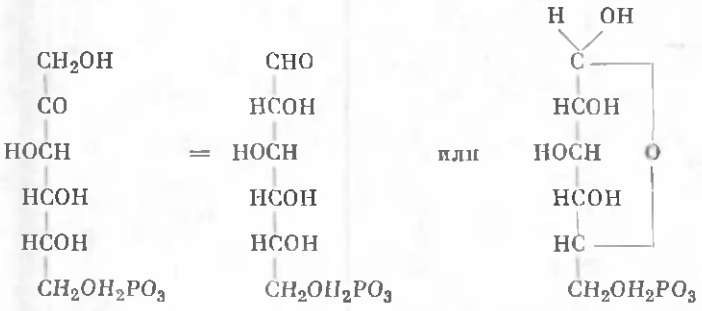
Диоксиацетонфосфат + D-глицеральдегид-3-фосфат — D-фруктозо-1,6-дифосфат

(12) Гексозодифосфатаза (3.1.3.11)



D-фруктозо-1,6-дифосфат — D-фруктозо-6-фосфат

(13) Глюкозофосфат-изомераза (5.3.1.9)



(к реакции 1)

D-фруктозо-6-фосфат — D-глюкозо-6-фосфат

Сумма реакций:

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + 12\text{НАДФ} + 7H_2O = 6CO_2 + 12\text{НАДФ}\cdot H_2 + H_3PO_4$$

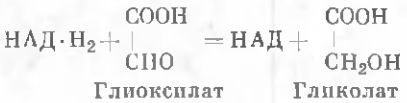
Таблица 46

ФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА, ПЕРЕНОСЯЩАЯ ВОДОРОД В РАСТЕНИЯХ [2964]

(1) Дегидрогеназы

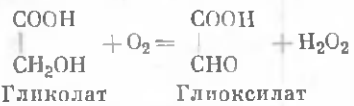
$$AH_2 + \text{НАД} = A + \text{НАД}\cdot H_2$$

(2) Глиоксилатредуктаза (1.1.1.26)



Глиоксилат — Гликолат

(3) Гликолатоксидаза (1.1.3.1



Гликолат — Глиоксилат

Сумма реакций:

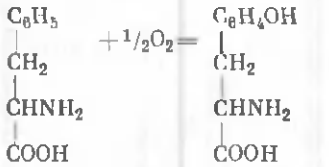
$$AH_2 + O_2 = A + H_2O_2$$

AH_2 обозначает различные субстраты НАД-специфичных дегидрогеназ. Имеются данные, говорящие о том, что эта система играет важную роль в дыхании растений.

Таблица 47

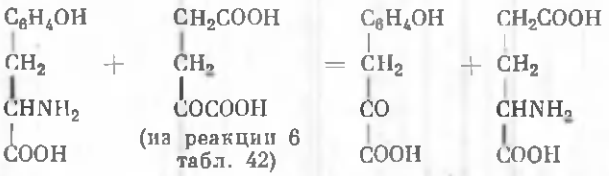
СИСТЕМА ОКИСЛЕНИЯ ФЕНИЛАЛАНИНА

(1) **Фенилаланин-4-гидроксилаза (1.99.1.2)**



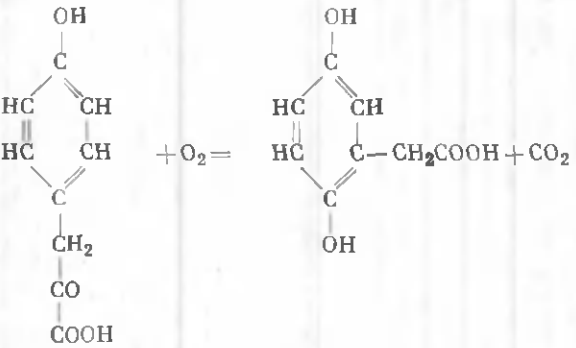
L-фенилаланин L-тирозин

(2) **Тирозин-аминотрансфераза (2.6.1.5)**



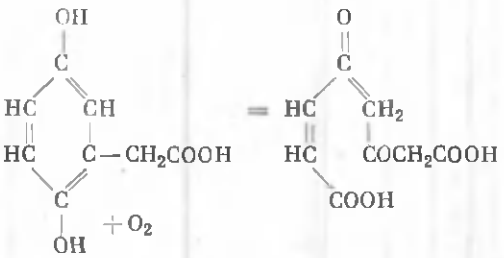
L-тирозин 2-оксоглутарат *n*-Оксифенилпируват L-глутамат

(3) ***n*-Оксифенилпируват-гидроксилаза (1.99.1.14)**



n-Оксифенилпируват Гомогентизат

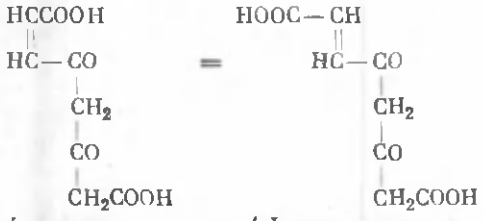
(4) **Гомогентизат-оксигеназа (1.99.2.5)**



Гомогентизат 4-малеилацетоацетат

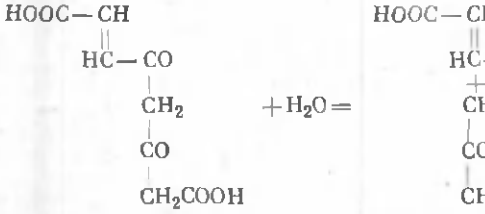
Продолжение табл. 47

(5) Малеилацетоацетат-изомераза (5.2.1.2)



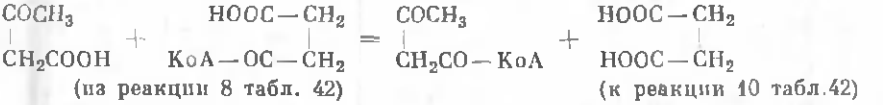
4-малеилацетоацетат 4-фумарилацетоацетат

(6) Фумарилацетоацетаза (3.7.1.2)



4-фумарилацетоацетат Фумарат + Ацетоацетат

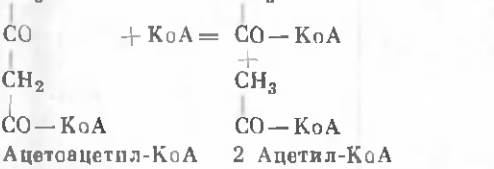
7) КоА-трансфераза 3-кетокислот (2.8.3.5)



(из реакции 8 табл. 42) (к реакции 10 табл. 42)

Ацетоацетат Сукцинил-КоА Ацетоацетил-КоА Сукцинат

(8) Ацетил-КоА — ацетилтрансфераза (2.3.1.9)

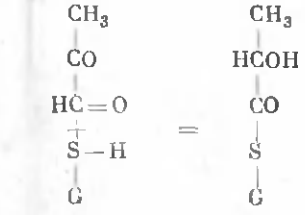


Ацетоацетил-КоА 2 Ацетил-КоА (к реакции 1 табл. 42)

Таблица 48

СИСТЕМА ГЛИОКСАЛАЗЫ [1]

(1) Лактоилглутатион-лиаза (4.4.1.5)

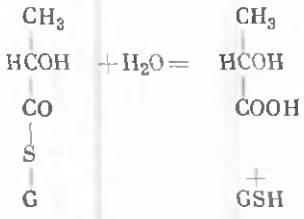


Метилглиоксаль + Глутатион S-лактоилглутатион

[1] GSH — восстановленный глутатион.

Продолжение табл. 48

(2) Оксиацилглутатион-гидролаза (3.1.2.6)



S-лактоил-глутатион — Лактат + Глутатион

Таблица 49

СИСТЕМА ПРЕВРАЩЕНИЙ ГАЛАКТОЗЫ

а) Образование «кофермента»

(1) Нуклеозиддифосфаткиназа (2.7.4.6)

УДФ + АТФ = УТФ + АДФ

(2) Галактокиназа (2.7.1.6)

D-галактоза + АТФ = α-D-галактозо-1-фосфат + АДФ

(3) Галактозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза (2.7.7.10)

α-D-галактозо-1-фосфат + УТФ = УДФ-галактоза + Пирофосфат

или (если система катализирует обратную реакцию):

(4) Глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза (2.7.7.9

α-D-глюкозо-1-фосфат + УТФ = УДФ-глюкоза + Пирофосфат

б) Инверсия сахара

Если «кофермент» образовался, то в дальнейшем процесс может идти непрерывно следующим путем:

(5) УДФ-глюкозо-эпимераза (5.1.3.2) + НАД

УДФ-галактоза $\rightleftharpoons$ УДФ-глюкоза

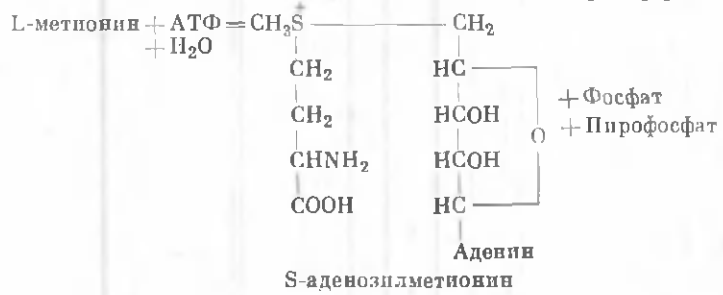
(6) Гексозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза (2.7.7.12)

УДФ-глюкоза + α-D-галактозо-1-фосфат $\rightleftharpoons$ УДФ-галактоза + α-D-глюкозо-1-фосфат

Таблица 50

ОБМЕН МЕТИОНИНА

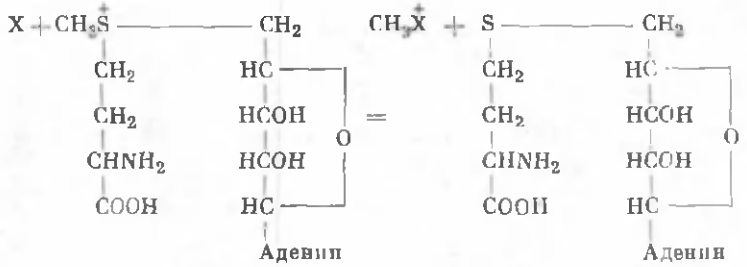
(1) Метионин-аденозилтрансфераза (2.4.2.13)



S-аденозилметионин

Продолжение табл. 50

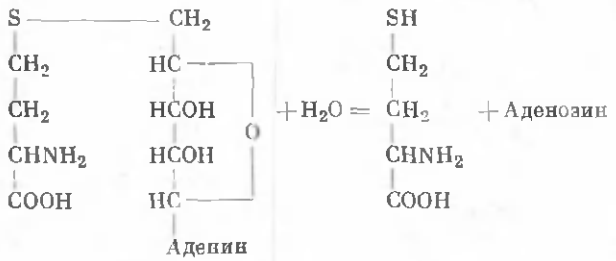
(2) Метилтрансферазы (2.1.1.а и т. д.)



S-аденозилметионин S-аденозилгомоцистеин

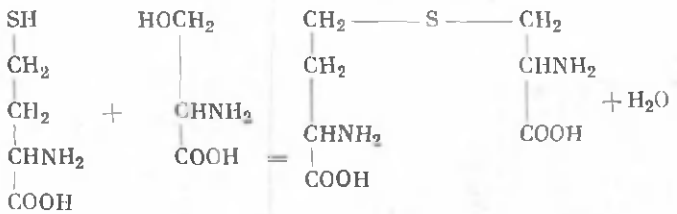
(X может означать никотинамид или какой-нибудь другой акцептор метильных групп)

(3) *Аденозилгомоцистеиназа (3.3.1.1)*



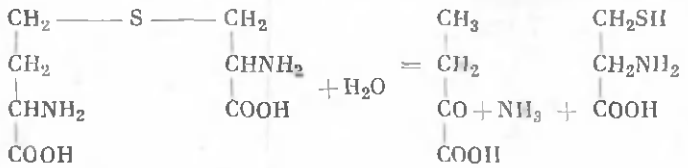
S-аденозилгомоцистеин L-гомоцистеин

(4) L-сериндегидратаза (4.2.1.13)



L-гомоцистеин L-серин Цистатионин

(5) Гомосериндегидратаза (4.2.1.15)



Цистатионин 2-оксобутират L-цистеин

Таблица 51

СИНТЕЗ ГЛИКОГЕНА

(1) Глюкокиназа (2.7.1.2)

Глюкоза + АТФ = Глюкозо-6-фосфат + АДФ

(2) Фосфоглюкомутаза (2.7.5.1)

Глюкозо-6-фосфат + Глюкозо-1,6-дифосфат = Глюкозо-1,6-дифосфат + + Глюкозо-1-фосфат

Продолжение табл. 51

(3) Нуклеозиддифосфаткиназа (2.7.4.6)

$$УДФ + АТФ = УТФ + АДФ$$

(4) Глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза (2.7.7.9)

$$Глюкозо\text{-}1\text{-}фосфат + УТФ = Пирофосфат + УДФ\text{-}глюкоза$$

(5) УДФ-глюкоза-гликоген — глюкозилтрансфераза (2.4.1.11)

$$УДФ\text{-}глюкоза + (Гликоген)_n = УДФ + (Гликоген)_{n+1}$$

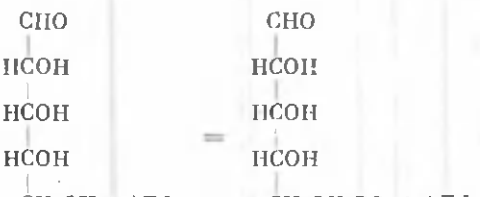
(через n обозначено число остатков глюкозы в молекуле).

Таблица 52

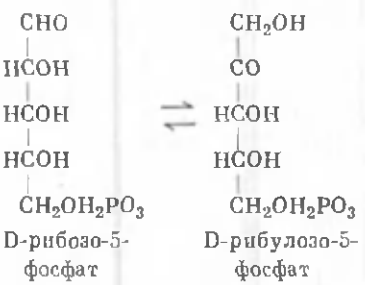
ВЗАИМОПРЕВРАЩЕНИЯ ПЕНТОЗ У LACTOBACILLUS [1047]

а) D-рибоза

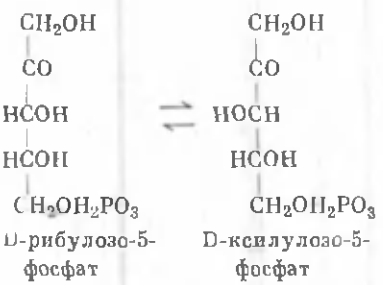
1) Рибокиназа (2.7.1.15)



(2) Рибозофосфат-изомераза (5.3.1.6)



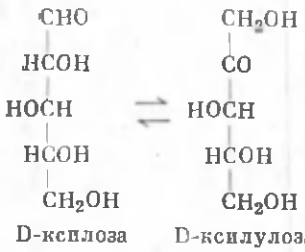
(3) Рибулозофосфат-3-эпимераза (5.1.3.1)



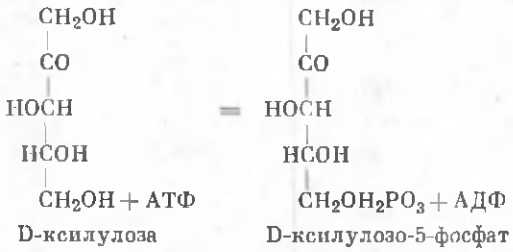
Продолжение табл. 52

б) Ксилоза

(4) Ксилозоизомераза (5.3.1.5)

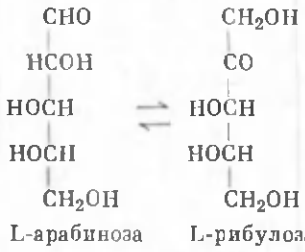


(5) Ксилулокиназа (2.7.1.17)

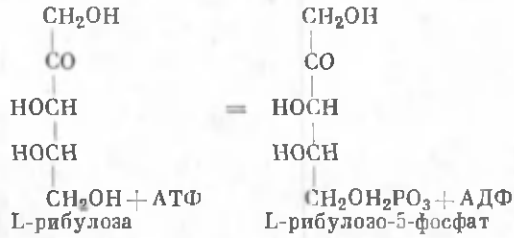


в) L-Арабиноза

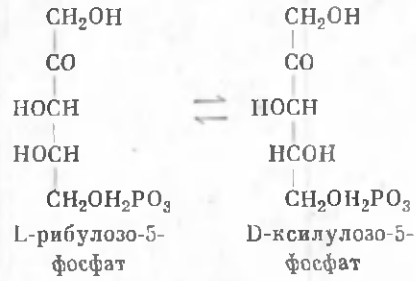
(6) Арабинозоизомераза (5.3.1.4)



(7) Рибулокиназа (2.7.1.16)



(8) Рибулозофосфат-4-эпимераза (5.1.3.a)

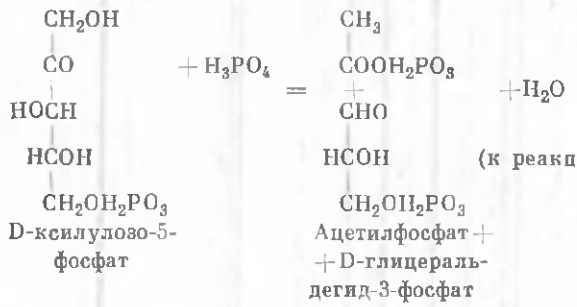


Продолжение табл. 52

Поскольку во всех трех случаях образуется D-ксилулозо-5-фосфат и все реакции (за исключением реакций, катализируемых киназами) легко обратимы, многие из указанных выше сахаров могут претерпевать взаимопревращения через D-ксилулозо-5-фосфат. D-ксилулозо-5-фосфат играет роль ключевого соединения также и при ферментативном расщеплении всех сахаров, как показано ниже.

г) Расщепление сахаров

(9) Фосфокетолаза (4.1.2.9)



(10) Ацетаткиназа (2.7.2.1)

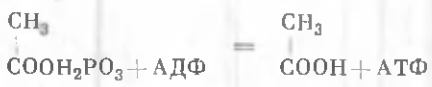
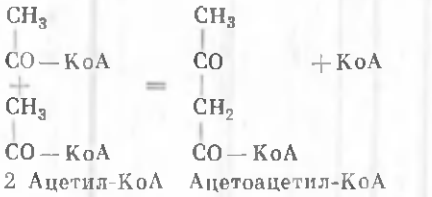


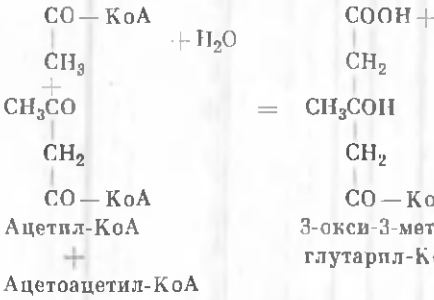
Таблица 53

СИНТЕЗ ИЗОПРЕНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ [1637, 2902]

(1) Ацетил-КоА — ацетилтрансфераза (2.3.1.9)

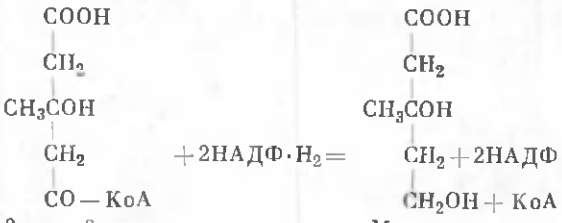


(2) Оксиметилглутарил-КоА — синтаза (4.1.3.5)



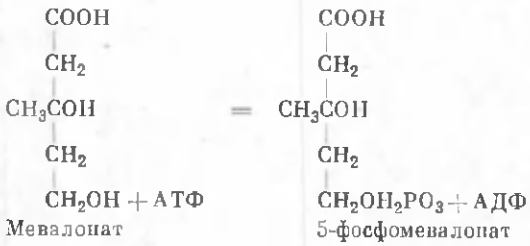
Продолжение табл. 53

(3) Оксиметилглутарил-КоА — редуктаза (1.1.1.34)



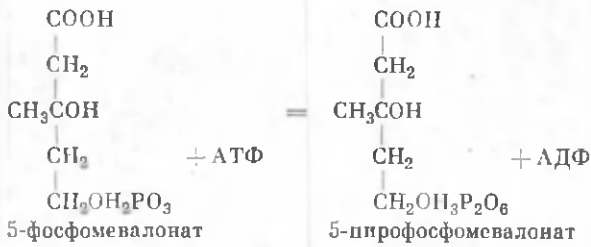
3-окси-3-метилглутарил-КоА — Мевалонат

(4) Мевалонаткиназа (2.7.1.36)



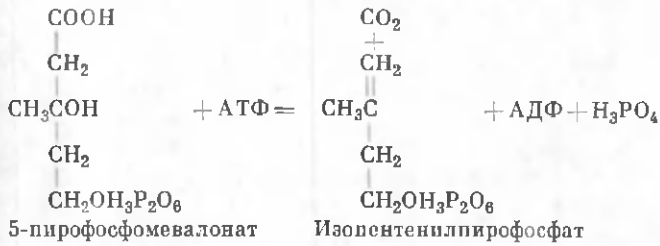
Мевалонат — 5-фосфомевалонат

(5) Фосфомевалонаткиназа (2.7.4.2)



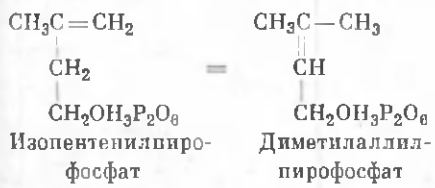
5-фосфомевалонат — 5-пирофосфомевалонат

(6) Пирофосфомевалонат-декарбоксилаза (4.1.1.33)



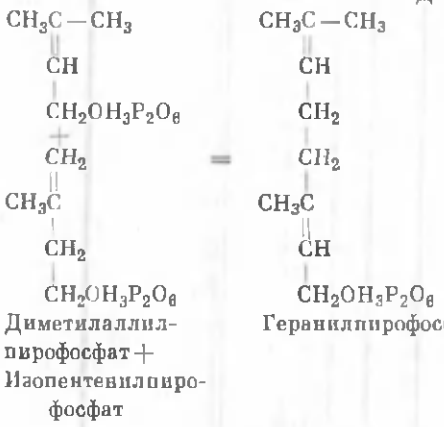
5-пирофосфомевалонат — Изопентенилпирофосфат

(7) Изопентенилпирофосфат-изомераза (5.3.3.2)



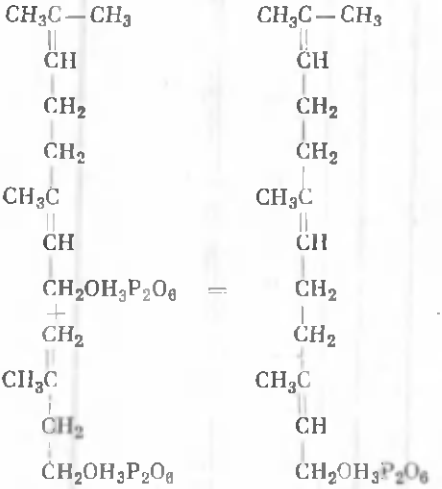
Изопентенилпирофосфат — Диметилаллилпирофосфат

(8) Диметилаллилтрансфераза (2.5.1.1)



Диметилаллилпирофосфат + Изопентенилпирофосфат — Геранилпирофосфат

(9) Диметилаллилтрансфераза (2.5.1.1)



Геранилпирофосфат + Изопентенилпирофосфат — Фарнезилпирофосфат

Ферменты, катализирующие реакции, которые приводятся ниже, недостаточно хорошо охарактеризованы. Различные пути превращений ведут к весьма разнообразным продуктам. Возможны, однако, три основных варианта: а) гидролитическое отщепление концевой пирофосфатной группы, в результате чего через гераниол или фарнезол образуется ряд циклических или ациклических терпенов; б) многократное повторение реакции присоединения C_5-фрагментов по типу «голова к хвосту», как в реакциях (8) и (9), приводящее к образованию длинных изопреноидных цепей, наподобие тех, которые мы встречаем в убихиноне, гуттаперче и каучуке, а также (в насыщенной форме) в фитоле, токоферолe и витамине К или (в менее насыщенной форме) в каротиноидах; в) связывание двух молекул фарнезилпирофосфата по типу «хвост к хвосту», приводящее через сквален к образованию стероидов, как показано ниже.

(10) Фермент из микросом

2 Фарнезилпирофосфат + НАДФ·H_2 = Сквален + НАДФ + 2 Пирофосфат

Продолжение табл. 53

(11) Сквален-циклогидроксилаза (1.99.1.13)

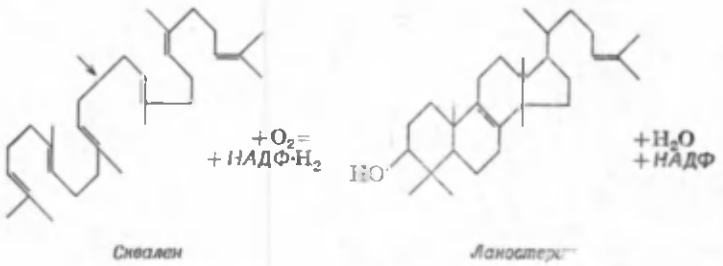
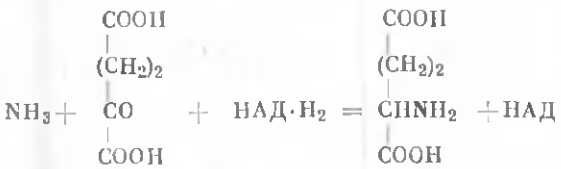


Таблица 54

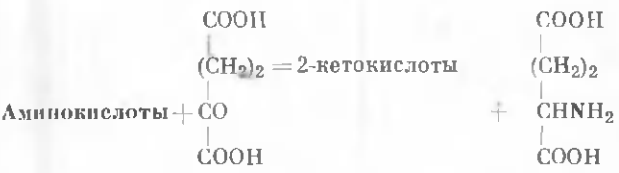
ОБРАЗОВАНИЕ МОЧЕВИНЫ В ПЕЧЕНИ

(1) Глутаматдегидрогеназа (1.4.1.3)

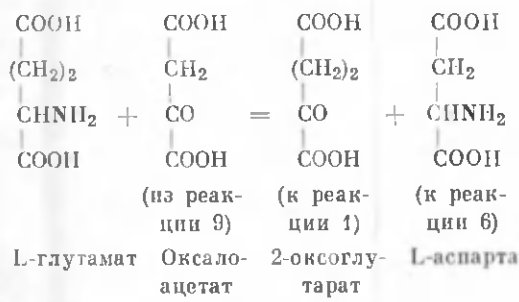


или

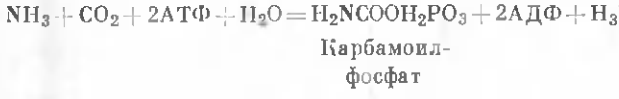
(2) Аминотрансферазы (2.6.1.2—8)



(3) Аспартат-аминотрансфераза (2.6.1.1)

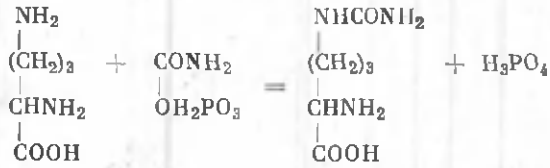


(4) Карбаматкиназа (2.7.2. а) с ацетилглутаматом



Продолжение табл. 54

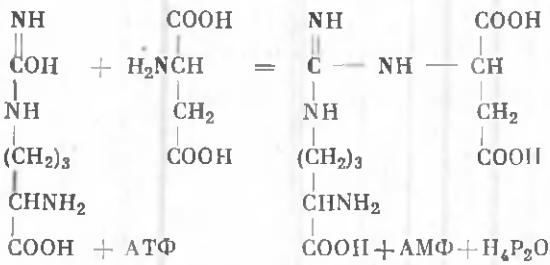
(5) Орнитин-карбамоилтрансфераза (2.1.3.3)



(из реакции 10 табл. 54)

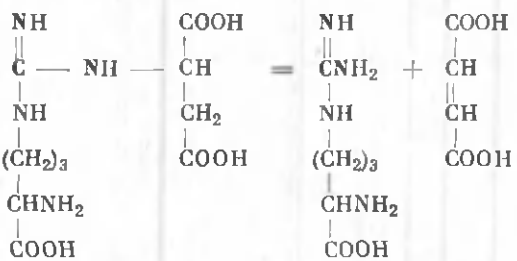
L-орнитин | Карбамоил-фосфат | L-цитруллин

(6) Аргининосукцинат-синтетаза (6.3.4.5)



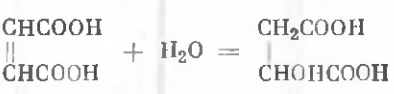
L-цитруллин | L-аспартат | L-аргининосукцинат

(7) Аргининосукцинат-лиаза (4.3.2.1)



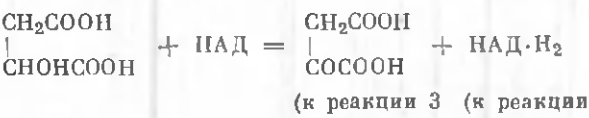
L-аргининосукцинат | L-аргинин | Фумарат

(8) Фумаратгидратаза (4.2.1.2)



Фумарат | L-малат

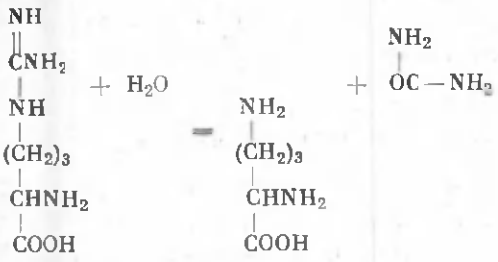
(9) Малатдегидрогеназа (1.1.1.37)



(к реакции 3 табл. 54) (к реакции 1 (табл. 54)

L-малат | Оксалоацетат

(10) Аргиназа (3.5.3.1)



L-аргинин — L-орнитин + Мочевина

Сумма реакций (за исключением реакции 2):

$$2NH_3 + CO_2 + 3АТФ + 2H_2O = Мочевина + АМФ + 2АДФ + 2H_3PO_4 + H_4P_2O_7$$

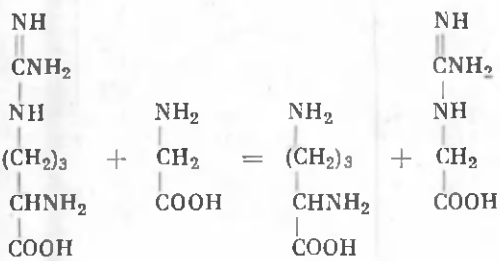
Два атома азота мочевины попадают в систему различными путями: один в результате реакций (1—3), а другой — через реакции (4) и (5). В одной и той же молекуле они оказываются в результате реакции (6). Для синтеза мочевины требуется энергия, которая доставляется за счет расщепления АТФ, образующегося при окислительных процессах (см., например, табл. 41 и 42).

Реакция (2) представляет собой альтернативный механизм, с помощью которого аминогруппы аминокислот могут войти в систему, не проходя через стадию свободного аммиака; но в этом случае восстановленный кофермент из реакции (9) должен окислиться каким-либо иным путем, например при участии дыхательной системы.

Атом углерода и два атома азота, которые в конце концов войдут в состав молекулы мочевины, выделены жирным шрифтом.

Ниже приведен другой путь, который начинается от реакции (7) и приводит не к мочевине, а к креатину:

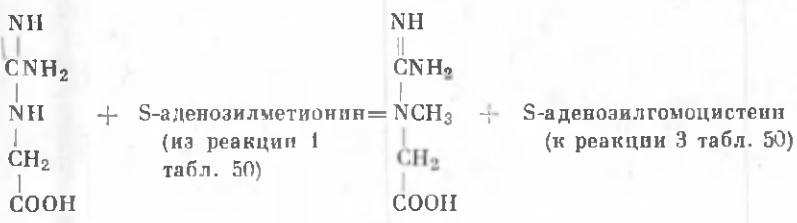
(11) Глицин-амидинотрансфераза (2.6.2.1)



(из реакции 7 табл. 54) (к реакции 5 табл. 54)

L-аргинин Глицин L-орнитин Гуанидинацетат

(12) Гуанидинацетат-метилтрансфераза (2.1.1.2)



Гуанидинацетат

Таблица 55

СИНТЕЗ ФОСФАТИДА

(1) Глицеролкиназа (2.7.1.30)

Глицерол + АТФ = L-глицеро-3-фосфат + АДФ

(2) Глицерофосфат-ацилтрансфераза (2.3.1.15)

L-глицеро-3-фосфат + 2 Ацил-КоА = L-1, 2-диглицерид-3-фосфат + 2КоА

(3) Фосфатидатфосфатаза (3.1.3.4)

L-1, 2-диглицерид-3-фосфат + H_2O = L-1, 2-диглицерид + Фосфат

(к реакции 8 табл. 55)

(4) Холинкиназа (2.7.1.32)

Холин + АТФ = Холинфосфат + АДФ

(5) Нуклеозидмонофосфаткиназа (2.7.4.4)

ЦМФ + АТФ = ЦДФ + АДФ

(6) Нуклеозиддифосфаткиназа (2.7.4.6)

ЦДФ + АТФ = ЦТФ + АДФ

(7) Холинфосфат-цитидилилтрансфераза (2.7.7.15)

Холинфосфат + ЦТФ = ЦДФ-холин + Пирофосфат

(8) Холинфосфотрансфераза (2.7.8.2

L-1, 2-диглицерид + ЦДФ-холин = Лецитин + ЦМФ

Сумма реакций:

Холин + Глицерол + 2Ацил-КоА + 4АТФ + H_2O =

= Лецитин + 2КоА + 4АДФ + Фосфат + Пирофосфат

Примечание. Мы пришли для диглицерида обозначение L-1,2, а не D-2,3 (которое соответствует той же конфигурации), чтобы показать, что в ходе процесса не происходит оптической инверсии. В литературе встречается также неправильное обозначение D-1,2-, которое возникло в результате неверного истолкования обозначения D-αβ- (это последнее неоднозначно, так как через α обозначается как положение 1, так и положение 3).

Таблица 56

СИНТЕЗ И РАСЩЕПЛЕНИЕ НАД И НАДФ

а) *Синтез*

(1) Рибокиназа (2.7.1.15)

D-рибоза + АТФ = D-рибозо-5-фосфат + АДФ

(2) Рибозофосфат-пирофосфокиназа (2.7.6.1)

D-рибозо-5-фосфат + АТФ = 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат + АМФ

(3) Никотинат-фосфорибозилтрансфераза (2.4.2.11)

Никотинат + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат = Никотинатрибонуклеотид +

+ Пирофосфат

Продолжение табл. 56

(4) НМН-аденилилтрансфераза (2.7.7.1)

Никотинатрибонуклеотид + АТФ = Дезамидо-НАД + Пирофосфат

(5) НАД-синтетаза (6.3.5.1)

Дезамидо-НАД + АТФ + L-глутамин + H_2O =
= НАД + АМФ + Пирофосфат + L-глутамат

(6) НАД-киназа (2.7.1.23)

НАД + АТФ = НАДФ + АДФ

В некоторых животных тканях вместо реакций (3—5) могут протекать следующие реакции:

(7) Никотинамид-фосфорибозилтрансфераза (2.4.2.12)

Никотинамид + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат = НМН + Пирофосфат

(8) НМН-аденилилтрансфераза (2.7.7.1)

НМН + АТФ = НАД + Пирофосфат

б) Расщепление

(9) Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)

НАДФ + H_2O = НАД + Фосфат

(10) Нуклеотид-пирофосфатаза (3.6.1.9)

НАД + H_2O = НМН + АМФ

(11) 5-нуклеотидаза (3.1.3.5)

НМН + H_2O = Никотинамиднуклеозид + Фосфат

(12) Нуклеозидаза (3.2.2.1)

Никотинамиднуклеозид + H_2O = Никотинамид + D-рибоза

Вместо реакций (10—12) могут также протекать следующие:

(13) НАД-нуклеозидаза (3.2.2.5)

НАД + H_2O = Никотинамид + АДФ-рибоза

(14) Нуклеотид-пирофосфатаза (3.6.1.9)

АДФ-рибоза + H_2O = АМФ + D-рибозо-5-фосфат

(15) Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)

D-рибозо-5-фосфат + H_2O = D-рибоза + Фосфат

Сумма реакций (1—6):

Рибоза + Никотинат + 5АТФ + Глутамин =
= НАДФ + 2АДФ + 2АМФ + 3Пирофосфат + Глутамат

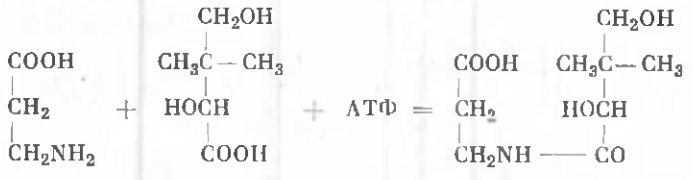
Сумма реакций (9—12) или (9 + 13—15):

НАДФ + 4H_2O = Никотинамид + Рибоза + 2Фосфат + АМФ

Таблица 57

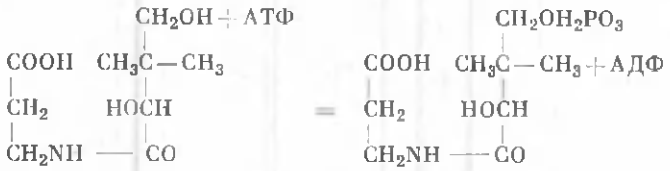
СИНТЕЗ КОФЕРМЕНТА А [339]

(1) Пантотенатсинтетаза (6.3.2.1)



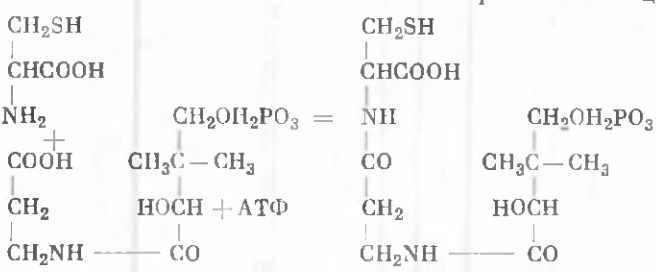
β-Аланин L-пантоат L-пантотенат

(2) Пантотенаткиназа (2.7.1.33)



L-пантотенат 4′-фосфопантотенат

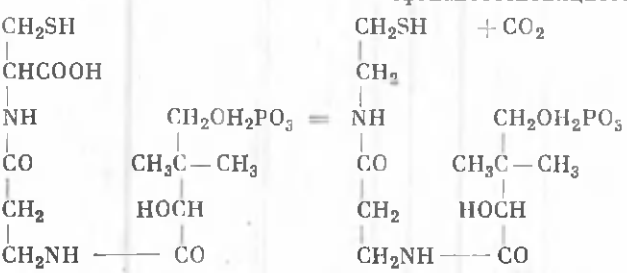
(3) Фосфопантотеноилцистеин-синтетаза (6.3.2.5)



L-цистеин + 4′-фосфо-L-пантотенат 4′-фосфо-L-пантотеноил-L-цистеин

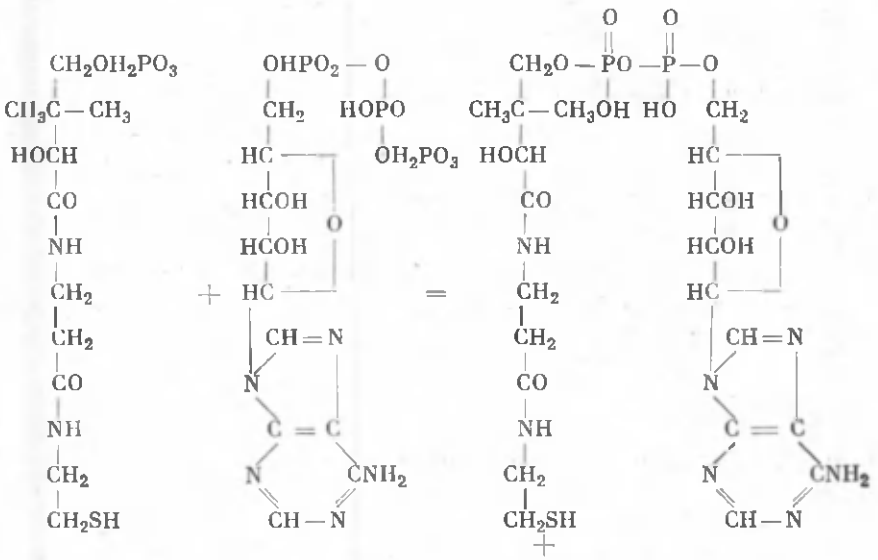
Фермент бактерий использует ЦТФ вместо АТФ; фермент из тканей животных активен как в присутствии АТФ, так и в присутствии ЦТФ.

(4) Фосфопантотеноилцистеин-декарбоксилаза (4.1.1.c)



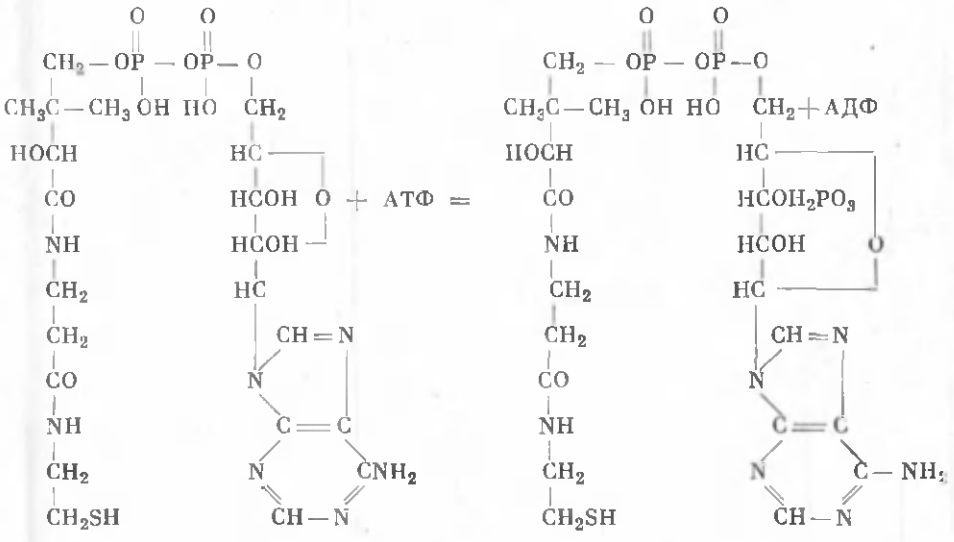
4′-фосфо-L-пантотеноил-L-цистеин Пантетеин-4′-фосфат

(5) **Пантетеинфосфат-аденилилтрансфераза (2.7.7.3)**



Пантетеин-4′-фосфат АТФ Пирофосфат Дефосфо-КоА

(6) **Дефосфо-КоА-киназа (2.7.1.24)**



Дефосфо-КоА КоА

Сумма реакций:

Цистеин + Пантоат + β-Аланин + 5АТФ =

= Кофермент А + 3АДФ + АМФ + 2Пирофосфат + Фосфат + CO_2

Таблица 58

СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДА

а) *Синтез пуринов* [353]

(1) Рибокиназа (2.7.1.15)

D-рибоза + АТФ = D-рибозо-5-фосфат + АДФ

(2) Рибозофосфат-пирофосфокиназа (2.7.6.1)

D-рибозо-5-фосфат + АТФ = 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат + АМФ

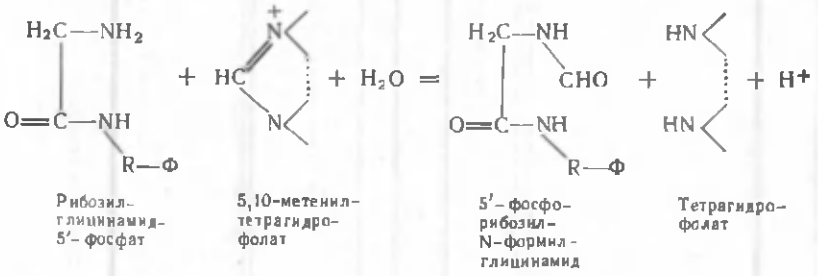
(3) Амидофосфорибозилтрансфераза (2.4.2.14)

L-глутамин + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат + H_2O = L-глутамат + β-D-рибозиламин-5-фосфат (NH_2—R—Ф) + Пирофосфат
(через —R—Ф обозначен 5-фосфо-β-D-рибозил)

(4) Фосфорибозилглицинамид-синтетаза (6.3.1.3)

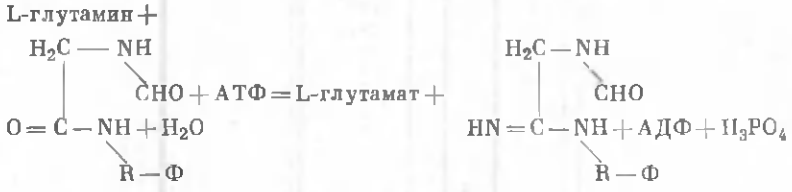
$NH_2CH_2COOH + NH_2—R—Ф + АТФ = NH_2CH_2CONH—R—Ф + АДФ + H_3PO_4$
Глицин — Рибозилглицинамид-5′-фосфат

(5) Фосфорибозилглицинамид-формилтрансфераза (2.1.2.2)



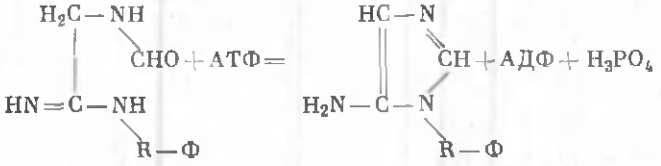
Рибозилглицинамид-5′-фосфат — 5,10-метенилтетрагидрофолат — 5′-фосфорибозил-N-формилглицинамид — Тетрагидрофолат

(6) Фосфорибозилформилглицинамидин — синтетаза (6.3.5.3)



5′-фосфорибозил-N-формилглицинамид — 5′-фосфорибозилформилглицинамидин

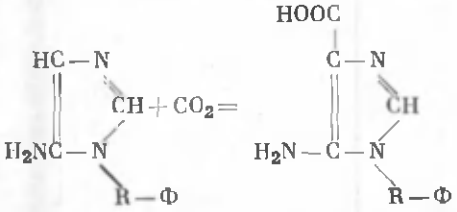
(7) Фосфорибозил-аминоимидазол — синтетаза (6.3.3.1)



5′-фосфорибозилформилглицинамидин — 5′-фосфорибозил-5-аминоимидазол

Продолжение табл. 58

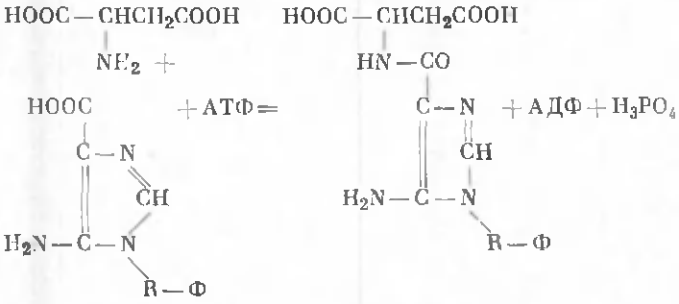
(8) Фосфорибозиламиноимидазол-карбоксилаза (4.1.1.21)



5′-фосфорибозил-5-аминоимидазол

5′-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоновая кислота

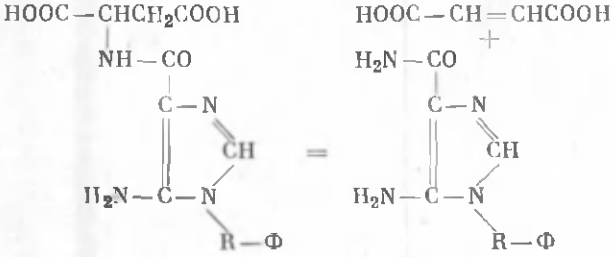
(9) Фосфорибозил-аминоимидазолсукцинокарбоксамид — синтетаза (6.3.2.6)



L-аспартат + 5′-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоновая кислота

5′-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазол

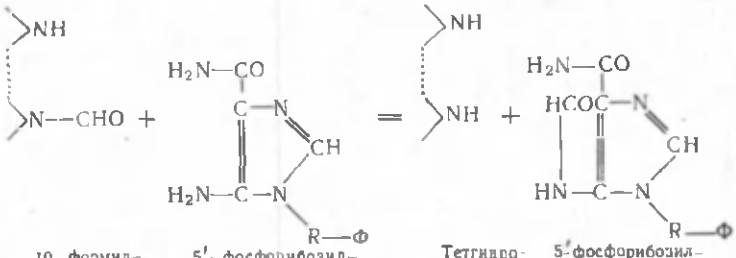
(10) Аденилосукцинат-лиаза (4.3.2.2)



5′фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазол

5′-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксамид + Фумарат

(11) Фосфорибозил-аминоимидазолкарбоксамид-формилтрансфераза (2.1.2.3)



10-формилтетратидрофолат

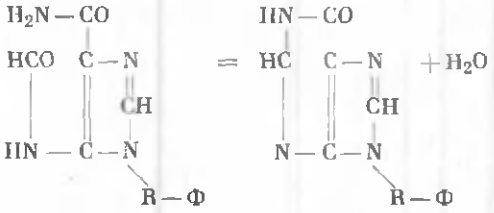
5′-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксамид

Тетгидрофолат

5′-фосфорибозил-5-формамидс-4-имидазолкарбоксамид

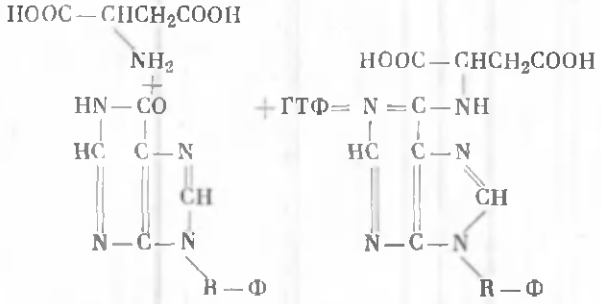
Продолжение табл. 58

(12) ИМФ-циклогидролаза (3.5.4.10)



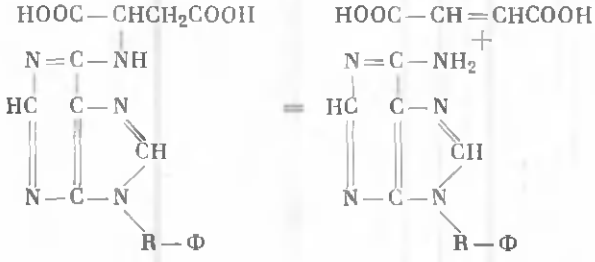
5′-фосфорибозил-5-формамидо-4-имидазолкарбоксамид ИМФ

(13) Аденилосукцинат-синтетаза (6.3.4.4)



ИМФ + L-аспартат Аденилосукцинат

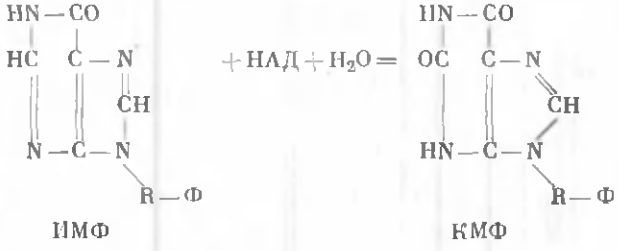
(14) Аденилосукцинат-лиаза (4.3.2.2)



Аденилосукцинат Фумарат + АМФ

или, вместо реакций (13) и (14),

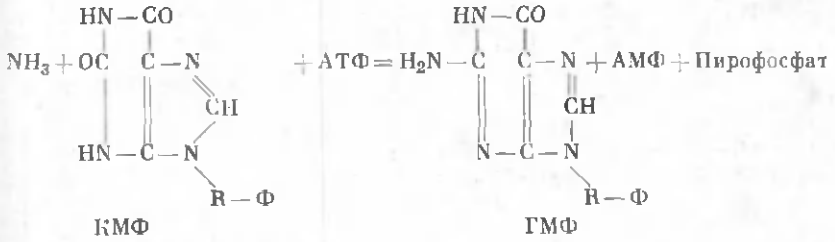
(15) ИМФ-дегидрогеназа (1.2.1.14)



ИМФ КМФ

Продолжение табл. 58

(16) ГМФ-синтетаза (6.3.4.1)



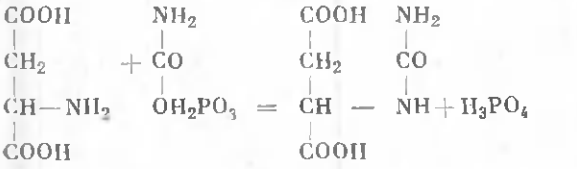
б) *Синтез пиримидинов* [2202]

(17) Карбаматкиназа (2.7.2.a) с ацетилглутаматом

$$NH_3 + CO_2 + 2АТФ + H_2O = H_2NCO-O-H_2PO_3 + 2АДФ + H_3PO_4$$

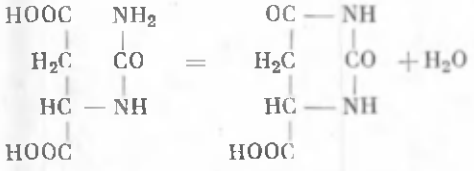
Карбамоилфосфат

(18) Аспартат-карбамоилтрансфераза (2.1.3.2)



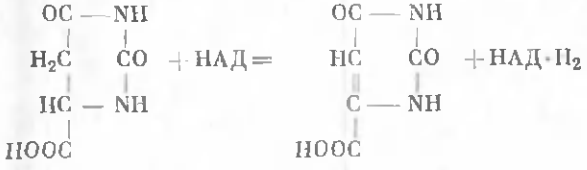
L-аспартат Карбамоил-фосфат N-карбамоил-L-аспартат

(19) Дигидрооротаза (3.5.2.3)



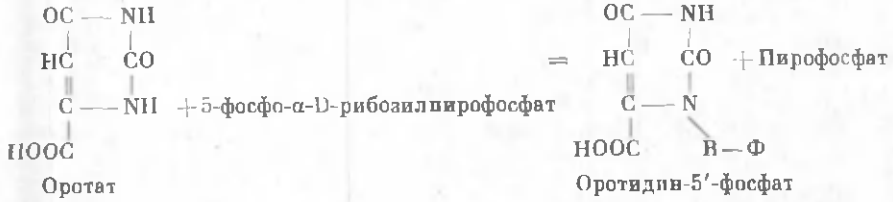
N-карбамоил-L-аспартат L-4,5-дигидро-оротат

(20) *Дигидрооротатдегидрогеназа* (1.3.3.1)



L-4,5-дигидро-оротат Оротат

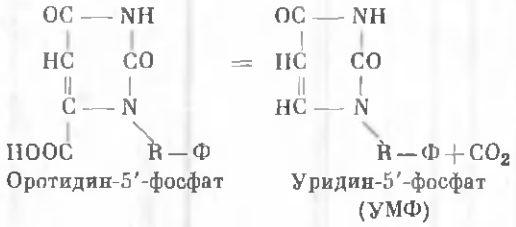
(21) *Оротат-фосфорибозилтрансфераза* (2.4.2.10)



Оротат Оротидин-5′-фосфат

Продолжение табл. 58

(22) Оротидин-5′-фосфат — декарбоксилаза (4.1.1.23)



(23) Нуклеозидмонофосфаткиназа (2.7.4.4)

$$УМФ + АТФ = УДФ + АДФ$$

(24) Нуклеозиддифосфаткиназа (2.7.4.6)

$$УДФ + АТФ = УТФ + АДФ$$

(25) ЦТФ-синтетаза (6.3.4.2)

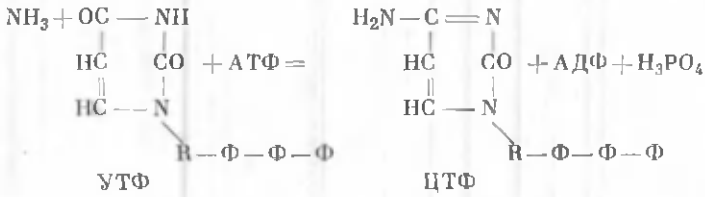


Таблица 59

ОБРАЗОВАНИЕ САХАРОЗЫ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Раздел «а»

В освещенных хлоропластах запас НАДФ·H_2 и АТФ поддерживается за счет фотохимических реакций:

(1)

$$НАДФ + H_2O \xrightarrow{свет} НАДФ \cdot H_2 + {}^1/_2O_2$$

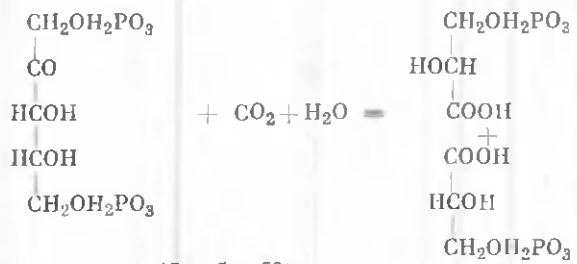
(2)

$$АДФ + H_3PO_4 \xrightarrow{свет} АТФ + H_2O$$

Затем ферменты, присутствующие в цитоплазме, осуществляют реакции, приведенные в разделах «б» и «в». Эти реакции могут протекать и в темноте, если к системе добавлять НАДФ·H_2 и АТФ.

Раздел «б»

(3) Рибулозодифосфат-карбоксилаза (4.1.1.1)

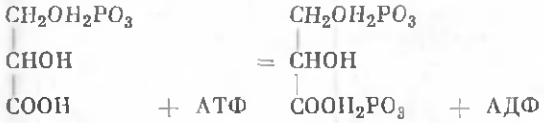


(из реакции 15 табл. 59)

D-рибулозо-1,5-дифосфат — 2,3-фосфо-D-глицерат

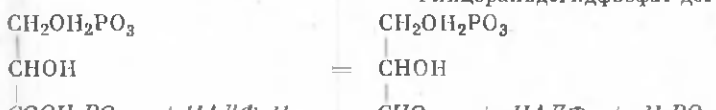
Продолжение табл. 59

(4) Фосфоглицераткиназа (2.7.2.3)



D-3-фосфоглицерат — 1,3-дифосфо-D-глицериновая кислота

(5) Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.13)



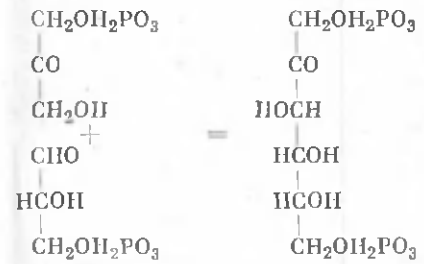
1,3-дифосфо-D-глицериновая кислота — D-глицеральдегид-3-фосфат

(6) Триозофосфат-изомераза (5.3.1.1)



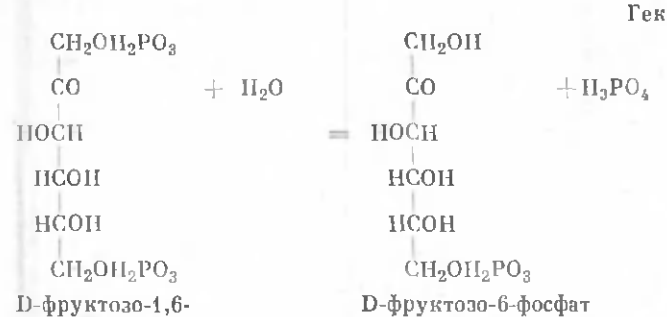
D-глицеральдегид-3-фосфат — Диоксиацетонфосфат

(7) Альдолаза (4.1.2.b)



(из реакции 5 табл. 59) Диоксиацетонфосфат + D-глицеральдегид-3-фосфат — D-фруктозо-1,6-дифосфат

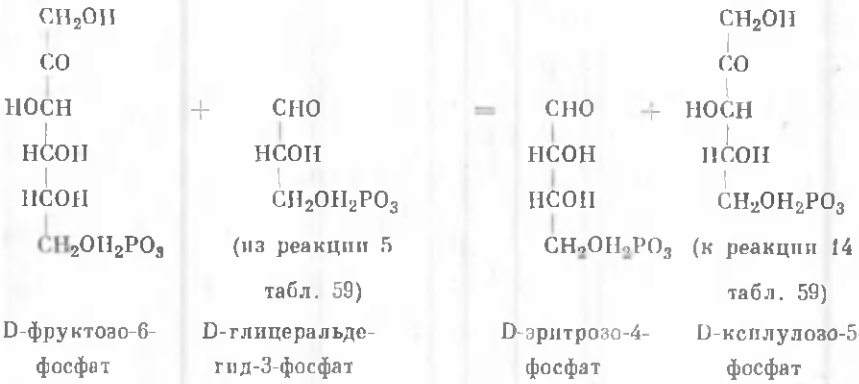
(8) Гексозодифосфатаза (3.1.3.11)



D-фруктозо-1,6-дифосфат — D-фруктозо-6-фосфат

Продолжение табл. 59

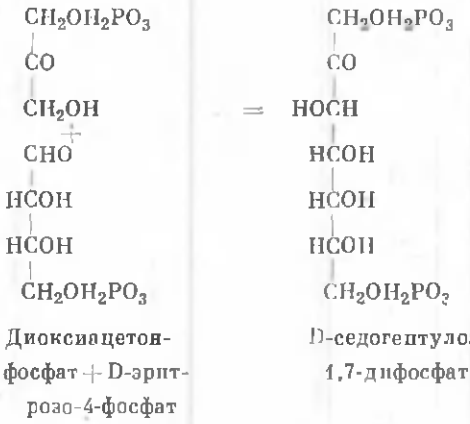
(9) Транскетолаза (2.2.1.1)



D-фруктозо-6-фосфат + D-глицеральдегид-3-фосфат (из реакции 5 табл. 59) = D-эритрозо-4-фосфат + D-ксилулозо-5-фосфат (к реакции 14 табл. 59)

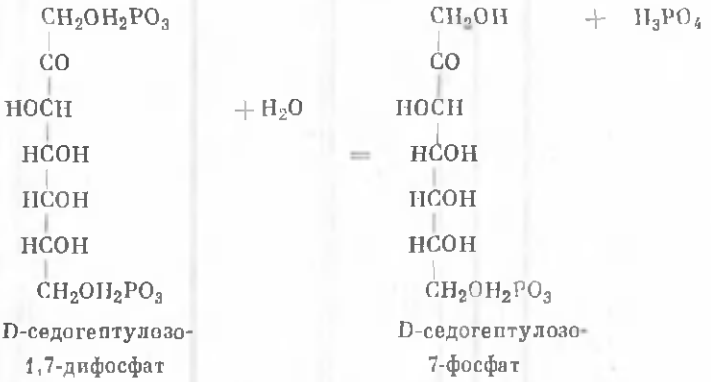
(10) Альдолаза (4.1.2.b)

(из реакции 6 табл. 59)



Диоксиацетонфосфат + D-эритрозо-4-фосфат = D-седогептулозо-1,7-дифосфат

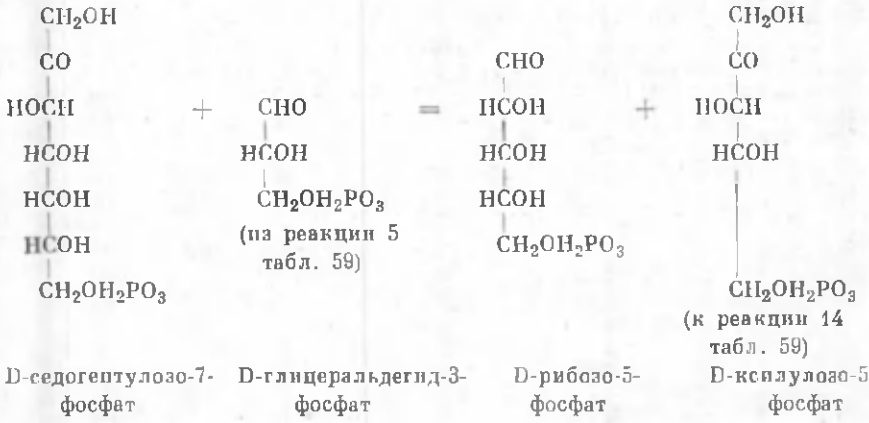
(11) Кислая фосфатаза (3.1.3.2)



D-седогептулозо-1,7-дифосфат + H_2O = D-седогептулозо-7-фосфат + H_3PO_4

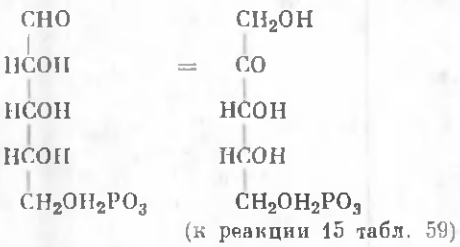
Продолжение табл. 59

(12) Транскетолаза (2.2.1.1



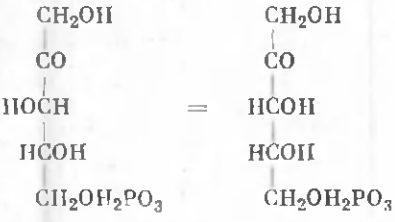
D-седогептулозо-7-фосфат | D-глицеральдегид-3-фосфат | D-рибозо-5-фосфат | D-ксилулозо-5-фосфат

(13) Рибозофосфат-изомераза (5.3.1.6)



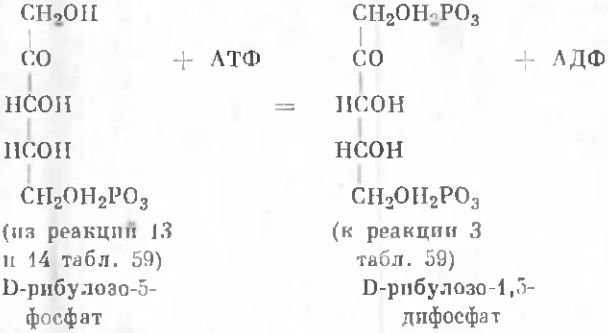
D-рибозо-5-фосфат | D-рибулозо-5-фосфат

(14) Рибулозофосфат-3-эпимераза (5.1.3.1)



D-ксилулозо-5-фосфат | D-рибулозо-5-фосфат

(15) Фосфорибулокиназа (2.7.1.19)



D-рибулозо-5-фосфат | D-рибулозо-1,5-дифосфат

Продолжение табл. 59

Сумма реакций (1—15):

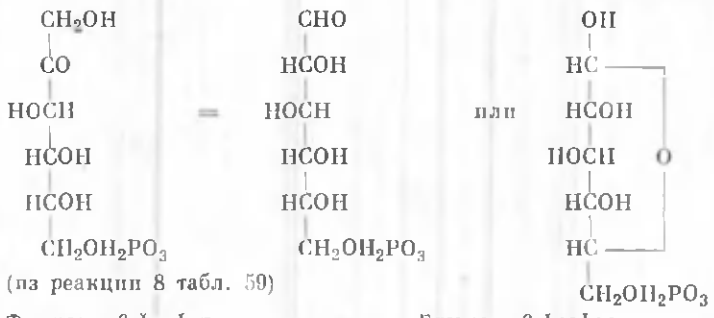
$$6CO_2 + H_3PO_4 + 5H_2O = \text{Фруктозо-6-фосфат} + 6O_2$$

Примечание. Необходимо иметь в виду, что для образования одной молекулы фруктозо-6-фосфата реакции (9—13) должны повториться 2 раза, реакции (7) и (8)—3 раза, реакция (14)—4 раза, реакция (6)—5 раз, реакции (3) и (15)—6 раз, реакции (1), (4) и (5)—12 раз и реакция (2)—18 раз. Таким образом, для синтеза одной молекулы фруктозо-6-фосфата требуется 12 молекул НАДФ·H_2 и 18 молекул АТФ.

Раздел «в»

Фруктозофосфат может быть превращен в сахарозу следующим образом:

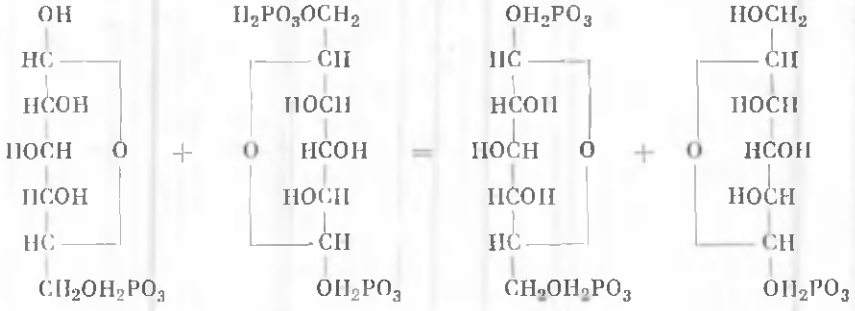
(16) Глюкозофосфат-изомераза (5.3.1.9)



(из реакции 8 табл. 59)

Фруктозо-6-фосфат — Глюкозо-6-фосфат

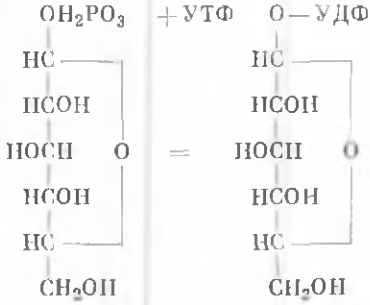
(17) Фосфоглюкомутаза (2.7.5.1)



(к реакции 18 табл. 59)

Глюкозо-6-фосфат — Глюкозо-1,6-дифосфат — Глюкозо-1,6-дифосфат — Глюкозо-1-фосфат

(18) Глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза (2.7.7.9)

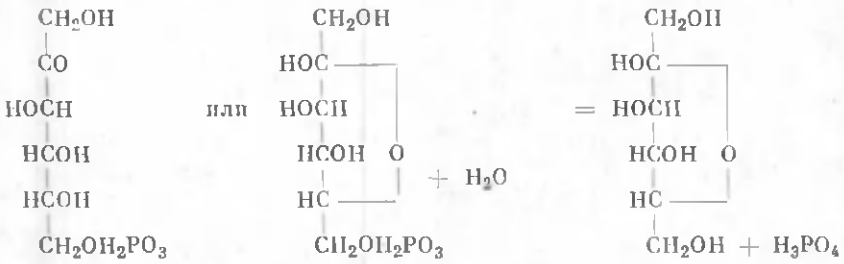


(к реакции 20 табл. 59)

Глюкозо-1-фосфат — УДФ-глюкоза

Продолжение табл. 59

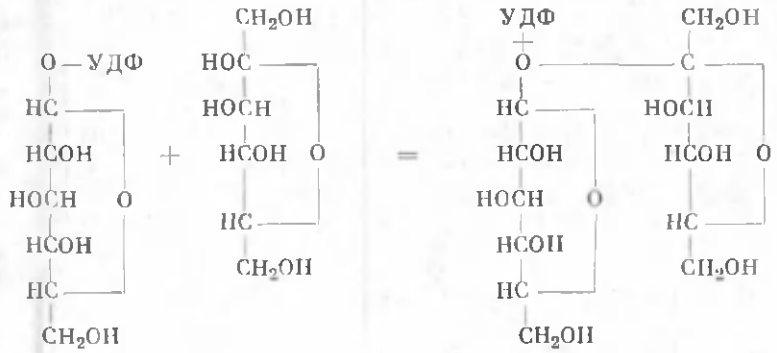
(19) Кислая фосфатаза (3.1.3.2)



(из реакции 8 табл. 59)

Фруктозо-6-фосфат — Фруктоза

(20) УДФ-глюкоза-фруктоза — глюкозилтрансфераза (2.4.1.13)



УДФ-глюкоза — Фруктоза — Сахароза

(21) Нуклеозиддифосфаткиназа (2.7.4.6)

$$УДФ + АТФ = УТФ + АДФ$$

(22) Неорганическая пирофосфатаза (3.6.1.1)

$$Пирофосфат + H_2O = 2H_3PO_4$$

Сумма реакций:

$$2\text{-фруктозо-6-фосфат} + АТФ + 2H_2O = Сахароза + АДФ + 3H_3PO_4$$

Суммарная реакция образования сахарозы при фотосинтезе:

$$12CO_2 + 11H_2O = Сахароза + 12O_2$$

Примечание. Необходимо иметь в виду, что реакции раздела «б» должны быть повторены 2 раза и прибавлены к реакциям разделов «а» и «в», так как в разделе «в» используются две молекулы фруктозофосфата. Таким образом, для синтеза одной молекулы сахарозы требуется 24 молекулы НАДФ·H_2 и 37 молекул АТФ.

ГЛАВА XIII

БИОЛОГИЯ ФЕРМЕНТОВ

Во всех предыдущих главах этой книги мы говорили о ферментах как о химических катализаторах или просто как о химических веществах. Действительно, «поразительное и специфичное каталитическое действие ферментов», как назвал его физикохимик Хамметт [988], во многих отношениях представляет исключительный интерес. И все же главное, чем интересны для нас ферменты,— настолько главное, что это отодвигает все другое на задний план,— заключается в том, что ферменты теснейшим образом связаны с жизнью. Из всех многочисленных химических процессов, протекающих в живой клетке,— тех процессов, от которых зависит ее жизнь,— едва ли имеется хотя бы один, который не был бы связан с ферментативным катализом: без ферментов не может быть жизни. Эту главу, которую мы назвали «Биология ферментов», мы посвятим рассмотрению ферментов под углом зрения их отношения к живой клетке и к самой жизни.

Ферменты как основа жизни

Для поддержания жизни живое вещество должно обладать механизмом, с помощью которого энергия, освобождающаяся в результате таких химических реакций, как окисление пищевых веществ, могла бы использоваться в реакциях и процессах, протекающих с потреблением энергии, вместо того чтобы рассеиваться в виде тепла. Энергия необходима для биосинтеза, когда новое живое вещество образуется в процессах роста и воспроизведения, для осмотической работы, связанной с поглощением и секрецией, для механической работы при движении, особенно развитом у высших животных, а также для таких специальных процессов, как биолюминесценция у светляков или возникновение разрядов в электрических органах рыб.

Живое вещество содержит ряд нестабильных веществ, от которых зависит его существование. Эти вещества непрерывно разрушаются и ресинтезируются, так что необходима непрерывная доставка энергии уже для одного поддержания системы в стационарном состоянии. Даже в общем стабильные вещества, такие, как белки, расщепляются внутри клетки вследствие присутствия в ней ферментов автолиза. Для возмещения этих потерь также требуется энергия. Если прекращается доставка энергии, то вся система распадается в результате разрушения нестабильных незаменимых веществ и превалирования процессов ферментативного распада (что приводит к автолизу клетки). Когда этот процесс заходит достаточно далеко, он становится необратимым, так как синтетические реакции не могут возобновиться в отсутствие незаменимых катализаторов [1]. Это и происходит при гибели клетки.

Наиболее существенные особенности ферментной системы, связывающей процессы, дающие энергию, с процессами, ее потребляющими, состоят в сле-

[1] Еще до разрушения собственно катализаторов происходит разрушение многомолекулярных клеточных структур, с которыми пространственно связаны ферменты.— *Прим. ред.*

дующем. В результате серии ферментативных преобразований вещество, способное служить источником энергии, переходит вначале в такую форму, которая затем может претерпеть распад, связанный с образованием богатой энергией, или макроэргической, связи; стандартная свободная энергия гидролиза такой связи равна приблизительно 10 000 *кал/моль* [1]. К числу «богатых энергией» относятся связь кислотного ангидрида (ацилфосфата или пирофосфата), фосфоамидная связь и тиоэфирная связь. Примерами же соответствующих процессов могут служить образование дифосфоглицерата при окислении глицеральдегидфосфата (ацилфосфатная связь), образование ацетил- или сукцинилгидролипоата при окислении пирувата или 2-оксоглутарата (тиоэфирная связь) и процесс окислительного фосфорилирования (с образованием пирофосфатных связей в результате реакций, пока еще не вполне ясных).

Благодаря использованию ряда экспериментальных подходов отдельные компоненты системы, осуществляющей окислительное фосфорилирование в митохондриях, теперь уже частично выявлены. Из разрушенных митохондрий можно получить частицы, которые содержат активные окислительные системы, но не способны осуществить фосфорилирование АДФ (см. стр. 474). Способность к фосфорилированию может быть восстановлена у некоторых препаратов в результате добавления растворимых «факторов сопряжения». Рэккер и др. [2068, 2124] показали, что разрушенные механическим путем митохондрии можно разделить центрифугированием на две фракции: фракцию частиц и растворимый «фактор сопряжения». Этот фактор они частично очистили и нашли, что он идентичен АТФ-азе, стимулируемой динитрофенолом, лабильной при охлаждении и освобождающейся из митохондрий при их разрушении. Рэккер и его сотрудники высказали предположение, что данный фермент также катализирует некоторые этапы в процессе сопряженного фосфорилирования. Позже [2157] они показали, что к фосфорилированию АДФ имеет отношение и второй фактор, а для осуществления изотопного обмена между меченым неорганическим фосфатом и АТФ в субмитохондриальных частицах, обработанных трипсином, требуется третий фактор. По всей вероятности, и этот третий фактор является частью системы фосфорилирования, хотя окончательно это еще не доказано.

Группа Ленинджера также исследовала факторы, выделенные из митохондрий, но эти факторы были получены в опытах несколько иного типа (см. [1944]). Митохондриям давали набухнуть под действием глутатиона (или некоторых других веществ). В соответствующих условиях АТФ вызывает сокращение таких разбухших митохондрий. Для сокращения митохондрий, набухших в присутствии глутатиона, требуется присутствие определенных растворимых веществ («С-факторов»), получаемых из самих митохондрий; эти факторы стимулируют также сопряженное фосфорилирование в субмитохондриальных частицах, обработанных дигитонином. Из таких растворимых препаратов при хроматографировании на ДЭАЭ-целлюлозе можно получить три различных С-фактора; один из них был идентифицирован как глутатионпероксидаза (1.11.1.а), а второй — как каталаза (1.11.1.6). Третий фактор, по-видимому низкомолекулярный и термолабильный, пока еще не идентифицирован. Действие этих ферментных факторов явно не сводится к простому удалению токсических количеств H_2O_2, образующихся в про-

[1] До недавнего времени считали, что стандартная свободная энергия гидролиза АТФ до АДФ и фосфата равна приблизительно —12 000 *кал/моль*. Действительное значение ее зависит от pH. Недавно с помощью достоверных определений получены следующие величины: —7700 *кал/моль* при pH 7 и 30° [2995], —8900 *кал/моль* при pH 7,5 и 25° [369] и —9300 *кал/моль* при pH 7,5 и 37° [210]. В присутствии солей магния стандартная свободная энергия гидролиза $MgATФ^{2-}$ до $MgAДФ^{-}$ равна —7000 *кал/моль* при pH 7,0 и 37° [210]. Свободная энергия гидролиза тиоэфирной связи ацетил-КоА при pH 7,0 и 25° равна —8200 *кал/моль* [369].

цессе окисления субстратов, так как добавленная перекись водорода не стимулирует набухания и не тормозит связанное с АТФ сокращение.

Другие данные говорят о том, что в осуществлении этих процессов могут принимать участие и липиды. Войтчак и Ленинджер показали, что при спонтанном набухании митохондрий, а также при набухании, индуцированном солями кальция или тироксином, внутри митохондрий образуется термостабильный «разобщающий агент». Это фактор липоидной природы, и, вероятно, он подвергается окислению при сокращении набухшей митохондрии, которое происходит под действием АТФ [2892]. В процессе индуцированного глутатионом набухания митохондрий или когда митохондрии инкубируются в аэробных условиях в присутствии Fe^{2+} и аскорбата [1120], образуются перекиси — продукты окисления липидов; пероксидазы, которые действуют как факторы сопряжения, могут использовать эти перекиси в качестве своих субстратов.

Действие разобщающих агентов, таких, как динитрофенол, который тормозит фосфорилирование, не влияя на дыхание, изучалось весьма широко. Многие из этих работ подтверждают идею о том, что динитрофенол может выступать вместо неорганического фосфата и вызывать расщепление какого-то богатого энергией предшественника, в образовании которого неорганический фосфат не участвовал.

Был предложен ряд гипотетических схем окислительного фосфорилирования, которые согласуются с известными фактами; эти схемы приводятся в обзоре Ленинджера [1534]. Борст и Слейтер [296] полагают, что их собственные исследования, посвященные изучению действия динитрофенола, укладываются в следующую схему:

$$AH_2 + B + I \rightleftarrows BH_2 + A \sim I, \qquad \text{(XIII.1)}$$

$$A \sim I + X \rightleftarrows A + X \sim I, \qquad \text{(XIII.2)}$$

$$X \sim I + Ф_н \rightleftarrows X \sim Ф + I, \qquad \text{(XIII.3)}$$

$$X \sim Ф + АДФ \rightleftarrows X + АТФ, \qquad \text{(XIII.4)}$$

где A и B — компоненты дыхательной цепи, X и I — гипотетические промежуточные соединения.

Согласно схеме Борста и Слейтера, динитрофенол вызывает быстрый гидролиз $X \sim I$, вследствие чего реакции (XIII.3) и (XIII.4) протекать не могут. Рэккер [2157] постулирует, что реакция (XIII.4) катализируется фактором сопряжения АТФ-азной природы; другие факторы связаны, по-видимому, с более ранними стадиями процесса. Каковы бы ни были детали процесса или природа веществ X и I, можно считать установленным, что в результате окисления образуется лабильный промежуточный продукт, который затем расщепляется неорганическим фосфатом с образованием богатого энергией фосфата, реагирующего с АДФ. Действительно, было показано, что в ходе этого процесса образуются два лабильных фосфорсодержащих вещества, а именно фосфорилированная форма НАД [2981] и фосфорилированная форма гистидина [2975].

Химическая энергия связей, образовавшихся в каком-либо из рассмотренных выше процессов, может быть временно депонирована (особенно в мышце, где в любой момент может внезапно возникнуть большая потребность в энергии для осуществления механической работы) или же она может быть использована немедленно в каком-либо из процессов биосинтеза. Энергия сохраняется в двух главных формах — в пирофосфатных связях нуклеозидтрифосфатов (особенно АТФ) или в фосфоамидных связях креатинфосфата и аргининфосфата. Если в результате реакции образовался ацилфосфат, то лабильный фосфат переносится киназой на АДФ с образованием

АТФ или следующей киназой с АТФ на креатин. Если исходное, богатое энергией соединение представляет собой тиоловый эфир, то энергия тиоэфирной связи должна быть трансформирована в энергию фосфатной связи. *Такая трансформация может быть осуществлена под действием* синтетазы после переноса ацильного остатка с одной тиоловой группы на другую (реакции 8, 13 и 14 табл. 42). У бактерий такая трансформация может быть достигнута (в случае окисления пирувата) под действием фосфат-ацетилтрансферазы (2.3.1.8) с образованием ацетилфосфата, который уже затем претерпевает киназную реакцию и дает АТФ.

Количество акцепторов фосфата, способных играть роль депо энергии, *варьирует в различных тканях весьма заметным образом.* Скелетные мышцы отличаются от большинства других тканей тем, что они содержат очень большое количество аденозинфосфата и еще большее количество креатина (у позвоночных) или аргинина (у большинства беспозвоночных). Как креатин-, так и аденозинфосфат имеются и в других тканях, но в значительно меньших количествах. Почти в таких же количествах присутствуют в них и другие нуклеозидтрифосфаты (ГТФ, УТФ и т. д.). Отнюдь не весь креатин, *содержащийся в тканях позвоночных,* присутствует в них в форме креатинфосфата; доля фосфорилированного креатина в различных тканях колеблется очень мало и составляет обычно около 20% [700].

Большинство реакций, протекающих с потреблением энергии, получает эту энергию за счет расщепления АТФ. Существуют два главных механизма, с помощью которых может использоваться энергия АТФ. Благодаря реакциям, катализируемым синтетазами, процесс биосинтеза может быть *непосредственно сопряжен с расщеплением* одной или другой пирофосфатной связи АТФ. Подобный же результат может быть достигнут при одновременном действии киназы и фосфорилазы; киназа катализирует перенос фосфатной группы с АТФ на первый компонент реакции, который затем с помощью фосфорилазы переносится из соединения с фосфатом на второй компонент реакции, так что в результате освобождается ортофосфат. Мышечное сокращение зависит от расщепления АТФ, которое протекает под действием аденозинтрифосфатазы миофибрилл, активируемой ионами кальция; детали механизма, связывающего процесс расщепления АТФ с процессом мышечного сокращения, пока еще не ясны. Показано также, что осмотическая работа (например, при секреции желудочного сока или переносе K^+ сквозь клеточную мембрану), биолюминесценция и возникновение электрических разрядов в электрических органах рыб связаны с расщеплением АТФ.

Все эти процессы направляются и регулируются координированными системами ферментов, многие из которых мы рассмотрели в предыдущей главе. В табл. 41, 42, 44 и 45 приведены важнейшие системы реакций, протекающих с выделением энергии; в табл. 51 и 53—59 представлены схемы различных процессов биосинтеза, в которых эта освобождающаяся энергия потребляется.

Сами катализаторы (ферменты и коферменты), подобно другим компонентам клетки, образуются в процессе биологического синтеза, особенно во время роста. Общие соображения, высказанные выше, приложимы и к этим реакциям синтеза, которые, следовательно, зависят от систем реакций, катализируемых продуктами синтеза. Поскольку ферменты представляют собой белки, механизм их синтеза связан с РНК-матрицей (см. гл. XI); компоненты и белка и матрицы также должны синтезироваться ферментативным путем, а энергия, необходимая для образования большого числа связей, имеющихся в ферментных белках, должна поставляться за счет ферментативных катаболических реакций. Таким образом, вся система в целом является самовоспроизводящейся и даже саморазмножающейся, а это и есть самое главное свойство живого вещества.

Ферменты и структурные компоненты клетки

Хотя системы, состоящие из многих ферментов, нередко вполне хорошо действуют в простых растворах, живую клетку, несомненно, нельзя рассматривать как «мешок с ферментами», в котором ферменты находятся в гомогенном растворе. Живая клетка имеет сложное строение, которое мы в последнее время благодаря электронному микроскопу получили возможность узнать гораздо глубже. В гл. XII мы видели, что определенные ферменты локализуются в определенных внутриклеточных структурах, и потому одним из главных вопросов биологии ферментов является вопрос о характере связи между этими структурами и ферментными системами.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ

Типичная клетка окружена клеточной мембраной, проницаемой только для некоторых веществ; эта мембрана у растений и бактерий укрепляется окружающей пористой клеточной оболочкой, которая определяет форму клетки, но не принимает никакого участия в ее метаболизме. Содержимое клетки обычно подразделяют на цитоплазму и ядро. Цитоплазма не гомогенна, она содержит разного рода частицы: митохондрии, лизосомы, микросомы, «плотные тельца», хромаффиновые гранулы, тельца Ниссля, хлоропласты, секреторные гранулы, аппарат Гольджи, центросомы, миофибриллы, базальные тельца ресничек или жгутиков, «200Å-гранулы» (у бактерий), продукты фагоцитоза, гранулы волютина, зимогеновые гранулы, жировые капельки и гранулы, состоящие из различных продуктов метаболизма, например гликогена, крахмала, серы, поли-3-оксимасляной кислоты, оксалата кальция и т. д.; кроме того, в цитоплазме имеется так называемый эндоплазматический ретикулум. Не все перечисленные частицы встречаются в каждой клетке. Многие из них имеют весьма сложную структуру. Таковы в первую очередь митохондрии животных клеток и хлоропласты растений. Типичная митохондрия представляет собой тельце несколько вытянутой формы длиной около 1 *мк* или более. Стенка ее состоит из характерной двойной мембраны: внутренняя мембрана образует выступы («гребешки», или «кристы»), усеянные многочисленными мелкими непрозрачными частицами 10—15 *ммк* в диаметре. Эндоплазматический ретикулум в некоторых участках обнаруживает подобную структуру с округлыми или уплощенными пузырьками, которые несут многочисленные непрозрачные частицы, или рибосомы, на своих наружных поверхностях [2043]. Этот ретикулум является, по-видимому, продолжением ядерной и клеточной мембран и часто непосредственно примыкает к митохондриям. Было высказано предположение, что микросомы, которые могут быть отделены от тканевых гомогенатов центрифугированием (см. ниже), образуются из эндоплазматического ретикулума, «отпочковываясь» от него в форме пузырьков, несущих рибосомы на своих наружных поверхностях [2044]. Следует отметить, что у бактерий внутриклеточные мембраны обнаружены не были [307].

Аппарат Гольджи состоит из серии параллельных гладких мембран, несколько более толстых, чем мембраны эндоплазматического ретикулума, и часто связанных с пузырьками и вакуолями; все в целом отчасти напоминает как структуру эндоплазматического ретикулума, так и внутреннюю структуру митохондрий [2100].

Структура ядра в делящихся и неделящихся клетках совершенно различна. В неделящейся клетке (исключение составляют бактериальные клетки) ядро окружено двойной мембраной с многочисленными, определенным образом расположенными порами, которые, по-видимому, прикрыты очень тонкой перепонкой. В процессе деления клетки ядерная мембрана

полностью исчезает; позднее она вновь возникает вокруг каждого дочернего ядра. Неделящееся ядро по большей части представляется гомогенным, хотя на электронных микрофотографиях в нем обнаруживается равномерная зернистость. Обычно единственная видимая структура в ядре — это ядрышко (иногда их бывает несколько): плотное тело, которое на электронных микрофотографиях имеет вид сети, содержащей плотно упакованные гранулы. В процессе деления клетки ядрышко значительно уменьшается; в то же время в ядре образуется ряд нитевидных тел — хромосом, которые затем утолщаются и претерпевают ряд превращений, образуя так называемые фигуры митоза (или мейоза). Во время этого процесса пространство, ранее занятое ядром, занимает структура, известная под названием «веретена»; веретено состоит из белковых нитей, к которым прикрепляются хромосомы и с помощью которых они растягиваются в противоположные стороны. Сами хромосомы обладают сложной и высокоорганизованной внутренней структурой — большое число различных генов линейно располагается в них в определенной последовательности.

До недавнего времени считали, что в бактериальной клетке отсутствует большинство структур, встречающихся в животных и растительных клетках, но и здесь с помощью электронного микроскопа были получены данные о внутренней структуре (см., например, [1834, 2485]). В бактериальной клетке всегда имеется определенный ядерный материал; он может быть собран в маленькое сферическое (лишенное оболочки) «ядро», как у многих кокков, или рассеян по всей клетке, как у многих бацилл. В электронном микроскопе бактериальное ядро кажется состоящим из волокнистого материала. Все остальное пространство клетки заполнено зернистой цитоплазмой, частицы которой имеют 10—20 *ммк* в диаметре. Помимо клеточной мембраны, выстилающей оболочку клетки (мембрана протопласта), других мембран в бактериальных клетках не обнаружено.

Таким образом, живая клетка — отнюдь не простой «мешок с ферментами», это высокоорганизованная система, содержащая много сложных видимых структур; более того, центрифугирование живых клеток показывает, что даже прозрачная, освобожденная от частиц цитоплазма может быть разделена по меньшей мере на три слоя различной плотности [1141]. Знакомство с локализацией различных ферментов внутри клетки, с той связью, которая существует между ферментами и этими структурами, очень важно для понимания жизнедеятельности клетки. Простое экстрагирование ферментов из измельченной ткани дает мало сведений об их принадлежности к той или иной внутриклеточной структуре.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКЕ

Вопрос о внутриклеточной локализации ферментов исследуется двумя основными способами: а) микрогистохимическими методами и б) разделением полученного при разрушении клеток материала на отдельные фракции, т. е. дифференциальным центрифугированием.

Гистохимические методы ведут свое начало от обычной методики окрашивания препаратов, применяемой в классической гистологии, поскольку они основаны на микроскопическом наблюдении над окрашенными тканевыми препаратами, в которых под действием ферментов происходит освобождение красящего вещества. При этом необходимо, конечно, иметь уверенность в том, что появившаяся окраска остается там, где она первоначально появилась, и что в результате диффузии не окрашиваются другие структуры. Чрезвычайно трудно создать удовлетворительные условия, особенно если ткань фиксируется обычными методами, которые разрушают большинство ферментов и, несомненно, могут вызывать перераспределение ферментов внутри клетки вследствие разрушения отдельных клеточных

структур. Поэтому гистохимические методы пригодны для изучения лишь небольшого числа ферментов, в частности, например, для обнаружения фосфатаз [1138, 2064].

Эти методы оказались, однако, удобными для определения локализации неферментных компонентов клетки, таких, как жиры и нуклеиновые кислоты. В последнем случае ферменты могут быть использованы как специфические реагенты в сочетании с микроскопией в ультрафиолетовом свете [538]. Нуклеиновые кислоты очень интенсивно поглощают ультрафиолетовые лучи с длиной волны около 260 *ммк*. Ртутная лампа дает излучение с интенсивной полосой примерно той же длины волны; эту полосу можно выделить при помощи монохроматора и использовать в качестве источника света при микроскопии тканевых срезов для локализации нуклеиновых кислот. Таким образом, с помощью фотометрических методов можно грубо определить содержание нуклеиновых кислот в различных частях клетки. Обработка тканевого среза рибонуклеазой, не содержащей пептидазы, приводит к специфическому извлечению РНК. Сравнение микрофотографий обработанных и необработанных срезов показывает, в какой мере поглощение зависит от присутствия РНК. Подобные же эксперименты с дезоксирибонуклеазой позволяют определить локализацию ДНК. Таким путем было показано, что ДНК локализована в хромосомах, а в покоящемся ядрышке содержатся и ДНК и РНК.

Ряд внутриклеточных структур можно разделить в физиологических условиях, подвергнув центрифугированию целые клетки, суспендированные в среде с определенным градиентом плотности. В такой среде клетки занимают равновесное положение и содержимое их (у амебы) делится на девять различных слоев. Если этот процесс не зашел слишком далеко, то он полностью обратим и клетка не повреждается. Достаточно большую клетку можно затем (после охлаждения) извлечь, разделить ее с помощью микроманипулятора на две части и определить в них соответствующими микрометодами количество каждого фермента. Разные клетки делят при этом не совсем одинаково и распределение данного фермента между двумя половинками сравнивают с распределением различных компонентов клетки. О результатах такого рода исследований сообщает Холтер [1141]. Обнаружено, например, что сукцинатдегидрогеназа локализуется в митохондриях, тогда как дипептидаза распределяется по клетке равномерно.

Почти все имеющиеся в нашем распоряжении сведения о внутриклеточной локализации ферментов получены методом дифференциального центрифугирования. Если суспензию клеток подвергнуть центрифугированию при очень высоких скоростях, то можно разрушить клеточную мембрану, не нарушив при этом целостности ядра и цитоплазматических частиц. Различные структурные компоненты такого гомогената оседают затем в центрифуге при различных скоростях (прежде всего вследствие различий в размере; табл. 60) и благодаря этому могут быть разделены. Ресуспендируя полученные осадки и вновь центрифугируя их, можно в конечном счете получить несколько довольно гомогенных фракций. Важное значение имеют также различия в плотности соответствующих структур, так что для разделения фракций можно применять и центрифугирование в градиенте плотности. Эти фракции получают в достаточном количестве и присутствующие в них ферменты определяют обычными методами.

Для того чтобы получить неповрежденные препараты, гомогенизацию ткани нужно проводить в специальной среде. Применение растворов сахарозы дает возможность получать препараты ядер и митохондрий, которые кажутся нормальными под микроскопом и обладают высокой ферментативной активностью. Первоначально для этой цели использовали гипертонический раствор сахарозы (0,88 *М*), поскольку было обнаружено, что он позволяет наилучшим образом сохранить морфологические характери-

стики клеточных компонентов; позднее, однако, нашли, что многие ферменты митохондрий лучше сохраняются в изотоническом растворе сахарозы (0,25 *М* для тканей млекопитающих).

Таблица 60

ПРИБЛИЗИТЕЛЬНЫЕ ДИАМЕТРЫ РАЗЛИЧНЫХ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ГОМОГЕНАТОВ ПЕЧЕНИ

Материал	Диаметр, *ммк*
Целые клетки	20 000
Ядра	6000
Ядрышки	1000
Митохондрии	750 [1])
Лизосомы	200—800
Микросомы	10—150
Гранулы гликогена	100
Субмитохондриальные частицы	50—100
Рибосомы	10—15
Мембрана аппарата Гольджи (толщина)	20
Мембрана эндоплазматического ретикулума (толщина)	5
Типичный глобулярный белок	5
Для сравнения:	
Хлоропласты высших растений	3000—10 000
Типичная клетка бациллы	2000
Типичная клетка кокка	500
Граны хлоропластов	300—1700
Цитоплазматические гранулы бактерий	10—20

[1]) Длина до 7000 *ммк*.

Время от времени предлагались различные модификации этой среды для получения препаратов специального назначения; так, например, было предложено забуферивание при значениях pH, отличающихся от нейтрального, или добавление к сахарозной среде различных стабилизирующих веществ. Ядра выделяли центрифугированием в неводной среде. Хорошая сводка методов выделения субклеточных структур приведена в обзоре Олфри [52].

В результате работ Шнейдера, Клода, Хогебума, Даунса и других исследователей была принята более или менее стандартная схема фракционирования содержимого клеток. При фракционировании по этой схеме получают следующие фракции: неповрежденные клетки и обрывки ткани, ядра, митохондрии (вместе с ними обычно выделяются и лизосомы, о которых мы еще будем говорить ниже), микросомы и надосадочная жидкость. Эти фракции значительно различаются по своему химическому составу. ДНК клеток почти целиком сосредоточивается в ядрах, тогда как большая часть РНК находится в микросомах и только некоторое ее количество содержится в митохондриях и ядре. И митохондрии и микросомы отличаются высоким содержанием липидов (до 30—40% сухого веса; большей частью в форме фосфолипидов, образующих комплексы с белками). Митохондрии в норме содержат около 70% воды [2840].

В настоящее время мы располагаем большим количеством данных о распределении ферментов между такими фракциями (см., например, обзоры [456, 581, 1127, 1140]). Некоторые сведения по этому вопросу можно найти в табл. 61, где знаки указывают не удельные активности, а общее количество соответствующего фермента, присутствующее во всей фракции. Четыре знака + соответствуют активности цельного нефракционированного гомогената, а один знак + соответствует приблизительно $^1/_4$ этой активности. В тех случаях, когда данные разных авторов не совпадают, мы приводим то значение, которое представляется нам наиболее правильным на основе оценки условий опыта. Данные эти следует рассматривать только как приблизительные, поскольку на них влияли различные факторы и не обязательно активность фермента во всех фракциях составляла в сумме точно 100%.

Из рассмотрения табл. 61 ясно видно, что отдельные ферменты локализуются в определенных фракциях, но к интерпретации результатов следует

Таблица 61

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ВО ФРАКЦИЯХ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ ИЗ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ГРЫЗУНОВ

Фермент	Ядра	Митохондрии	Микросомы	Надосадочная жидкость
1. *Ферменты, присутствующие главным образом в ядре*				
НМН-аденилилтрансфераза (2.7.7.1)	+++	−		+
2. *Ферменты, присутствующие главным образом в митохондриях*				
D-3-оксибутират-дегидрогеназа (1.1.1.30)	+	++++	−	−
Изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.41)	−	++++	−	−
Сукцинатдегидрогеназа (1.3.99.1)	−	++++	−	−
Глутаматдегидрогеназа (1.4.1.3)	−	++++		−
Уратоксидаза (1.7.3.3)	±	+++	±	−
Цитохромоксидаза (1.9.3.1)	−	++++	−	−
Ацетил-КоА—ацилтрансфераза (2.3.1.16)		++++		
Аденилаткиназа (2.7.4.3)	±	+++	−	−
Рибонуклеаза (2.7.7.16)	−	+++	+	+
Тиосульфат-сульфидтрансфераза (2.8.1.1)	+	+++	−	−
Кислая фосфатаза (3.1.3.2)	−	+++	+	±
Дезоксирибонуклеаза II (3.1.4.6)	±	+++	±	+
Арилсульфатазы A и B (3.1.6.1)	±	+++	+	+
β-*Галактозидаза* (3.2.1.23)	±	++	+	+
β-*Ацетамидодезоксиглюкозидаза* (3.2.1.30)	+	+++	+	±
3. *Ферменты, присутствующие главным образом в микросомах*				
Арил-4-гидроксилаза (1.99.1.1)	−	−	+++	−
Карбоксилэстераза (3.1.1.1)	−	+	++	+
Ацетилхолинэстераза (3.1.1.7)	±	+	++	−
Холинэстераза (3.1.1.8)	±	±	++	−
Витамин-А-эстераза (3.1.1.12)	−	−	++++	−
Холестеролэстераза (3.1.1.13)	+	−	++++	−
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)	±	±	++++	±
Глюкозо-6-фосфатаза (3.1.3.9)	−	+	+++	−
Арилсульфатаза C (3.1.6.1)	±	±	+++	−
Холоил-КоА—синтетаза (6.2.1.7)		−	++++	−

Продолж. табл. 61

Фермент	Ядра	Митохондрии	Микросомы	Надосадочная жидкость
4. *Растворимые ферменты, присутствующие главным образом в надосадочной жидкости*				
Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27)	−	−	−	++++
Изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42)	−	±	−	+++
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (1.1.1.49)	−	−	−	++++
Ксантиноксидаза (1.2.3.2)	−	−	−	++++
Глутатионредуктаза (1.6.4.2)	−	−	++++	
α-Глюканфосфорилаза (2.4.1.1)	±		−	+++
Пуриннуклеозидфосфорилаза (2.4.2.1)		−		++++
Аспартат-аминотрансфераза (2.6.1.1)	−	+		++++
Глюкокиназа (2.7.1.2)				+++
Кетогексокиназа (2.7.1.3)				+++
Фосфоглюкомутаза (2.7.5.1)	−	−	−	++++
ФМН-аденилилтрансфераза (2.7.7.2)	−	−	−	++++
Гексозодифосфатаза (3.1.3.11)	−	−	−	++++
Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1.)	−	±	±	+++
Аденозиндезаминаза (3.5.4.4)				++++
Альдолаза (4.1.2.7)	+	−	−	++++
Аконитатгидратаза (4.2.1.3)	±	+	−	++++
5. *Ферменты, присутствующие в нескольких фракциях*				
Малатдегидрогеназа (1.1.1.37)	−	+	+++	
НАДФ·H_2-цитохром-*c*-редуктаза (1.6.2.3)	±	++	+	±
Каталаза (1.11.1.6)	−	++	−	++
5-нуклеотидаза (3.1.3.5)	++	+	++	±
β-*Глюкуронидаза* (3.2.1.31)	−	++	+	−
НАД(Ф)-нуклеозидаза (3.2.2.6)	++	−	++	++
Аргиназа (3.5.3.1)	++	±	++	−
АТФ-аза (3.6.1.3)	+	++	+	−
АТФ-аза (3.6.1.4)	+	+++	+	−
Фумаратгидратаза (4.2.1.2)	±	++	+	±

подходить с большой осторожностью, особенно там, где приходится иметь дело с малыми активностями. Это связано с возможностью взаимного загрязнения различных фракций, а также с тем обстоятельством, что число получаемых фракций значительно меньше числа различных клеточных компонентов и, следовательно, некоторые фракции должны содержать несколько различных видов структур. Степень взаимного загрязнения будет варьировать в зависимости от метода разделения фракций, так что результаты, полученные разными исследователями, не обязательно будут сравнимыми. Загрязнения могут быть результатом адсорбции, адгезии, агрегации мелких частиц (при этом образуются глыбки, которые попадают во фракцию более крупных частиц), автолиза или экстракции компонентов и т. д.

Существует и еще одна трудность, которая также, по-видимому, может обесценивать некоторые из ранее опубликованных результатов. Речь идет о том, что фермент, присутствующий во фракции субклеточных частиц, может быть недоступным для субстрата, находящегося в суспензионной среде, в результате чего будут получены неправильные, заниженные величины для активности соответствующих фракций. Так, Грэвилл и Чэппелл

[930] показали, что фермент тиосульфат-сульфидтрансфераза (2.8.1.1) из гомогенатов печени крыс, приготовленных в 0,44 *М* растворе сахарозы, не обнаруживал активности, но активность появлялась, если митохондрии из таких гомогенатов обрабатывали веществами, вызывающими их набухание, например детергентами, фосфатом или L-тироксином. β-Оксибутиратдегидрогеназа (1.1.1.30) также не проявляет активности в митохондриях печени крыс, но в этом случае даже и химическая обработка митохондрий дает лишь очень небольшой эффект; чтобы «демаскировать» фермент, требуется весьма сильное воздействие, например разрушение митохондрии ультразвуком [1536]. Бендолл и де Дюв [203] сравнивали активацию «латентных» дегидрогеназ из митохондрий с активацией ферментов, находящихся в лизосомах, и пришли к заключению, что имеется два типа активации. Во-первых, может увеличиться проницаемость митохондриальных мембран, так что молекулы субстрата смогут проникнуть внутрь, но ферменты при этом не будут выходить из митохондрии; обычно такая активация обратима. Во-вторых, проницаемость может увеличиться настолько, что станет возможным выход ферментов в раствор; ясно, что такая активация необратима.

Обычно считалось, что четыре фракции, указанные в табл. 61, содержат соответственно только ядра, митохондрии, микросомы или клеточный сок. Де Дюв [187, 580] (см. также [1481]) показал, что фракция митохондрий содержит помимо истинных митохондрий еще и частицы другого рода, которым было дано название «лизосомы». На долю лизосом может приходиться до 20% суммарного азота данной фракции. Эти два типа частиц можно частично разделить дифференциальным центрифугированием: лизосомы — более мелкие, но и более плотные — оседают медленнее, чем митохондрии. Вполне определенные доказательства дает и центрифугирование препаратов митохондрий в градиенте плотности [187]. При достижении равновесия частицы занимают в градиенте положение, соответствующее их собственной плотности, и если определить активность данного фермента в частицах, занимающих разное положение в центрифужной пробирке, то можно получить характерную кривую распределения. Такого рода кривые бывают двух типов. Кривые, полученные для цитохромоксидазы, глутаматдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и дезоксирибонуклеазы, имеют тот же характер, что и кривые, описывающие распределение истинных митохондрий. Совершенно другие кривые были получены для некоторых гидролитических ферментов, в том числе для кислой фосфатазы, β-глюкуронидазы и рибонуклеазы. Это дало повод считать, что данные ферменты находятся в лизосомах (их названия выделены в табл. 61 курсивом). В то же время лизосомы, по-видимому, значительно менее однородны по набору ферментов, чем истинные митохондрии. В частности, уратоксидаза распределяется в градиенте плотности совсем не так, как находящиеся в лизосомах гидролазы; возможно, что она присутствует в совершенно особых частицах.

Большинство данных по фракционированию, о которых сообщалось в литературе, относится к печени. Распределение ферментов в других тканях может быть совершенно иным. Олдридж и Джонсон [47] показали, например, что в мозгу лишь около $^1/_3$ холинэстеразной и карбоксилэстеразной активности локализуется во фракции микросом, а вся остальная активность распределена по другим фракциям (тогда как в печени бо́льшая часть этих ферментов находится в микросомах). Тиосульфат-сульфидтрансфераза и аденилаткиназа, которые в печени присутствуют главным образом в митохондриях, в сердечной мышце во фракции митохондрий не обнаруживаются вообще; в сердечной мышце эти ферменты находятся в основном в надосадочной жидкости [458, 1891]. Аконитатгидратаза в печени сосредоточена главным образом в клеточном соке; в мозгу же она находится исключительно в митохондриях [2382].

В недавно вышедшем обзоре де Дюв и др. [581] приводят имеющиеся сведения о внутриклеточном распределении в различных тканях тех ферментов, которые вошли в список, составленный Комиссией по ферментам.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ И ФИЗИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Один из наиболее удивительных фактов, выявленных при изучении локализации ферментов внутри клетки, заключается в том, что все ферменты и коферменты многих важных метаболических систем локализуются в частицах одного типа. Так, например, все компоненты окислительной цепи реакций, связанной с цитохромной системой, находятся в митохондриях, а все ферменты гликолиза обнаруживаются почти исключительно в надосадочной фракции.

Однако важность этого факта в прошлом, по-видимому, переоценивали. Особое значение приписывали митохондрии как «силовой станции клетки», полагая, что именно здесь протекают аэробные процессы, снабжающие клетку энергией. Было показано, что неочищенные препараты митохондрий (с соответствующими добавками) катализируют цикл лимонной кислоты, а отсюда был сделан вывод, что все ферменты, участвующие в этом цикле (табл. 42), локализуются исключительно в митохондриях. Между тем достаточно беглого взгляда на табл. 42, чтобы убедиться в том, что это не совсем так; мы видим, что ряд незаменимых ферментов цикла лимонной кислоты локализуется в основном в других фракциях и только два фермента этого цикла сосредоточены исключительно в митохондриях. С митохондриями же связаны и другие окислительные системы, а именно β-окисление жирных кислот (хотя восстановительный синтез жирных кислот протекает в клеточном соке, а их включение в жиры — в микросомах), окисление сукцината, окисление НАД·H_2 и НАДФ·H_2 за счет O_2 и окислительное фосфорилирование. Протеолитические системы печени также локализованы главным образом в митохондриях; исключение составляют глицилглицин-дипептидаза и аминотрипептидаза, которые обнаруживаются только в надосадочной фракции [2159]. В синтезе белка участвуют ферменты, находящиеся в ядре и в клеточном соке, а также система матриц в рибосомах.

Однако локализация целого цикла метаболических реакций в определенных частицах еще отнюдь не доказывает, что все ферменты, участвующие в этом цикле, локализованы по преимуществу в этих частицах; она лишь свидетельствует о том, что только в этих частицах встречаются *все* необходимые для данного цикла ферменты. Если, например, в системе, состоящей из четырех ферментов A, B, C и D, ферменты A и B сосредоточены в основном во фракции микросом, а ферменты C и D — в надосадочной жидкости и только небольшое количество всех четырех ферментов находится во фракции митохондрий, то ясно, что только в митохондриях удастся обнаружить данную систему реакций. В интактной клетке, однако, отдельные звенья этой метаболической последовательности могут быть приурочены к каким-либо другим местам. Так, у ферментов печени, находящихся вне митохондрий, способность катализировать превращение ацетата в 2-оксоглутарат не ниже, чем у интактной ткани, а возможно, даже и выше [1620]. Эта часть цикла лимонной кислоты может протекать главным образом вне митохондрий, где она играет важную роль в поддержании высокого отношения НАДФ·H_2 к НАДФ.

Интересно отметить, что многие важные коферменты сосредоточены преимущественно в митохондриях [2336]. Так, например, свыше 50% всего КоА печени, 65% ФАД, очень большая часть цитохрома *c* и все цитохромы *a*, *b* и c_1 находятся в митохондриях. Иначе обстоит дело с НАД; хотя он и присутствует в митохондриях, однако главная его часть все же приурочена к надосадочной фракции. В тех случаях, когда растворимые коферменты

находятся в митохондриях, обмен между ними и коферментами, находящимися снаружи, протекает не легко, главным образом потому, что митохондрии окружены мембраной, не проницаемой для таких молекул.

Тирс и Вэлли [2639] исследовали распределение металлов в клетках печени крыс. Mg, Mn и Ca присутствуют в митохондриях в более высокой концентрации, нежели в других клеточных фракциях, тогда как клеточный сок отличается относительно высоким содержанием щелочных металлов. Концентрация калия в митохондриях обычно поддерживается на высоком уровне за счет реакций окислительного фосфорилирования. Торможение окислительного фосфорилирования вызывает быстрое исчезновение избытка калия. Если к среде добавить KCl, то митохондрии, в которых активно протекает метаболизм, могут поглотить дополнительное количество калия (против градиента концентрации). В довольно высокой концентрации присутствуют в митохондриях также натрий, магний и кальций. Проникновение ионов внутрь митохондрий и выхождение из митохондрий воды представляет собой активный процесс, связанный с метаболизмом, но с разными ионами этот процесс протекает различно, и результаты наблюдений не всегда легко интерпретировать. Набухание митохондрий из мышц в гипотонических растворах можно предотвратить и даже обратить добавлением АТФ или ИТФ [432]. По-видимому, ионы могут пассивно проникать через мембрану митохондрий, но их концентрация внутри митохондрий определяется активным накоплением «связанной» формы, которая остается фиксированной внутри частицы [2840].

Де Дюв предположил, что лизосомы связаны с гидролитическими процессами (отсюда и произошло их название). Микросомы тоже можно рассматривать как гидролизующие частицы, ибо из десяти ферментов, помещенных в разделе 3 табл. 61, восемь являются эстеразами. Эти частицы содержат также и другие гидролитические ферменты (включенные в раздел 5). Кроме того, микросомы содержат большую часть НАД·H_2-цитохром-*c*-редуктазной активности клетки, что определяется не присутствием фермента 1.6.2.1, а присутствием цитохрома b_5 и его редуктазы (1.6.2.2). Цитохром b_5 — это характерный пигмент микросом животных тканей.

Многие ферментные системы не связаны с отдельными органеллами клетки, а присутствуют в растворенном виде в цитоплазме. Помимо ферментов гликолиза и некоторых других ферментов, приведенных в разделе 4 табл. 61, в надосадочной жидкости локализуются преимущественно также и системы, синтезирующие глутамин, аргинин и ФАД.

Хотя ядра могут быть получены в неизмененном состоянии (если судить по данным микроскопических наблюдений) и без каких бы то ни было примесей, тем не менее очень трудно ответить на вопрос о том, какая ферментативная активность связана с ядром. Если не считать одного фермента, приведенного в разделе 1 табл. 61, то во фракции ядер обнаруживалась лишь очень слабая активность различных типов. Но даже и при этом не было уверенности, что эта активность изначально присутствовала в выделяемых ядрах. По крайней мере в некоторых случаях ее следовало отнести за счет загрязнения фракции ядер какими-нибудь другими частицами; именно так, несомненно, обстояло дело с цитохромоксидазой и сукцинатдегидрогеназой [2244]. Следует также иметь в виду возможность прямой адсорбции на ядре в процессе препаративного выделения, особенно в водной среде, и даже возможность перехода различных веществ в ядро и из ядра через поры ядерной мембраны. Рудин [2245] показал, что около 10% активности альдолазы сосредоточено в ядре, но обычно количество этого фермента, обнаруживаемое в препаратах ядер, больше и зависит в значительной степени от условий, в которых велось выделение, в частности от pH и от времени.

Много усилий было приложено для разработки таких препаративных методов выделения ядер, которые дали бы возможность свести к минимуму

перераспределение ферментов между отдельными компонентами клетки. Большинство исследователей использовали центрифугирование в водной среде (см., например, [2084]), но Беренс [194] разработал метод выделения обезвоженных ядер в неводной среде (циклогексан и четыреххлористый углерод), и этот метод был с большим успехом использован Зибертом, который показал, что данный способ почти полностью исключает перераспределение даже небольших молекул, вроде молекул лактата. В настоящее время можно, по-видимому, считать доказанным, что хотя окислительные системы в ядре отсутствуют, но зато многие другие метаболические системы локализуются именно в ядре (для ознакомления с вопросом см. обзоры [1832, 2400, 2404]). Высказывалось мнение [54], что в ядрах имеется система, осуществляющая окислительное фосфорилирование и продуцирующая АТФ. Эта система отличается от системы фосфорилирования, имеющейся в митохондриях; в частности, она зависит от ядерной ДНК или других полинуклеотидов. Энергия, источником которой служит эта система (см. гл. XI), может быть использована для синтеза белка [53]. Ядро содержит также небольшие количества многих других ферментов, в том числе гидролазы, аминотрансферазы, ферменты гликолиза и пентозофосфатного цикла.

В том случае, когда фермент встречается более чем в одной фракции, иногда обнаруживают, что его свойства в разных фракциях несколько различаются. Это, например, справедливо в отношении β-глюкуронидазы (различная форма кривой pH — активность [580]), щелочной фосфатазы (различная активация металлами [694]), арилсульфатазы (различная специфичность [640]), цитохромредуктазы (различные акцепторы), изоцитратдегидрогеназы (различные акцепторы [706]) и малатдегидрогеназы (различные физические свойства [2651]) (см. также стр. 567).

В зеленых частях растений хлорофилл и ферменты, участвующие в фотосинтезе, локализованы в хлоропластах вместе с двумя цитохромами, которые также принимают участие в процессе фотосинтеза, а именно цитохромами b_6 и f, и вместе с рядом других ферментов (см. обзор [2418]). Митохондрии растительных клеток в общем по своей морфологии и ферментативным свойствам идентичны митохондриям животных тканей; они содержат те же обычные цитохромы a, a_3, b, c и c_1 [285, 1735, 1736]. Митохондрии в клетках початка *Arum* обладают исключительно активной дыхательной системой, компонентом которой служит особый цитохром (b_7) [202]. Растительные клетки имеют и микросомы, которые, видимо, гомологичны микросомам животных по химическому составу и ферментативным свойствам с тем отличием, что цитохром b_5 заменен в них цитохромом b_3 [1736]. У растений, как и у животных, распределение ферментов внутри клеток далеко не одинаково. Так, например, катехолоксидаза присутствует в хлоропластах чайных листьев, но отсутствует в хлоропластах листьев шпината; в листьях шпината этот фермент содержится в цитоплазме [1581].

Нормальные митохондрии с тонкой структурой, подобной структуре митохондрий животных клеток, можно наблюдать у дрожжей [2952]. Из аэробных дрожжей можно выделить сферические частицы диаметром 200—300 *ммк*, обладающие высокой дыхательной активностью [1601]. Однако следует отметить, что внешне нормальные митохондрии наблюдали и у мутантов petite, у которых полностью отсутствовали цитохромоксидаза и другие дыхательные ферменты.

Бактериальная клетка отличается от клеток высших организмов по ряду признаков, в частности отсутствием внутриклеточных мембран. Одна из наиболее характерных ее черт — это наличие клеточной оболочки, к которой плотно прижата мембрана протопласта. Оболочка клетки, по-видимому, обладает небольшой ферментативной активностью или совсем лишена таковой. Эту оболочку можно удалить различными способами. Если при этом поддерживать осмотическое давление внешней среды на достаточно высоком

уровне, то у лишенных оболочки протопластов обмен веществ сохраняется ненарушенным (исключение составляют, разумеется, процессы, связанные с синтезом вещества клеточной оболочки) [1671]. Оболочка, видимо, пористая, причем диаметр пор составляет около 1 *ммк*. Нуклеотиды и коферменты могут свободно проникать сквозь клеточную оболочку, но белки сквозь нее проходить не могут [1834].

Удалось приготовить гомогенаты бактериальных клеток и разделить их дифференциальным центрифугированием на отдельные фракции. При этом были получены результаты, весьма отличные от тех, какие дает фракционирование животных клеток. Ничего соответствующего фракциям «ядер» и «митохондрий» в бактериальных клетках не обнаружено. Ядро, не окруженное мембраной, в бактериальной клетке диспергировано, и потому ДНК попадает в надосадочную фракцию. Гранулярная фракция состоит из сферических частиц диаметром около 15 *ммк* [2320]; в этих частицах сосредоточена почти вся РНК клетки. У *Aerobacter* или *Azotobacter* такие частицы содержат большую часть сукциноксидазной системы клеток, а также их цитохромную систему [2657]. Частицы, полученные из клеток *Azotobacter*, осуществляют (правда, с низкой эффективностью) окислительное фосфорилирование, сопряженное с окислением сукцината; процесс идет значительно энергичнее, если к среде добавить достаточное количество надосадочной фракции [2661]. Таким образом, по биохимическим характеристикам данные частицы могут рассматриваться как гомологи митохондрий, хотя по размеру и содержанию РНК они больше напоминают микросомы животных и растений.

Митчелл и Мойл сообщают, что мембраны протопластов *Staphylococcus aureus*, полученные после лизиса протопластов в дистиллированной воде и последующего центрифугирования, по своему химическому составу и ферментативным свойствам напоминают фракцию мелких частиц, выделяемую при механическом разрушении этих клеток (см. [1834, 1835]). Изолированные мембраны протопластов при промывании дистиллированной водой распадались на мелкие частицы. Авторы предполагают, что мелкие частицы, обнаруженные в гомогенатах бактериальных клеток, представляют собой артефакты и что ферменты, которые они содержат (включая цитохромную систему, многие дегидрогеназы и кислую фосфатазу), в интактной клетке находятся в клеточной мембране, возможно, в непосредственном контакте с внешней средой. Однако на электронных микрофотографиях бактериальных клеток, в том числе и клеток *S. aureus*, видно, что вся цитоплазма плотно набита мелкими гранулами [307]. Возможно, что в препаратах Митчелла и Мойла эти гранулы присутствовали в качестве загрязнений.

СТРОЕНИЕ СУБКЛЕТОЧНЫХ ЧАСТИЦ

Важным событием в области биохимической цитологии явилось открытие морфологической и ферментативной неоднородности описанных выше частиц. Мы уже отмечали (см. стр. 534), что с помощью электронного микроскопа удалось исследовать сложную внутреннюю структуру митохондрий. Если нарушить целостность митохондриальной мембраны механическим способом или осмотическим путем (суспендируя митохондрии в чистой воде), то значительная часть содержимого митохондрий (более половины сухого веса у митохондрий печени) перейдет в раствор; при этом в раствор попадут и некоторые находящиеся в митохондриях ферменты, например глутаматдегидрогеназа и фумаратгидратаза, а также коферменты нуклеотидной природы. Около $^1/_4$ сухого веса остается на долю мелких частиц, которые можно отделить на центрифуге при большом числе оборотов. Эти частицы содержат почти всю РНК митохондрий, значительную часть липидов и всю сукцинат-цитохромную систему. Такого рода мелкие частицы,

осуществляющие окислительные процессы (так называемые саркосомы; см. [431]), были получены из митохондрий сердца за много лет до того, как начались какие бы то ни было исследования на изолированных митохондриях. Классический препарат Кейлина — Хартри состоит именно из таких частиц. Эти частицы обычно не катализируют реакции окислительного фосфорилирования, сопряженные с окислением сукцината. Однако в лабораториях Ленинджера и Грина [498, 899, 905] из сердечной мышцы и из печени были получены также и препараты митохондриальных частиц, способные катализировать окислительное фосфорилирование. Грин полагает, что фосфорилирующие частицы имеют двуслойную структуру, *так же как* и кристы митохондрий, от которых они происходят, а нефосфорилирующие частицы (ЭПЧ; см. стр. 475) представляют собой пузырьки, образованные однослойной мембраной. Считают, что эти частицы являются основными метаболическими единицами митохондрий и что каждая из них содержит по одному ферменту *для каждой ступени метаболического цикла*. Грин и Ода [905] рассчитали, что в одной митохондрии имеется около 18 000 таких единиц. В каждой единице ферменты удерживаются вместе с помощью липидов и структурных белков.

Лизосомы, по-видимому, представляют собой «мешок», наполненный раствором *всех имеющихся в частице ферментов*. *До тех пор пока* этот «мешок» остается неповрежденным, ферментативную активность обнаружить не удается; но препарат можно «активировать» рядом процедур, нарушающих целостность мембраны, в том числе механическим повреждением, замораживанием и оттаиванием, выдерживанием в гипотонической среде, инкубацией с *детергентом* [825, 2800] или инкубацией в мягких условиях с лецитиназой, трипсином или же химотрипсином (но не с рибонуклеазой или мурамидазой) [188]. Выход ферментов из лизосом наружу в растворимой форме происходит внезапно; все ферменты выходят сразу и целиком. Считают, что причиной этого бывает разрушение липопротеидного барьера. При фракционировании гомогенатов печени животных, которым вводились печеночные яды, или животных, подвергавшихся кислородному голоданию, количество микросомных ферментов в растворимой фракции оказывается повышенным; полагают, что разрушение оболочки лизосом играет важную роль в явлениях автолиза и некроза [189].

Микросомы в электронном микроскопе имеют вид пузырьков или трубочек, несущих на своей внешней поверхности непрозрачные частицы диаметром 10—15 *ммк*. Выше мы уже упоминали о том, что они, возможно, ведут свое происхождение от эндоплазматического ретикулума. В гипотоническом растворе микросомы набухают, но целостность их при этом не нарушается; ее, однако, можно нарушить, если обработать препарат дезоксихолатом. После такой процедуры центрифугированием на скоростной центрифуге можно выделить рибосомы [2044]. Эти частицы содержат почти всю РНК микросом, около 20% их белка, очень мало фосфолипидов и *не содержат* цитохромредуктазной системы и цитохрома b_5. Следовательно, названная окислительная система должна быть локализована либо в мембране микросом, либо в их внутреннем содержимом. О важном значении рибосом для биосинтеза белка мы уже подробно писали в гл. XI.

Что касается локализации ферментов *внутри ядра*, *то об этом мало что* можно сказать, так как большинство обнаруженных в ядре ферментов присутствует в нем в малых количествах. Методом центрифугирования были получены препараты изолированных хромосом (однако процесс начинали с целых клеток, а не с изолированных ядер) [1831], а также изолированных ядрышек [1852]. И те и другие *содержат большое количество* ДНК. Из делящихся яиц морского ежа были выделены нити веретена; оказалось, что они состоят из белка с высоким содержанием SH-групп [1771]. С препаратами ядерных структур проведено пока небольшое число энзимологиче-

ских тестов. Определения показали, что альдолаза содержится в ядрышке в значительно большем количестве, чем в целом ядре, тогда как для аргиназы и каталазы соотношения оказываются обратными. Имеется также сообщение о том, что изолированные хромосомы богаты щелочной фосфатазой.

Хлоропласты зеленых растений, в которых находится пигмент хлорофилл, обладают весьма сложной структурой. Они, по-видимому, содержат более мелкие частицы — граны, имеющие в диаметре около 600 *ммк* и собранные (у высших растений) наподобие монет в стопки. Эти граны могут быть выделены при механическом разрушении хлоропластов. Каждая грана сама состоит из группы двойных ламелл, имеющих форму дисков толщиной 7 *ммк*. Ламеллы, по-видимому, проходят сквозь весь хлоропласт, но в участках, где располагаются граны, их больше и они здесь более плотно упакованы. Полагают, что хлорофилл находится именно в ламеллах [1100].

В этой быстро развивающейся области еще очень многое предстоит сделать, но уже и сейчас ясно, что организация ферментов внутри клетки является весьма сложной вплоть до молекулярного уровня. Эта организация параллельна сложной и тонкой морфологической структуре, с которой мы познакомились благодаря работам последнего десятилетия.

Сравнительная биохимия ферментов

Хотя по сравнительной биохимии имеется много работ, до настоящего времени еще не предпринималось попыток развить сравнительную биохимию ферментов в самостоятельную отрасль знания. Между тем едва ли можно сомневаться в том, что в основе многих видовых различий, а также различий между разными тканями одного и того же организма лежат особенности ферментного оснащения. Исследования, проводимые в этом плане, должны, как нам кажется, дать очень ценные сведения.

В раздел «Сравнительная биохимия ферментов» мы включили, с одной стороны, исследования, в которых проводится сравнительное изучение набора ферментов в различных органах и у разных видов животных, а с другой — работы, посвященные сравнению очищенных препаратов данного фермента, полученных из различных источников. Рассмотрим эти два направления исследовательской работы порознь.

СРАВНЕНИЕ ТКАНЕЙ

Сравнение множества глубоко различных типов клеток показывает, что их ферментные наборы имеют много общего. По-видимому, во всех живых организмах протекают в основном одни и те же обменные процессы; некоторые различия в конечных продуктах обмена зависят скорее от добавления или выпадения того или иного фермента, нежели от изменения общего характера обмена веществ. Сложные системы углеводного обмена, состоящие из ферментов, коферментов и переносчиков (см. несколько первых таблиц в гл. XII), образуют (с небольшими вариациями) главный поставляющий энергию механизм у животных, растений, плесневых грибов, дрожжей и у большинства других микроорганизмов.

Имеются, однако, и бесспорные различия в характере обмена, химическом составе и структуре различных тканей и различных организмов. Что касается обмена, то здесь различия явно определяются набором ферментов в соответствующих органах или тканях. Различия в химическом составе тоже зависят от ферментов, в особенности от ферментов, участвующих в процессах биосинтеза. Отнюдь не исключено, что и более очевидные различия в структуре и форме также могут получить энзимологическое объяснение. Известно, что структура и форма находятся под контролем генов; но гены

контролируют образование ферментов, и если только они не действуют двумя совершенно различными путями, то, видимо, их влияние на структуру и форму должно осуществляться через посредство имеющихся в организме ферментов. Форма органов, в значительной степени определяемая влиянием соседних тканей, без сомнения, зависит от веществ, оказывающих морфогенетическое действие (так называемых организаторов; см., в частности, монографию Нидхэма [1934]); но и сами эти вещества, вероятно, образуются под действием ферментов. Так или иначе, весь процесс в целом в сильной степени подчинен генетическому контролю (см. [2746]).

Наибольшие различия в ферментном оснащении организмов можно, по-видимому, обнаружить при сравнении животных, растений и бактерий. У различных видов животных обмен в основных чертах приблизительно одинаков, но растения, плесневые грибы и отчасти также бактерии образуют большое число дополнительных, специализированных продуктов обмена, например различные пигменты, алкалоиды и другие гетероциклические соединения. Изучением целого ряда сложных циклических соединений, которые плесневые грибы образуют в процессе своего обмена, занимался Рэйстрик [2162]. Многие из этих соединений встречаются только у одного или двух видов. О ферментах, участвующих в их синтезе, известно пока очень мало. После того как будут выяснены отдельные этапы этого синтеза, сравнительное изучение поможет установить связь между наличием специализированных продуктов такого рода и физиологией клеток, которые их вырабатывают.

Имеющиеся у нас сведения о распространении ферментов касаются в основном животных тканей и до некоторой степени бактерий. Однако даже эти данные слишком разрозненны. Около 25 лет назад существовала традиция, предписывавшая сопровождать описание любого фермента кратким обзором источников его распространения, но теперь этот обычай вышел из моды. Значительное число данных о распространении ферментов в животных тканях (главным образом в тканях крыс и мышей) собрано при сравнении нормальных тканей с опухолями. Ориентировочные данные по распространению различных ферментов приведены в Списке ферментов. Ими, однако, следует пользоваться с осторожностью; во всяком случае, необходимо помнить, что указанные в Списке источники отнюдь не являются единственно возможными, особенно там, где речь идет о новых, недавно открытых ферментах.

Многие хорошо известные ферменты, например ферменты гликолиза, очень широко распространены и встречаются во всех органах у всех видов животных (хотя и в очень разных количествах). Другие ферменты, в частности те, которые участвуют в обмене азота, характеризуются очень неровным распределением. Они нередко полностью отсутствуют в одних тканях и присутствуют в большом количестве в других тканях какого-либо организма, а у другого вида животных оказываются распределенными совершенно по-иному. Хорошим примером этого может служить ксантиноксидаза (1.2.3.2); сведения о распространении этого фермента в ряде животных тканей приведены в работе Моргана [1855].

В табл. 62 мы суммировали имеющиеся в нашем распоряжении количественные данные о распространении ферментов в животных тканях. Там, где это было возможно, мы привели сведения для каждого фермента по одной общей шкале величин, с тем чтобы выявить различия между разными тканями у одного и того же вида животных, а также различия между соответствующими тканями у разных видов. Активность каждого фермента в наиболее активной ткани принята за 100; следовательно, приведенные в таблице величины не дают представления об абсолютной активности и различные ферменты нельзя сравнивать друг с другом. Все эти значения являются относительными, так что низкие величины могут просто указывать на существование одной ткани с исключительно высокой активностью. Табл. 62

Таблица 62

РАСПРОСТРАНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

Активность каждого фермента в наиболее активной ткани принята за 100%. В некоторых случаях приведены две независимые серии данных. Величины можно сравнивать между собой, но величины, относящиеся к разным сериям, независимо от того, характеризуют ли они один и тот же фермент или разные ферменты, выражены в различных масштабах и сравнивать их нельзя. Не все данные, имеющиеся в литературе, совпадают; в каждом случае мы приводили на наш взгляд наиболее достоверные величины. Отмечаются значительные индивидуальные колебания в содержании каждого фермента. Приведенные в таблице данные следует рассматривать как ориентировочные.

Фермент	Организм	Печень	Почки	Селезенка	Сердце	Скелетные мышцы	Легкие	Слизистая желудка	Тонкий кишечник	Толстый кишечник	Поджелудочная железа	Мозг	Надпочечники	Тимус	Щитовидная железа	Семенники	Кровь	Источник данных
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
3-оксипропионат-дегидрогеназа (1.1.1.f)	Свинья	89	100		100							0						[592]
	Цыпленок					20												
Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27)	Кролик	1	8		14	27	3					29						[900]
	Крыса		71		100	25						66						
	Голубь	2	3		4	6	1					0,4						
Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27)	Крыса		20		62													[1781, 2839]
	Мышь	43	38	15	30	100	9	20	75		16	23		20		20		
β-Оксибутиратдегидрогеназа (1.1.1.30)	Обезьяна	27																[1536]
	Собака	22																
	Кошка	28																
	Кролик	18																
	Морская свинка	6																
	Крыса	100	12	2	8	2					2,5	5	8		0	2		
	Мышь	70																
Малатдегидрогеназа (1.1.1.37)	Лягушка	14																
	Кролик	13	10		26	2						25						

	Крыса	19	5		100	38		
	Голубь	28	57		86	80		
Изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42)	Крыса		100		85			
	Мышь	17				24		
Глицерофосфатдегидрогеназа (1.1.2.1)	Кролик	70	63		21	71	38	
Оксидаза D-аминокислот (1.4.3.3)	Лошадь	0,5	0,5					
	Овца	26	100					
	Свинья	6	24					
	Собака	12	22					
	Шакал	5	15					
	Кошка	2	13					
	Морская свинка	0,5	1					
	Крыса	0,2	2	0	0	0		
	Дикобраз		0,2					
Тропинэстераза (3.1.1.10) (по атропину)	Лошадь							
	Морская свинка	0						
	Кролик (+)	100	22	10	27	6		
	Кролик (—)							
	Лягушка	60						
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1) (по глицерофосфату)	Человек	0,7	4	0,8			0,8	0,4
	Собака	2	10	3	0,2	0,1	2	
	Кошка	0,6	12	0,8	0,3	0,1	2	1
	Кролик	1	2	2	0,2	0,2	2	0,2
	Морская свинка	0,3	7		0,4		2	
	Крыса	0,4	5				5	
	Мышь	0,5	23	1	0,8	1	1	
Щелочная фосфатаза (3.1.3.1) (по фенилфосфату)	Кролик	0,1						
	Крыса	0,1	54	1		0,1		
	Мышь	0,1	39	0,6	0,5	0,05	1	0,6

			28							[897]
			33							
										[2839]
23			100							[896]
										[1463]
0		0	0				0			
								0 [1]		
								0 [1]		
55			0	11				100 [1] (0)		[854]
								0		
								0		
10	3		0,5	1						
100		3		1	4	0,3				
65	8	0,3	0,7	2		0,6				
10	4	0,5	1	0,4	0,6	0,4				[1324,
20				6		1				1658]
				2		3				
57		0,3		0,4	1	3				
		0,1	0,5					0,3 [1]		[915]
100		0,04	0,4		0,1					

Продолжение табл. 62

Толстый кишечник	Поджелудочная железа	Мозг	Надпочечники	Тимус	Щитовидная железа	Семенники	Кровь	Источник данных
11	12	13	14	15	16	17	18	19
		10				17		[316]
	19	17					0,4 [1]	[915, 923,
	10	16						924]
		60						[2456]
		0,1						
		6				100		
		1,5						[2204]
		0,6				19		
		1,5						
		0,1					0,1 [1] (0,1)	[1087]
		0,8						
	31	25		19				[916, 924]
	10					17		[488]
		5				26		
	77	5	15			18	0,5	[488]
		8	0			50		

Фермент	Организм	Печень	Почки	Селезенка	Сердце	Скелетные мышцы	Легкие	Слизистая желудка	Тонкий кишечник
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Кислая фосфатаза (3.1.3.2) (по фенилфосфату)	Крыса	39	35	100	9	4	23		16
Кислая фосфатаза (3.1.3.2) (по фенилфосфату)	Кролик	15							
	Крыса	26	100	45		17			
	Мышь	13	16	77		20	35	28	36
Фосфатидатфосфатаза [3.1.3.4]	Крыса	71	100		32	34			
5-нуклеотидаза (3.1.3.5)	Лошадь		4		2	0	1		
	Бык	2	0		0	0,5	3		1
	Собака	0	0		0,1	0,1	2		1
	Кролик	0,1	0		0,1	0,1	1		0,7
	Крыса	2,5	3		6	1	5		3
	Голубь		0		0	0	3		
Глюкозо-6-фосфатаза (3.1.3.9)	Человек								
	Крыса	100	31	1	0,8	0,8	0,4	0,4	18
Дизоксирибонуклеаза (3.1.4.5)	Кролик	65							
	Крыса	41							
	Мышь	89	63	100	55	75	50	38	94
β-Галактозидаза (3.2.1.23)	Человек		17						
	Крыса	42	100	72					
	Мышь	13	32	45					
α-Маннозидаза (3.2.1.24)	Человек		32						
	Крыса	54	100	22	2	0	13		29
	Мышь	68	99	36	4	3	10		32
β-Ацетамидодез-	Человек		100						

оксиглюкозидаза (3.2.1.30)'	Крыса	32	60	17	3	0,7	10	
	Мышь	25	34					
β-Глюкуронидаза (3.2.1.31)	Человек		11					
	Крыса	100	21					
	Мышь	16	10					
β-Глюкуронидаза (3.2.1.31)	Крыса	63	21	100		0,4	20	
Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1)	Человек	2	3	2,5		3		1,5
	Крыса	13	100	12	10	10	14	
Аргиназа (3.5.3.1)	Собака	65	0,4	0				
	Кошка	48	0,4	0	0			
	Кролик	46	2	0	0			
	Морская свинка	72	0,4	0	0			
	Крыса	70	10	4	0	3		
	Мышь	100	10	1	3	1	14	2
	Курица	0,01	0,6	0	0	0		
Гуаниндезаминаза (3.5.4.3)	Крыса	80	76	92		0		
	Мышь	82	86	96				
Аденозиндезаминаза (3.5.4.4)	Кролик	9	19	100	11	2	20	7
АМФ-дезаминаза (3.5.4.6)	Кролик	0,2	0,5	1	0,5	100	0,5	0,2
АМФ-дезаминаза (3.5.4.6)	Крыса	80	96	100		0		
	Мышь	80	84	100		0		
АТФ-аза (3.6.1.3) (активированная кальцием)	Крыса	47	75	48	100	82	80	
Гистидиндекарбоксилаза (4.1.1.22)	Человек	0	0					
	Лошадь		0					
	Бык		0					
	Овца		0					
	Свинья	17	0					

10		4	9	8			16		[488]
							10		
		5					2		[488]
			0,6				3		
				18		26	0,4		[2607]
3	2,5	1,5	3		0,8		2,5	0,1 [1]	[909]
59		11	8						
0		0				0	0,5	0	[671, 920, 923, 924]
0		0				0	0,2	0	
0		0				0	0,02	0	
0		0				0	0,02	0	
0		2	1			0	0,02	0	
32		3	1		1				
		0					0,03	0	
		57	100						[919]
92			76		96				
60	25	32	21	38		21	65	15	[494]
1		0,3	1	1			1,5	1	[494]
		72	0						[919]
100			70		80				
		42	25						[2113]
0									[2841, 2843]
0									

Фермент	Организм	Печень	Почки	Селезенка	Сердце	Скелетные мышцы	Легкие
1	2	3	4	5	6	7	8
Гистидиндекарбоксилаза (4.1.1.22)	Собака		0				
	Кошка		0				
	Кролик	15	90	0			0
	Морская свинка	18	100	0	0		
Альдолазы (4.1.2.7 и 4.1.2b)	Кролик					100	
	Крыса	6	5	2	6	100	
Моноаминоксидаза (1.4.3.4)	Человек	100	40		53	15	24
	Овца	59	53	9	0,5		
	Свинья	24	43	1	3		
Диаминоксидаза (1.4.3.6)	Человек	22	27				
	Лошадь	20	70				
	Бык	18	100				
	Овца	23	54				
	Свинья	17	100				
	Морская свинка	17	17				
	Крыса	18	±				
	Голубь	33	15	17		5	3
Пирролин-2-карбоксилат-редуктаза (1.5.1.1)	Крыса	25	100	4	12	7	
НАД (Ф)-трансгидрогеназа (1.6.1.1)	Бык	0	19	0	100		
	Свинья	54	41		54		
	Кролик	15	10	0	10	5	
	Голубь				2,5	33	

Продолжение табл. 62

Слизистая желудка	Тонкий кишечник	Толстый кишечник	Поджелудочная железа	Мозг	Надпочечники	Тимус	Щитовидная железа	Семенники	Кровь	Источник данных
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0				0						[2841
0	75									2843
									0,3	
				7				4	0,3	[1809]
				30		5				
	16		2	8	13					[2968]
	9		7							
			10	3	28				3	
	8									[2969]
	100									
	3									
				60				24		[1787]
				0						
				0						[1299]
				4						

Цитохромоксидаза (1.9.3.1)	Человек	7	9	1	20	6	
	Кролик	7	12	2	24	5	
	Морская свинка	10	13	2	24	4	
	Крыса	30	35	11	100	16	10
	Мышь	20	27	5	46	7	10
Цитохромоксидаза (1.9.3.1)	Крыса	65	69	15	100	67	14
Каталаза (1.11.1.6)	Крыса	25	12	5		1	
	Мышь	100	40	0,1	0,1	0,1	3
Пероксидазы (1.11.1.7)	Крыса	0	2,5	48	1,5	2	40
Гомогентизат-оксигеназа (1.99.2.5)	Крыса	100	50	0	0	0	
Катехол-метилтрансфераза (2.1.1.a)	Крыса	100	30	7	3	0	4
Гистамин-метилтрансфераза (2.1.1.c)	Кошка	56	<5	56	49	15	64
	Морская свинка	21	63	78	50	46	85
	Кролик	62	55	29	32	25	40
	Крыса	0	46	0	<5	<5	0
	Мышь	47	73	50	36	25	69
Диметилтетин-гомоцистеин-метилтрансфераза (2.1.1.3)	Собака	52					
	Кролик	60					
	Морская свинка	33	9	0		0	
	Крыса	48	16	0		0	
	Мышь	100	3	0		0	
	Голубь	29					
	Угорь	92					
	Черепаха	10					
Тиаминаза I (2.5.1.2)	Карп	10	5	100		0	
Аспартат-аминотрансфераза (2.6.1.1)	Крыса	66	53		100	85	

				10							
				12							
				15							[923, 925]
		2,5		32							
2	2		5	24							
52	13	10		36							[1949]
			1	0							[924]
0	0		0,1	0		0					
37	100	75		1							[1949]
	0			0					0		[511]
	4			3							[115]
65	<5		89	72	52						
92	74			100	17						
60	13			52	27						[334]
0	29			22	0						
44				62							
				0							[1764]
				0							
				0							
				0,8							[2746]
				85							[464]

Продолжение табл. 62

Фермент	Организм	Печень	Почки	Селезенка	Сердце	Скелетные мышцы	Легкие	Слизистая желудка	Тонкий кишечник	Толстый кишечник	Поджелудочная железа	Мозг	Надпочечники	Тимус	Щитовидная железа	Семенники	Кровь	Источник данных
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Глутамин-фруктозо-6-фосфат — аминотрансфераза (2.6.1.16)	Бык	4	35				38		2									[2098]
	Кролик	0							32									
	Крыса	100					10		10									
	Голубь	0																
Фосфоглицеромутаза (2.7.5.3)	Бык	11	18		55	55						43						[2240]
	Овца	7	25		93	100						38						
Рибонуклеаза (2.7.7.16)	Кролик			30							14						0,5	[141, 2972]
	Крыса	2	7,5	23	2	2	6				100						0,75	
Рибонуклеаза (2.7.7.16)	Мышь	15	10	36	5	9	8	35	87		100	23		15				[924]
Карбоксилэстераза (3.1.1.1)	Крыса	17	4	4		0,2					87						0,2	[923]
	Мышь	23	6	6	0,7	0,7	4	3	53		100	0,4		0,2				
Фосфолипаза В (3.1.1.5)	Крыса	43	10	70	3	7	75		100		38	2,5				9		[1727]
Ацетилхолинэстераза (3.1.1.7)	Человек																1,3 [1] (80)	[97, 557, 2031]
	Лошадь																2,5 [1] (12)	
	Бык	7	3														1 [1] (18)	
	Овца	0,05	2,5	7	2		1,5	9	21	25							2 [1] (15)	
	Собака					4						13					2 [1] (11)	
	Кошка																3 [1] (2)	
	Морская свинка	4	6						14								12 [1] (19)	
	Кролик	35							19								3 [1] (5)	
	Крыса	6	1	25	15	4	4	7	11	23		100	24				6 [1] (10)	
	Курица	55															11 [1] (0,7)	
	Labrus	23				10						43					1 [1] (0)	

	Scyllium	2					
	Helix						
Холинэстеразы	Человек						
(3.1.1.8 и 9) (по	Лошадь						
бензоилхолину)	Бык	9	25				
	Овца	4	36	3	12		
	Собака					24	
	Кошка						
	Морская свинка	28	24				
	Кролик	43	5				
	Крыса	16	2	20	100	0,5	10
	Курица	50					
	Labrus	10				7	
	Scyllium	4					
	Helix						
Цитрат-синтаза	Свинья	8	22		73		
(4.1.3.7)	Собака	6	21		67	34	
	Кролик	2	13		47	2	
	Крыса	6	13		80	6	
	Голубь	2			63	100	
Карбоангидраза	Человек	0,6[2)]	1[2)]			0,5[2)]	
(4.2.1.1)	Кит						
	Лошадь						
	Бык						
	Коза						
	Собака		12				
	Кошка	0,6[2)]	21				
	Кролик						
	Морская свинка	0[2)]	0,2[2)]				
	Крыса	16	3	4	±	±	0

				7					2 [1] (0)	]
									75	
									94 [1] (1,6)	]
									100 [1] (1,6)	
									0,5 [1] (0,5)	
19	5	5							2,5 [1] (1)	
				15					68 [1]	
									14 [1] (0)	
	30								57 [1] (1)	[97,
										557,
	9								34 [1] (0)	2031]
15	100	62		17	1,5				7 [1]	
									2 [1] (0,5)	
				9					1 [1] (1)	
				4					1 [1] (0)	
									16	]
										[2490]
				0,8	0				10	]
									25	
									11	
									20	[89,
				0,7					24	545,
				1					30	1791,
				1					21	2376,
									21	2718]
				1					100	
	0		16	5				4	30	]

Продолжение табл. 62

Фермент	Организм	Печень	Почки	Селезенка	Сердце	Скелетные мышцы	Легкие	Слизистая желудка	Тонкий кишечник	Толстый кишечник	Поджелудочная железа	Мозг	Надпочечники	Тимус	Щитовидная железа	Семенники	Кровь	Источник данных
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Карбоангидраза (4.2.1.1)	Крыса	0,2 [2]	2 [2]															[89,
	Мышь	13	37					76									100	545,
	Курица											0,6					45	1791, 2376, 2718]
Фумаратгидратаза (4.2.1.2)	Крыса	50	47		73													[2839]
	Мышь	100																
Аконитатгидратаза (4.2.1.3)	Крыса	35	70		100	17						6						[2746,
	Мышь	46																2839]
Глутаминсинтетаза (6.3.1.2)	Крыса	51	2	6		2,5	0,2				1	61				80		[1562]
	Мышь	53	1	0,2		0,7						100				23		
Цитохром *c*	Человек	3	3	2	30	5	0,4	2	2	1,5	2	3	2		2		0,2	
	Лошадь	2	6		36	14												
	Бык	3	6	1	43	14	0,7	1				2						
	Свинья		14			21												[653,
	Собака		14		55	11												925,
	Кролик	7	16				2			4		10						1279]
	Крыса	50	80	10	100	22	1					18				2	0,3 (0,6)	
	Мышь		67									23						
	Голубь					100												

[1] Плазма или сыворотка (величины для эритроцитов даны в скобках).
[2] Учтена кровь в тканях.

составлена из данных, заимствованных из многих работ; не все данные одинаково надежны, а некоторые более старые результаты получены с помощью методов, не отличающихся особой специфичностью. Точное определение ферментов в тканях — нелегкое дело, поскольку присутствие других ферментов и некоторых посторонних веществ может мешать измерениям. Однако общая картина распределения ферментов, вырисовывающаяся при ознакомлении с табл. 62, вероятно, в основных чертах соответствует действительности.

Из табл. 62 видно, что между разными тканями одного и того же животного и между отдельными тканями разных видов животных имеются очень большие различия в содержании ферментов. Ряд ферментов, например оксидаза *D*-аминокислот, ксантиноксидаза и каталаза, присутствует преимущественно в печени и почках, но практически отсутствует в мышцах; из этих ферментов одни более активны в печени, другие — в почках. Аргиназа локализуется почти исключительно в печени, и активность ее в почках у большей части видов крайне низка. Поэтому метаболизм аминокислот и образование мочевины происходят преимущественно в печени (хотя некоторое количество мочевины синтезируется и в мозгу). Аспартат-аминотрансфераза в сердце более активна, чем в печени или почках; что же касается глутаматсинтетазы, то в мозгу ее содержится больше, чем в печени, а во всех остальных тканях она, вероятно, практически отсутствует.

Высокая активность ряда ферментов характерна для определенных органов и тканей; активность щелочной фосфатазы — для слизистой кишечника, кислой фосфатазы — для почек и селезенки (и даже в еще большей степени для предстательной железы, которая в таблице не упомянута), 5-нуклеотидазы — для семенников, рибонуклеазы — для поджелудочной железы (хотя в других тканях также содержатся заметные количества этого фермента), β-галактозидазы, α-маннозидазы и β-ацетамидодезоксиглюкозидазы — для эпидидимиса (в таблице не упомянут), ацетилхолинэстеразы и глутаминсинтетазы — для мозга, холинэстеразы и карбоангидразы — для крови. Со временем, когда в этой области накопится больше данных, мы, вероятно, убедимся в том, что эти различия представляют собой одно из проявлений метаболической специализации. Для целей клинической диагностики была использована концепция об «органоспецифических ферментах» (см. [348]); отмечено, например, что рак предстательной железы сопровождается повышением содержания кислой фосфатазы в крови. Еще более ценные данные получают при определении доли различных изоферментов в плазме (см. стр. 568).

Не менее резкие различия встречаются и у разных видов. Правда, число изученных видов пока еще очень ограниченно. В этой области для исследователя непочатый край работы, хотя и весьма нелегкой, но зато сулящей результаты, весьма ценные для зоолога. Некоторые ферменты, по-видимому, приурочены в своем распространении к определенным видам животных. Гистидиндекарбоксилаза, например, активна в почках кролика и морской свинки, но отсутствует в почках человека, лошади, коровы, овцы, собаки и кошки. Глубокие видовые различия характерны и для аргиназы. Клементи много лет назад указывал на то, что аргиназа присутствует в печени животных, экскретирующих мочевину, и отсутствует в печени тех животных, которые экскретируют мочевую кислоту. Однако и у этих последних она может присутствовать в почках (как, например, у курицы). Недавно были найдены исключения из этого правила: оказалось, что аргиназа имеется в печени ящериц и змей [341]. У пластиножаберных (акуловых) рыб, у которых мочевина образуется всеми органами и тканями, аргиназа присутствует в больших количествах и в других тканях, помимо печени, например в сердце. С экскрецией азота связан также другой фермент, встречающийся у одних видов и отсутствующий у других. Это — уратоксидаза, которая имеется

у большинства млекопитающих, за исключением человека и других приматов, и отсутствует у птиц. Поэтому у приматов конечным продуктом обмена пуринов оказывается мочевая кислота, а у других млекопитающих — аллантоин; у птиц роль основного азотсодержащего конечного продукта играет мочевая кислота. Детальное изучение ферментов цикла образования мочевины [341] показало, что карбаматкиназа присутствует в печени всех исследованных амфибий и млекопитающих; у актиний удельная активность фермента в процессе развития возрастает.

Резкие видовые различия мы находим также для НАД(Ф)-трансгидрогеназы, присутствующей в печени свиньи и кролика, но отсутствующей в печени коровы, и для моноаминоксидазы, которая обнаруживает высокую активность в сердце человека, а в сердце овцы и свиньи присутствует только в следовых количествах. Помимо таких различий по принципу «все или ничего», между отдельными видами животных имеются и довольно сильно выраженные *количественные* различия. По-видимому, они часто как-то коррелируют с размерами животного: у крысы и мыши, отличающихся высокой интенсивностью обмена, содержание многих ферментов на единицу веса ткани выше, нежели у более крупных животных. Из этого правила, однако, имеются исключения: почки овцы являются, несомненно, лучшим источником оксидазы D-аминокислот, так как они содержат в 50 раз больше этого фермента, чем почки крысы, но оксидазу L-аминокислот получают только из почек крысы, поскольку в почках животных других видов она содержится лишь в следовых количествах. Впрочем, такие различия определяются не только размерами животного. Ткани лошади, например, более бедны оксидазой D-аминокислот, нежели ткани крысы. Все это подсказывает и один практический вывод — необходимость предварительных исследований для решения вопроса о том, какую ткань избрать в качестве источника получения определенного фермента.

Большинство животных тканей содержит клетки разных типов, и эти клетки могут сильно различаться по содержанию ферментов. Опыты, проведенные с тканью в целом, дают лишь среднее значение для всех имеющихся в данной ткани типов клеток. Было сделано много попыток расчленить ткани на отдельные компоненты при такого рода определениях; часто, например, проводили определение ферментов в слизистой кишечника, а не во всей толще его стенки, в корковом и мозговом слоях почки, а не в цельной почке, в сером и белом веществе мозга, а не во всей ткани мозга, в мышцах предсердий и мышцах желудочков, а не на целом сердце. Вполне определенная локализация ферментов была обнаружена и в отдельных слоях сетчатки [1624]. В первом слое гексокиназа сосредоточена почти полностью во внутренних сегментах палочек и колбочек, тогда как фосфоглюкомутаза, глюкозофосфатизомераза и фосфофруктокиназа сконцентрированы в противоположном конце клетки. Первый слой очень богат глюкозофосфатдегидрогеназой; в нем содержится в 10—30 раз больше этого фермента, чем во всей остальной сетчатке.

Нередко, впрочем, различные типы клеток, входящие в состав какой-нибудь ткани, связаны очень тесно и не могут быть разделены простым рассечением. Так, в частности, обстоит дело с печенью, в которой клетки паренхимы и ретикуло-эндотелиальные клетки совершенно равномерно распределены по всей ткани. Ватио и др. [2799] для разделения этих двух типов клеток использовали способность клеток ретикуло-эндотелиальной системы к фагоцитозу. Крысам вводили суспензию из частиц железа (размером 3 *мк*), а затем, после того как эти частицы оказывались захваченными ретикуло-эндотелиальными клетками, печень гомогенизировали и нагруженные железом ретикуло-эндотелиальные клетки отделяли от клеток паренхимы с помощью магнита. Сколько-нибудь заметных различий в содержании ферментов между этими двумя типами клеток выявлено не было.

Даже клетки, относящиеся по гистологическим показателям к одному и тому же типу, вовсе не обязательно имеют одинаковый состав ферментов. До сравнительно недавнего времени полагали, что во всех клетках организма хромосомы одинаковы, но теперь мы знаем, что у млекопитающих это не так [186]. Подсчеты, проведенные с рядом растущих тканей, показали, что число хромосом в разных клетках одной и той же ткани может сильно варьировать. Для 1000 клеток, взятых из нормальной слизистой оболочки матки человека, были получены значения от 4 до 104, с пиками в области гаплоидного и диплоидного чисел (24 и 48). В клетках, в которых число хромосом меньше гаплоидного (а таких клеток немало), должно, очевидно, недоставать некоторых генов, ответственных за образование определенных ферментов. Было бы очень интересно установить, действительно ли в этих клетках не хватает соответствующих ферментов. Если же такой нехватки не обнаружится, то это может означать одно из двух: либо влияние гена в дочерних клетках *продолжает сказываться и после того, как сам ген исчез*, либо ген способен действовать на соседние клетки сквозь клеточные оболочки. К сожалению, у нас пока нет сведений о гомогенности ферментов в тканях.

Таблица 63

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ДЕКАРБОКСИЛАЗ АМИНОКИСЛОТ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Фермент	*Escherichia coli*	*Streptococcus faecalis*	*Clostridium welchii*	*Clostridium fallax*	*Proteus vulgaris*	*Rhizobium trifolium*	*Lactobacillus* spp.
Аспартат —1-декарбоксилаза (4.1.1.11)	+	—	+	—	—	+	—
Глутаматдекарбоксилаза (4.1.1.15)	+	—	+	—	+	—	+
Орнитиндекарбоксилаза (4.1.1.17)	+	—	—	—	+	—	+
Лизиндекарбоксилаза (4.1.1.18)	+	—	—	—	—	—	+
Аргининдекарбоксилаза (4.1.1.19)	+	—	—	—	—	—	+
Гистидиндекарбоксилаза (4.1.1.22.)	+	—	+	+	—	—	+
Тирозиндекарбоксилаза (4.1.1.25)	+	+	—	—	—	—	—
Триптофандекарбоксилаза (4.1.1.27)	—	—	—	—	—	—	—
«Фенилаланиндекарбоксилаза» [1]	—	+	—	—	—	—	—

[1] Существование этого фермента пока еще не доказано, и наблюдаемая активность может быть обусловлена каким-либо косвенным воздействием.

У микроорганизмов мы знаем много примеров, когда видовые различия в метаболизме обусловливаются различиями в ферментном составе. Микробиологи часто используют эти признаки для идентификации и классификации бактерий. Даже для близких ферментов были найдены такие различия; табл. 63 иллюстрирует это на примере индуцируемых декарбоксилаз аминокислот.

Энзимология развития

Хорошо известно, что метаболическая активность тканей изменяется с возрастом, а также под действием других факторов, о которых мы уже говорили. В процессе развития от оплодотворенного яйца до взрослого организма должны синтезироваться различные ферментные системы, и если только все они не синтезируются одновременно, то с возрастом состав ферментов должен меняться. Такие изменения, в частности, могут быть особенно заметны в период эмбрионального развития по мере дифференцировки различных тканей с их характерным набором ферментов. К сожалению, количество достоверных данных по этому вопросу очень невелико. Обзор более ранних работ можно найти у Нидхэма [1933]; позднейшие же данные приводятся в обзоре Густафсона [955] и в книге Вагнера и Митчелла [2746].

Некоторые ферменты, очевидно, отсутствуют у эмбрионов (или их здесь не удается обнаружить) и появляются внезапно на определенной стадии развития. Кроме того, они могут появляться в различных органах в разное время. Моргану [1856], например, не удавалось обнаружить ксантиноксидазу у эмбриона цыпленка вплоть до 15-го дня инкубации, когда она появлялась в почках. В печени же она отсутствовала вплоть до 21-го дня и внезапно появлялась при вылуплении цыпленка. Количество всех ферментов цикла образования мочевины заметно возрастает в процессе метаморфоза лягушки [340]. Ацетилхолинэстераза отсутствует в личинке морского ежа, но появляется незадолго до перехода личинки во взрослую форму, в период, совпадающий с началом координированной нервной деятельности [98]. Удельная активность глутамат-, лактат- и малатдегидрогеназ [2467; 2468] у эмбриона цыпленка изменяется весьма сильно, что, по-видимому, связано с процессом дифференцировки. У млекопитающих часто наблюдаются резкие изменения в процессе образования ферментов в момент рождения животного. Глюкозофосфатдегидрогеназа [1938] и триптофаноксигеназа [1940] отсутствуют у эмбриона морской свинки, но появляются вскоре после рождения. Содержание нуклеотидпирофосфатазы, низкое в печени эмбриона морской свинки, увеличивается к концу внутриутробного периода и достигает высоких значений непосредственно перед рождением [1941]. За этот же период быстро нарастает количество НАДФ·H_2.

Изменение в соотношении различных ферментов на протяжении развития может вызывать изменения в метаболизме. Краль [1456] в исследованиях, проведенных изотопным методом, получил данные о том, что в первые 24 *час* развития оплодотворенного яйца морского ежа наблюдается переключение метаболизма глюкозы с пентозофосфатного пути на путь, ведущий через цикл лимонной кислоты.

Кари и Грэвилль [407] и независимо от них Бранд и Мэлер [310] исследовали ферментативную активность митохондрий на разных стадиях развития эмбриона цыпленка. Из 5-дневного эмбриона можно получить митохондрии, вполне нормальные по виду и способные к нормальному углеводному обмену, но совершенно лишенные способности окислять 3-оксибутират. Способность к окислению жиров появляется у митохондрий на 17-й день развития эмбриона.

Отсутствие в некоторых тканях определенных ферментов, содержащихся в других тканях, естественно, порождает вопрос, почему же все-таки этих ферментов нет, несмотря на то что организм, безусловно, содержит гены, необходимые для их образования. Ведь если фермент внезапно появляется в ткани, в которой его до того не было (как в случаях, рассмотренных выше), то ясно, что его первоначальное отсутствие нельзя приписать отсутствию необходимого гена. Это явление можно было бы, однако, объяснить репрессией под действием метаболитов по механизму, описанному на стр. 436—452. Было высказано предположение, что появление фермента холинэсте-

разы является адаптивной реакцией на продуцирование ацетилхолина во вновь образовавшихся нервных окончаниях.

В одном случае мы располагаем прямым доказательством значения феномена индукции: введение сукцината ускоряет образование сукцинатдегидрогеназы у амблистомы [281]. В то же время упомянутое выше увеличение количества триптофаноксигеназы у морской свинки в момент рождения животного не может быть индуцировано введением триптофана [1939]. Более того, если беременность искусственно укорачивается или удлиняется, то все равно это резкое возрастание уровня триптофаноксигеназы совпадает с ее завершением.

В исследованиях по энзимологии развития определяется обычно суммарное количество фермента. Маркерт и Мёллер [1719] высказали предположение, что и сам характер фермента может меняться в процессе развития, а Каплан и Чиотти [1303] подтвердили это в отношении лактатдегидрогеназы. Они изучили специфичность этого фермента по отношению к четырем аналогам НАД и обнаружили значительные различия между лактатдегидрогеназой из сердца новорожденного и лактатдегидрогеназой из сердца взрослого человека. Те же ферменты можно было различить и иммунологически (см. раздел «*Изоферменты*», *стр.* 567).

Энзимология опухолей

Была проделана большая работа по сравнению метаболизма и ферментного состава в опухолях и нормальных тканях. Предполагалось, что эти исследования могут пролить свет на причину появления рака и способствовать отысканию путей его предупреждения. Большая часть этих исследований описана в книге Гринштейна [917]. Приводимое ниже краткое обобщение полученных результатов базируется на данных этой книги.

Опухоли содержат в основном те же ферменты, что и нормальные ткани, и обмен веществ в ткани опухоли в целом почти не отличается от обмена нормальных тканей. Новых, необычных ферментов в опухолях обнаружено не было; однако некоторые ферменты, присутствующие в тканях, из которых произошла данная опухоль, в самой опухоли могут отсутствовать. Обычно между опухолями и нормальными тканями имеются заметные количественные различия в содержании определенных ферментов. Набор ферментов в опухоли по большей части не зависит от возраста последней, от скорости ее роста, вида и разновидности животного, у которого развилась эта опухоль, и характера ткани, из которой она образовалась. По набору ферментов опухоли отличаются друг от друга гораздо меньше, чем они отличаются от нормальных тканей или чем нормальные ткани отличаются друг от друга. Исходные опухоли могут в какой-то степени сохранять ферментную характеристику тех тканей, из которых эти опухоли произошли; но после нескольких трансплантаций они теряют все специализированные функциональные свойства исходной ткани и приобретают свойства, общие для всех опухолей. Например, в гепатомах отсутствует система ферментов, образующих мочевину; в аденокарциномах желудка отсутствует пепсиногенобразующая система слизистой желудка; высокая активность щелочной фосфатазы и эстеразы, свойственная слизистой кишечника, падает до очень низкого уровня в аденокарциномах кишечника.

По-видимому, в общем можно считать, что активность любого фермента в опухоли хотя и отличается от активности того же фермента в той ткани, из которой эта опухоль образовалась, но все же не настолько, чтобы эти различия выходили за пределы колебаний, обычных для нормальных тканей. Гринштейн делит ферменты опухолей на три категории в зависимости от соотношения между их активностью в опухоли и в нормальной ткани

(не обязательно той, из которой произошла данная опухоль). При этом для нормальной ткани он различает три интервала: верхний, средний и нижний (табл. 64).

Таблица 64

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ОПУХОЛЯХ ГРЫЗУНОВ С АКТИВНОСТЬЮ ТЕХ ЖЕ ФЕРМЕНТОВ В НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЯХ [917]

Ферменты, у которых активность в опухолях соответствует верхнему нормальному интервалу	Ферменты, у которых активность в опухолях соответствует среднему нормальному интервалу	Ферменты, у которых активность в опухолях соответствует нижнему нормальному интервалу
Ксантиноксидаза (1.2.3.2)	Рибонуклеаза (2.7.7.16)	Цитохромоксидаза (1.9.3.1)
Глицилглицин-дипептидаза (3.4.3.1)	Кислая фосфатаза (3.1.3.2)	Каталаза (3.11.1.6)
Ферменты, гидролизующие Бз—Арг—NH_2	Дезоксирибонуклеаза (3.1.4.5 и 6)	Карбоксилэстераза (3.1.1.1)
	Аргиназа (3.5.3.1)	Щелочная фосфатаза (3.1.3.1)
		Аминоацилаза I (3.5.1.b)
		Гомосериндегидратаза (4.2.1.15)

В раковых клетках сохраняются основные системы, необходимые для получения энергии и осуществления процессов роста и воспроизведения. Фактически по своему метаболизму опухоль очень близка к ранней эмбриональной ткани (до начала дифференцировки). Сходство может быть очень большим; так, например, в нормальной лимфатической ткани обмен глюкозы протекает почти исключительно путем «гликолиз — цикл лимонной кислоты», тогда как в клетках лимфосаркомы, как и у эмбрионов на ранних стадиях развития, важную роль играет также превращение глюкозы через фосфоглюконат [2735]. Активность НМН-аденилилтрансферазы (2.7.7.1) в ядрах клеток опухоли молочной железы составляет приблизительно $^1/_4$ активности указанного фермента в ядрах клеток нормальной ткани молочной железы; активность этого фермента в ядрах клеток печени эмбрионов также бывает низкой и возрастает лишь на более поздних этапах развития [311].

Важнейшая характерная черта опухоли с точки зрения энзимологии состоит в том, что клетки ее освобождаются от нормального организующего влияния, определяющего как специализированный характер той ткани, из которой происходит опухоль, так и дифференцировку этой ткани под влиянием веществ, диффундирующих из соседних тканей. По существу, ткань возвращается к состоянию, сходному с тем, в котором она находилась до того, как начало сказываться влияние организаторов, но только теперь она уже не способна к ответной реакции на это влияние, не способна подчиняться контролю. Вполне возможно, что новые данные из области эмбриохимии наряду с более глубоким изучением регулирующего влияния репрессии при образовании ферментов в животных тканях будут способствовать лучшему пониманию этиологии рака.

Развитие опухоли и той или иной ткани организма может оказывать заметное влияние на метаболизм и ферментативную активность других тканей того же организма. Некоторые из наблюдаемых при этом явлений, возможно, представляют собой просто следствие конкуренции за необходимые метаболиты между раковой тканью и другими тканями; однако встречаются также и эффекты, связанные с более непосредственным влиянием. Примером

может служить снижение активности каталазы печени под действием ингибитора, вырабатываемого опухолью и переносимого током крови [1005]. Это вещество удалось частично очистить; анализ показал, что оно имеет низкий молекулярный вес, устойчиво к действию кислот и щелочей и подавляет in vitro активность гемопротеидных ферментов в результате связывания их *геминовой простетической группы*; более точно природа его пока еще не определена. Подобный же ингибитор каталазы был получен из экстракта эмбриона [955]. Существование таких ингибиторов показывает, что не всегда падение активности ферментов, о котором свидетельствует третий столбец табл. 64, связано с уменьшением количества фермента; в отдельных случаях оно может быть вызвано и действием соответствующего ингибитора.

СРАВНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Видовые различия

Теперь мы перейдем к рассмотрению другого аспекта сравнительной биохимии ферментов, а именно к сравнению препаратов того или иного фермента, полученных из разных источников; таким образом мы попытаемся ответить на вопрос о том, зависят ли в какой-либо мере свойства фермента от вида животного, у которого он получен, и от ткани, из которой его выделяют.

До сих пор мы считали, что фермент, выделенный из разных источников, но катализирующий вполне определенную химическую реакцию, должен рассматриваться как одно и то же вещество, если только не имеется четких указаний на различия в специфичности, характере активаторов и т. п. Небольшие различия в физических свойствах, таких, как растворимость, форма кристаллов или электрофоретическая подвижность, не рассматриваются как доказательство существования отдельных, самостоятельных ферментов. Характерно, что в общем каталитические свойства данного фермента, его специфичность, активность, сродство и т. п. меняются очень мало в зависимости от источника. Хотя препараты одного и того же фермента, выделенные из разных источников, и могут несколько отличаться по своим физическим свойствам, но эти отличия обычно несущественны — по главным показателям ферменты одинаковы. Это общеизвестная истина в энзимологии; для всех практических целей источник фермента обычно рассматривают как нечто второстепенное: печень крысы, мышцы кролика, сердце свиньи или пекарские дрожжи часто используются с равным успехом для выделения требуемого фермента. Результаты, полученные с ферментами из столь различных источников, как правило, оказываются одинаковыми, и эти ферменты вполне заменяют друг друга при построении модельных систем.

Итак, первый вопрос сводится к следующему: что имеют в виду, когда говорят, что препараты *фермента из разных источников идентичны*? Имеют ли в виду идентичность только активного центра и примыкающих к нему групп (в таком случае название фермента есть, по сути дела, не что иное, как название определенного активного центра, который может быть присоединен к различным белкам)? Или же подразумевают, что идентичны белки в целом? Исследование одних только каталитических свойств не дает ответа на этот вопрос; нужно исследовать белок, и в частности его аминокислотный состав и последовательность расположения аминокислот

Фермент, выделенный из разных источников, может отличаться формой кристаллов, но это не обязательно говорит о том, что в данном случае имеются какие-либо отличия в белке, так как различные формы кристаллов часто получаются при выделении белка с помощью разных приемов даже из одного и того же препарата. Примеры подобного рода можно найти в Атласе, поме-

щенном в конце книги. Различия по некоторым другим свойствам (растворимость, электрофоретическая подвижность, константа седиментации, иммунологические свойства), если только определения проводились в сравнимых условиях, указывают на то, что строение или состояние пептидных цепей, по всей вероятности, не вполне одинаково. Однако могут существовать и различия, которые невозможно уловить с помощью таких наблюдений. Например, кристаллические пепсины коровы и свиньи удивительно сходны: они обладают одинаковыми каталитическими свойствами, одинаковой формой кристаллов, одинаковой растворимостью, и вряд ли их можно отличить один от другого с помощью иммунологических методов. Тем не менее они не могут быть совершенно идентичными, так как, хотя они и имеют одинаковую растворимость, каждый из них растворяется в насыщенном растворе другого (см. стр. 457). Иммунологический метод дает возможность определять очень небольшие различия между белками и часто позволяет различать ферментные препараты из разных источников, если только эти источники не представлены близкородственными видами. Например, уреазы, выделенные из семян *Soja* и *Canavalia*, представляют собой достаточно сходные белки, так как они дают перекрестную иммунологическую реакцию, и тем не менее количественное проведение реакции преципитации позволяет выявить между ними значительные различия. Так же обстоит дело с каталазой из печени лошади и коровы [1729] и с алкогольдегидрогеназой из пекарских и пивных дрожжей [81]. В то же время фосфорилазы из мышц человека и кролика, по-видимому, идентичны [2953]; идентичны также и карбаматкиназы многих видов, в том числе быка, козы, крысы, кролика, лягушки и черепахи [1731].

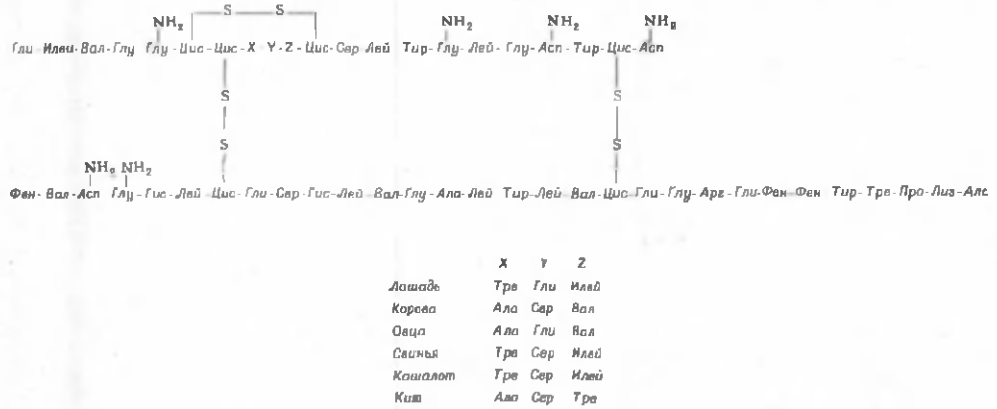
В некоторых случаях вариации в структуре молекул фермента у разных видов таковы, что ведут к значительным различиям в кинетике или специфичности ферментативной реакции. Каплан [1301] исследовал специфичность лактатдегидрогеназ из различных видов по отношению к ряду аналогов НАД и показал наличие таких различий, особенно у ферментов, выделенных из сердца.

Так, например, фермент из камбалы отличается от ферментов, выделенных из других костистых рыб; отношение активностей лактатдегидрогеназ из сердца тунца и из сердца камбалы при действии на пару аналогов НАД равно соответственно 0,34 и 11,2.

Некоторые из этих различий могут быть объяснены просто различным свертыванием пептидных цепей, тогда как в основе других лежат действительные химические отличия, которые можно было бы обнаружить при сравнительном изучении аминокислотного состава и последовательности аминокислот. У ряда ферментов аминокислотный состав в настоящее время уже изучен (см. табл. 31), однако при этом почти не проводилось сравнений между ферментами разных видов. Единственный надежный пример — глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы из дрожжей и из мышц кролика. В этом случае анализы проводились одними и теми же исследователями с помощью одних и тех же методов; результаты анализов совпадают в пределах ошибки опыта. Число пептидных цепей и природа N-концевых аминокислотных остатков (валин) также оказались одинаковыми. Таким образом, у этих двух ферментов сходны не только активные центры, но поразительно сходны также и молекулы белка в целом. Тем не менее они не абсолютно идентичны: ферменту из мышц для сохранения активности необходимы три тиоловые группы, а ферменту из дрожжей — только две. Имеются также различия в сродстве к коферменту и в характере зависимости электрофоретической подвижности от pH и ионной силы.

В табл. 31 приведены также результаты анализа четырех α-амилаз, полученных из различных источников. Здесь мы находим четкие различия в аминокислотном составе, хотя при этом имеется и определенное сходство в общем строении, особенно отчетливо выраженное у двух ферментов живот-

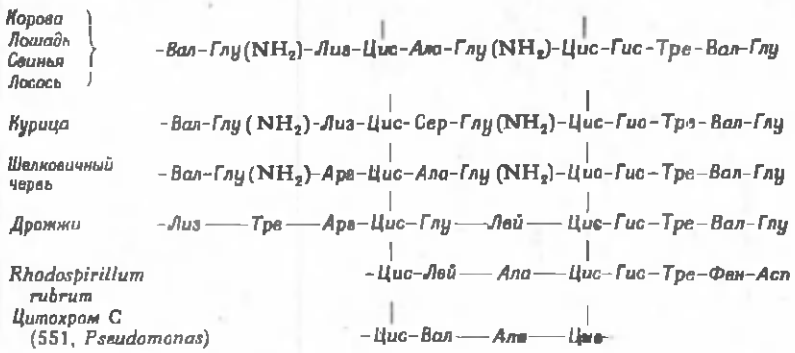
ного происхождения. В состав α-амилазы из термофильных бактерий входит меньше основных аминокислот, но значительно больше пролина и кислых аминокислот, чем в состав α-амилазы из *Bacillus subtilis*; кроме того, у первой из этих двух α-амилаз молекула имеет меньшие размеры. В табл. 31 включены также характеристики мурамидаз из яичного белка и из селезенки кролика; это явно различные белки, с заметной разницей в содержании определенных аминокислот, особенно триптофана и глутаминовой кислоты.



	X	Y	Z
Лошадь	Тре	Гли	Илей
Корова	Ала	Сер	Вал
Овца	Ала	Гли	Вал
Свинья	Тре	Сер	Илей
Кашалот	Тре	Сер	Илей
Кит	Ала	Сер	Тре

Фиг. 143. Структура инсулина у разных видов животных [1009, 1217].

За последние несколько лет было получено большое количество данных о видовых различиях в последовательности аминокислот у белков, не обладающих ферментативными свойствами; данные по этому вопросу собраны



Фиг. 144. Последовательность аминокислот в той части молекулы цитохрома *c*, которая несет простетическую группу (гем) [58, 2047].

в обзоре Шорма [2476]. Обычно бо́льшая часть полипептидной цепи у разных видов одинакова и только в определенных положениях одна аминокислота замещена другой, часто близкородственной. Подобного типа замещения можно наблюдать на примере структуры инсулина из ряда источников (фиг. 143). В-цепь совершенно идентична у инсулинов шести видов животных; А-цепь почти идентична, но у разных видов различаются остатки, обозначенные на фиг. 143 через *X*, *Y* и *Z*.

Палеус и Туппи показали, что в цитохроме *c* геминовая простетическая группа всегда присоединена к двум остаткам цистеина, разделенным двумя другими остатками аминокислот и занимающим почти во всех случаях одинаковое положение в пептидной цепи. При этом у разных видов возможны

варианты, показанные на фиг. 144. Имеющий важное значение остаток гистидина всегда примыкает к одной из цистеиновых групп.

Число взаимозамещений аминокислот в индивидуальных белках, принадлежащих разным видам животных, ограничено. В табл. 65 приведены наиболее часто встречающиеся варианты; из таблицы видно, что во многих случаях аминокислоты, способные к взаимозамещению, в метаболическом отношении родственны.

Таблица 65

НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ ВАРИАНТЫ ВЗАИМОЗАМЕЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В МОЛЕКУЛАХ БЕЛКОВ [2476]

Пары аминокислот	Белок
Глицин ⟷ Серин	Инсулин, гемоглобин
Глицин ⟷ Аспарагиновая кислота	Кортикотропин
Глицин ⟷ Глутаминовая кислота	Гемоглобин
Аланин ⟷ Треонин	Инсулин, сывороточный альбумин
Аланин ⟷ Серин	Цитохром *c*
Валин ⟷ Изолейцин	Инсулин, гипертензин
Серин ⟷ Треонин	Гемоглобин
Серин ⟷ Аспарагиновая кислота	Кортикотропин
Серин ⟷ Глутаминовая кислота	Меланотропин
Глутаминовая кислота ⟷ Лизин	Гемоглобин
Аспарагиновая кислота ⟷ Глутаминовая кислота	Гемоглобин

Можно думать, что различия между ферментами у разных видов животных также связаны с подобными замещениями. Достаточно полные данные такого рода имеются, однако, только для одного случая: Анфинсен и др. [75] сравнили рибонуклеазу овцы с рибонуклеазой быка. Полипептидные цепи этих ферментов идентичны на всем протяжении, за исключением трех участков: треонин в положении 3 рибонуклеазы быка замещен у овцы серином; лизин в положении 37 рибонуклеазы быка замещен у овцы остатком глутаминовой кислоты; во фрагменте, расположенном между остатками 99 и 104, имеется третье замещение, но оно пока еще не уточнено.

Тканевые различия

Интересно, что в некоторых случаях фермент, выделенный из разных тканей у животных одного и того же вида или даже у одного и того же животного, может оказаться неодинаковым. С помощью иммунологических методов удалось выявить различия у фосфорилазы из печени и из сердца собаки [1063], щелочной фосфатазы из тонкого кишечника и из костей человека [2329], α-амилазы из печени, сыворотки крови и поджелудочной железы свиньи [1659], а также у лактатдегидрогеназы из разных тканей кролика [1978] и разных тканей человека [1979]. Фосфорилазы из мышц и печени отличаются по ряду свойств, особенно в том, что касается деталей процессов инактивации и реактивации. Более того, известны такие нарушения метаболизма, при которых фермент мышц не образуется, а фермент печени остается нормальным [1847, 2334]. Поэтому представляется вполне вероятным, что это два разных фермента, образующихся под контролем различных генов.

К такому же выводу пришли Каплан и др. [380] относительно лактатдегидрогеназ из сердца и из скелетных мышц. Различиям в специфичности между лактатдегидрогеназами из сердца разных видов рыб (см. стр. 564)

не соответствуют никакие различия у фермента из скелетных мышц тех же видов. У амфибий также обнаруживаются различия между дегидрогеназами из сердца при идентичности ферментов из скелетных мышц. Лактатдегидрогеназа из сердца лягушки *Rana clamitans* настолько сильно отличается от лактатдегидрогеназ из сердца других амфибий по своим каталитическим, физическим и иммунологическим свойствам, что ее следует считать мутантным ферментом; в то же время фермент, находящийся в скелетной мышце этой лягушки, не отличается от обычного. Следовательно, сердечная и скелетная мышцы содержат ферменты, синтез которых контролируется разными генами.

Число ферментов, исследованных с точки зрения тканевых различий, невелико, и потому мы пока не можем сказать, является ли такая множественность генетического контроля общей закономерностью или, напротив, в какой-то степени исключением.

Изоферменты

Одно из интересных направлений в сравнительной биохимии ферментов, успешно развивавшееся в последние годы (уже после выхода в свет первого издания этой книги), связано с обнаружением множественности молекулярных форм ферментов в одной и той же ткани. Выявлению этой множественности способствовало усовершенствование техники зонального электрофореза, особенно на крахмальном или агаровом геле. Веселл и Берн [2733] и Маркерт и Мёллер [1719] показали, что при электрофорезе нормальной сыворотки человека лактатдегидрогеназная активность обнаруживается в пяти фракциях. Маркерт и Мёллер предложили для таких множественных форм термин «изозимы»; в литературе не менее широко используется также обозначение «изоэнзимы». Авторы данной книги отдают предпочтение термину «изоферменты» [1], который по аналогии с термином «изотопы» яснее выражает существо вопроса. В настоящее время продемонстрировано существование изоформ для нескольких ферментов, в том числе для изоцитрат- и малатдегидрогеназ, аспартат — аммиак-лиазы и рибонуклеазы.

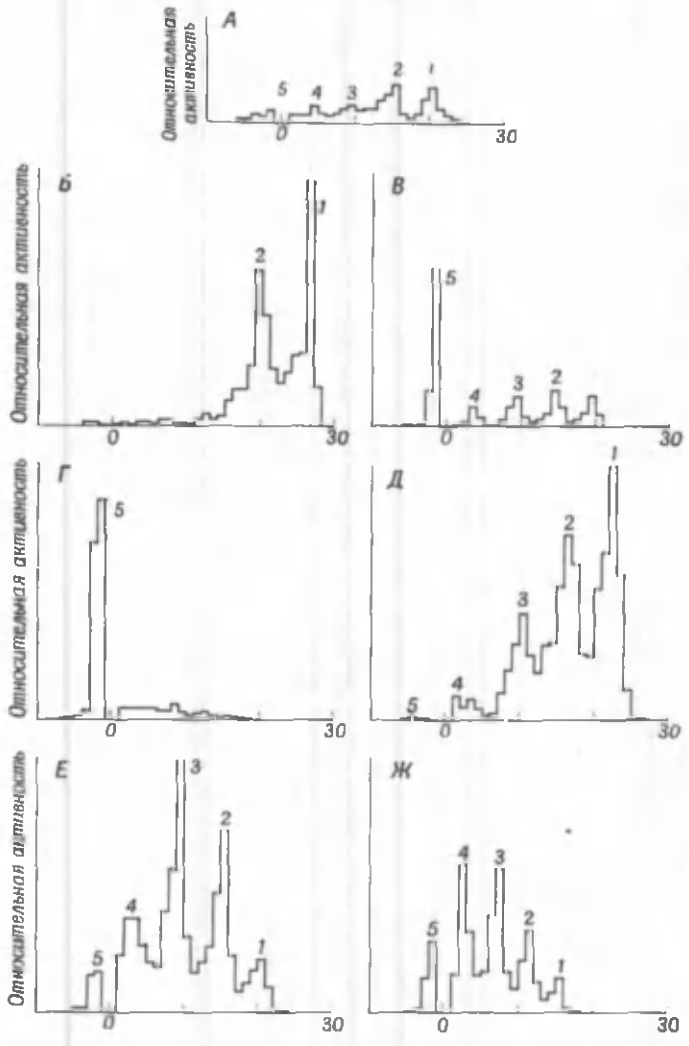
Изоформы данного фермента могут отличаться по своей локализации внутри клетки. Торн [2651] показал, что методом хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе из препаратов печени крыс можно выделить две малатдегидрогеназы. Оба эти фермента катализируют одни и те же реакции, хотя их можно отличить по специфичности в отношении аналогов НАД и по различной чувствительности к ингибирующему действию оксалоацетата. Один из них имеет митохондриальное происхождение и напоминает фермент из митохондрий сердца свиньи; другой обнаруживается в надосадочной фракции.

Изоферменты были продемонстрированы у высших растений и у животных. Пероксидаза репы может быть разделена электрофоретически на четыре формы, несколько отличающиеся одна от другой по величинам pK для групп, входящих в состав активного центра [1170, 2295]. У растений также иногда наблюдаются различия во внутриклеточной локализации изоферментов. Показано, например, что у гороха имеется две малатгидрогеназы. Одна из них находится в митохондриях, а другая — в клеточном соке; эти формы имеют одинаковую специфичность, но их можно разделить на ДЭАЭ-целлюлозе [554].

Набор изоферментов в различных тканях может быть различным, и это очень важно для целей диагностики. На фиг. 145 представлены электрофореграммы лактатдегидрогеназы, полученные на крахмальном геле Вроблевским [2092]. Видно, что каждая ткань характеризуется своим особым распределением пиков; в сердечной мышце содержатся преимущественно изоферменты *1* и *2*, а в печени — почти исключительно изофермент *5*. При заболеваниях,

[1] В оригинале «isoenzymes», но см. примечание к стр. 9.— *Прим. ред.*

приводящих к выхождению фермента из патологически измененной ткани, состав изоферментов плазмы также может меняться в сторону преобладания изоферментов, специфичных для данной ткани. Таким образом, получив электрофореграмму плазмы и установив по ней распределение лактатдегидрогеназы, можно, например, отличить инфаркт миокарда от заболевания печени.



Фиг. 145. Изоформы лактатдегидрогеназы в тканях человека [2092].
А. Плазма. *Б.* Сердце. *В.* Скелетные мышцы. *Г.* Печень. *Д.* Почки. *Е.* Селезенка. *Ж.* Легкие. Изоферменты разделены методом электрофореза на крахмальном геле. По оси абсцисс отложены номера фракций, полученных при электрофорезе (считая от места нанесения). Цифры над кривыми обозначают номера пиков.

В одном случае удалось установить природу химических взаимоотношений между изоферментами. Кан и др. [380] исследовали лактатдегидрогеназы у кур, для которых, как и для некоторых других видов, характерны определенные различия между ферментом, находящимся в сердечной мышце, и ферментом скелетных мышц. Названные авторы, инъецируя эти ферменты кроликам, приготовляли антисыворотки к ферментам («антиферменты») и показали, что два фермента по-разному реагируют с «антиферментом»,

образованным в ответ на введение одного из них (различия носили количественный характер). Авторы наблюдали, что в процессе эмбрионального развития тип фермента грудной мышцы постепенно меняется от «сердечного» к «мышечному». В процессе этого перехода обнаруживаются три формы, промежуточные по своим электрофоретическим и иммунологическим свойствам между «сердечным» типом и типом, характерным для скелетной мышцы. Поскольку никогда не удавалось наблюдать более пяти изоформ лактатдегидрогеназы и поскольку как лактатдегидрогеназа сердца, так и лактатдегидрогеназа мышц диссоциируют в растворе гуанидина и меркаптоэтанола на четыре субъединицы равного молекулярного веса, Кан и его сотрудники предположили, что промежуточные формы фермента представляют собой не что иное, как гибриды, содержащие и «сердечный», и «мышечный» типы субъединиц. Обозначив субъединицы ферментов сердца и скелетной мышцы через C и M соответственно, можно действительно получить пять разных форм: CCCC, CCCM, CCMM, CMMM, MMMM. Образование C- и M-субъединиц контролируется, по-видимому, разными генами. Таким образом, в этом случае существование пяти изоферментов объясняется действием двух генов *в одной клетке*.

Энзимологическая генетика

Как уже указывалось в гл. XI, природа ферментов, которые образуются в данном организме, определяется генами, присутствующими в его хромосомах. Гены не представляют собой чего-то абсолютно неизменного; они могут претерпевать внезапные изменения (мутации) и после этого воспроизводятся уже в измененном виде. Мутации генов обнаруживаются по изменению определенных признаков организма (его фенотипа). Различные формы одного и того же гена, занимающие одно и то же положение в хромосоме, называют «аллелями». Присутствие в хромосомах различных аллелей определяют по изменению формы, внешнего вида или функции всего организма или какой-либо его части. Большое число таких аллельных признаков было обнаружено, например, у дрозофилы (они получили здесь особые названия: vermilion, hairy wing, scute-1, forked, bithoraxoid, star, spineless). Многие из мутаций связаны, вероятно, с какими-то локальными изменениями пигментации или роста клеток, поэтому вполне возможно, что в основе их лежит простое изменение отдельных ступеней в цепи обменных реакций. В других случаях, в частности у мутантов нейроспоры, определенные признаки *действительно связаны с наличием или отсутствием отдельных стадий* обмена; ниже мы обсудим этот вопрос более детально. В 1920 г. Холдейн высказал предположение (см. [980]), что каждый ген «образует определенный химический вид фермента». Эта идея позднее была развита подробно в работах ряда исследователей (в особенности Бидла и его школы [181]), использовавших в качестве объекта изучения нейроспору и другие плесневые грибы. Для общего ознакомления с основами биохимической генетики читатель отсылается к трудам Холдейна [980], Вагнера и Митчелла [2746], Кэтчсайда [416] и Харрис [1008]; механизм эффектов, о которых идет речь, обсуждается в гл. XI. Хотя потенциально этот раздел энзимологии представляется чрезвычайно важным и хотя мы уже сейчас располагаем очень интересными данными на этот счет, из-за недостатка места мы можем коснуться всей проблемы лишь вскользь.

В типичной диплоидной клетке имеется два набора хромосом, полученных один от матери и другой от отца. Таким образом, каждому локусу соответствуют два гена, либо идентичных, либо представляющих собой пару аллелей. Согласно основному закону генетики, для каждой пары аллелей имеется три возможных сочетания. Если обозначить два аллеля данного

гена буквами *A* и *a*, то эти сочетания будут *AA*, *aa* и *Aa*. Можно, казалось бы, ожидать, что три эти комбинации дадут три различных фенотипа, но в действительности это не всегда бывает так. Во многих случаях *AA* и *Aa* дают один и тот же фенотип; тогда говорят, что *A* является доминантным геном, а *a* — рецессивным. Очень часто рецессивный признак, проявляющийся при генотипе *aa*, представляет собой просто отсутствие какого-нибудь определенного качества, имеющегося у двух других форм, например такого качества, как пигментация; рецессивным признаком является, например, альбинизм (отсутствие пигмента). На основании изложенного Бэйтсон и Пуннэт выдвинули гипотезу «присутствия — отсутствия», согласно которой доминантный признак выражает присутствие гена, а рецессивный — его отсутствие. Однако в свете более поздних данных, в особенности же если учесть то, что мы знаем об обратных мутациях, все известные нам факты легче объяснить, предположив, что рецессивный признак возникает не из-за отсутствия гена, а из-за его инертности, иными словами, что аллель *A* продуцирует нечто (например, фермент), тогда как аллель *a* ничего не продуцирует.

Все эти факты совместимы с предположением, о котором мы уже говорили в гл. XI и которое состоит в том, что ген образует матрицу, необходимую для синтеза определенного белка. Если *a* представляет собой аллель *A*, измененный таким образом, что он уже более не может продуцировать активный фермент (хотя, быть может, вместо этого он вырабатывает сходный, но неактивный белок), то фермент будет синтезироваться у организмов с генотипом *AA* и *Aa*, но в случае *aa* он будет отсутствовать. Можно предположить, что в клетках, имеющих два активных гена (т. е. *AA*), будет образовываться больше фермента, чем в клетках с одним активным геном (т. е. *Aa*). Что касается влияния этого обстоятельства на развитие определенного признака, то тут следует различать два возможных случая: один — когда данный фермент играет роль лимитирующего фактора в соответствующей метаболической цепи, и другой — когда тот же фермент присутствует в избытке. Во втором случае скорость общего процесса не будет зависеть от количества фермента (во всяком случае, в достаточно широких пределах), так что конечное действие одного гена *A* будет соответствовать действию двух таких генов, и формы *AA* и *Aa* будут казаться идентичными. Это и есть типичное доминирование. В первом же случае, хотя процесс и может проявиться у гетерозиготной формы *Aa*, он будет здесь менее выраженным из-за того, что количество лимитирующего фермента окажется у нее намного меньшим. Это приведет к образованию промежуточной формы и к неполному доминированию, например к появлению серой окраски вместо черной.

Такие соотношения хорошо иллюстрируются на примере тропинэстеразы у кроликов. Савин и Глик [2311] показали, что этот фермент присутствует в сыворотке не у всех кроликов и что он передается по наследству как отдельный менделирующий признак. Отсутствие фермента представляет собой рецессивный признак, так что форма *aa* фермента не содержит; гетерозиготная форма *Aa* содержит около половины того количества фермента, которое имеется у доминантной гомозиготной формы *AA*. Таким образом, каждый доминантный ген *A* действует вполне (или почти) самостоятельно.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ

В основе большей части ранних работ по энзимологической генетике лежало представление о том, что именно нормальный ген обеспечивает образование фермента и что мутации могут привести к инактивации гена, вследствие которой фермент уже более не будет образовываться. Это вполне согласуется с концепцией, согласно которой ген детерминирует матрицу для синтеза белка; мутация изменяет ген, что должно приводить к изменению матри-

цы, а это в свою очередь приведет к синтезу измененного белка, лишенного каталитической активности. Некоторый свет на природу различий в структуре белка, связанных с изменением генов, проливает изучение видовых различий, которые обсуждались на стр. 563—566.

Исследование структуры гемоглобинов (в особенности работы Ингрэма) показывает, какие изменения в строении белка могут возникать у отдельных видов в результате мутаций. Наименьшее возможное изменение — это, очевидно, замещение одной аминокислоты, но оно может привести к глубоким изменениям в третичной структуре и резко изменить все свойства белковой молекулы. Серповидноклеточная анемия обусловлена одной такой заменой. В организме людей, страдающих этим заболеванием, вследствие присутствия рецессивного гена продуцируется измененный гемоглобин (гемоглобин S).

Гемоглобин	Последовательность аминокислот в β-цепи мутантных гемоглобинов
A (нормальный)	*Вал-Гис-Лей-Тре-Про-Глу-Глу-Лиз*
S (серповидных клеток)	*Вал-Гис-Лей-Тре-Про-Вал-Глу-Лиз*
C	*Вал-Гис-Лей-Тре-Про-Лиз-Глу-Лиз*
G	*Вал-Гис-Лей-Тре-Про-Глу-Гли-Лиз*

Фиг. 146. Аномальные пептиды, выделенные из мутантных гемоглобинов [1103, 1213].

У индивидуумов, гетерозиготных по данному признаку, т. е. несущих оба гена, имеется соответственно и нормальный и серповидноклеточный гемоглобин. Тем не менее анемия у них не выражена; она проявляется только у индивидуумов, гомозиготных по данному рецессивному признаку.

Нормальный и серповидноклеточный гемоглобины почти идентичны по последовательности аминокислот и отличаются только небольшим участком, расположенным у N-конца β-цепи. Соответствующие последовательности аминокислот приведены на фиг. 146; там же указаны и последовательности аминокислот в этом участке у двух других мутантных гемоглобинов. Из фиг. 146 видно, что серповидноклеточный гемоглобин отличается от нормального только замещением двух остатков глутаминовой кислоты на остатки валина (напомним, что интактная молекула содержит две β-цепи). Это изменение (два заряда на молекулу) оказывает большое влияние на физические свойства гемоглобина, в том числе и на растворимость. Известны и другие мутантные гемоглобины; у некоторых из них изменения касаются α-цепи [1214]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что биосинтез четырех цепей гемоглобина контролируется четырьмя различными генами.

Если мутации генов проявляются в подобного рода изменениях белков, то влияние их на активность ферментов будет зависеть от того, в каком месте белка произойдет замена одной аминокислоты на другую. Если замена произойдет в той части молекулы фермента, которая удалена от активного центра, то она, вероятно, не повлияет на каталитическую активность и в обычных условиях может вообще пройти незамеченной. Если же изменение затронет структуру самого активного центра, то оно, вероятно, приведет к полной утрате ферментативной активности. Кроме этих крайних случаев, возможны, очевидно, и такие, когда изменения в ферментном белке, явившиеся результатом мутаций, приведут к определенному изменению каталитических свойств, но без полной потери активности. В настоящее время известен целый ряд таких случаев (см. обзор Финча [730]).

В качестве примера можно указать пантотенатсинтетазу (6.3.2.1) из *E. coli* [1646]. Выделен мутант, обладающий чрезвычайно термолабильной формой этого фермента: у этого мутанта при 35° утрачивается 90% активности в течение 25 *мин*. Фермент мутанта отличается от фермента дикого типа также и ненормально низким сродством к пантоату.

Финч [729, 731] изучил у *Neurospora crassa* мутацию, нарушающую синтез глутаматдегидрогеназы. При облучении ультрафиолетом мутантов, совершенно лишенных способности синтезировать глутаматдегидрогеназу, происходят обратные мутации. В результате образуются различные формы: часть из них продуцирует нормальную L-глутаматдегидрогеназу, тогда как другие продуцируют фермент с пониженной активностью, несколько отличающийся от нормального также и по другим свойствам; этот фермент легко активируется при нагревании или при инкубации с субстратом. Еще один мутант синтезирует измененную глутаматдегидрогеназу, отличающуюся чрезвычайно высокими значениями K_m для всех соединений (в 30 раз превышающими K_m нормального фермента).

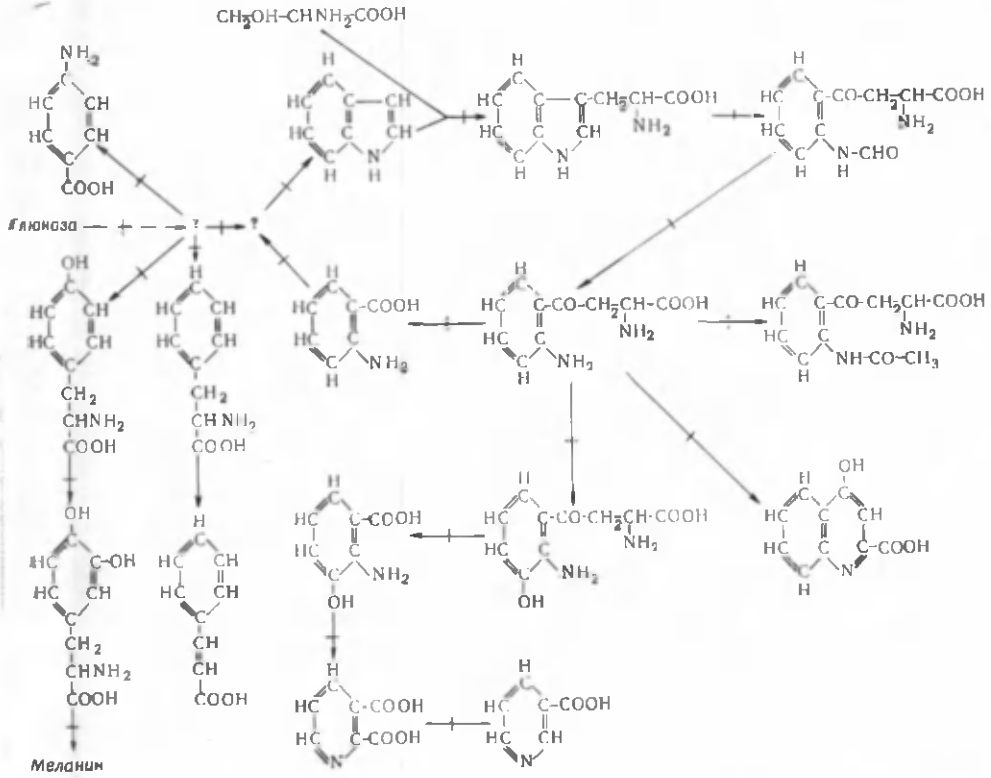
Пример подобной изменчивости, связанный с существованием нескольких аллелей одного и того же гена, был найден и у человека; обнаружилось, что у небольшого числа людей, обладающих повышенной чувствительностью к мышечному релаксанту суксаметонию, холинэстеразная активность сыворотки очень низка. Весьма тщательное обследование населения Канады, проведенное Калоу и др. [1296], показало, что приблизительно у одного человека из 5000 в сыворотке крови содержится измененная холинэстераза: с низкой удельной активностью, низким сродством к субстрату и пониженной чувствительностью к определенным конкурентным ингибиторам. Примерно у 3% обследованного населения свойства сыворотки оказались промежуточными. Опыты с ингибиторами позволяют предполагать, что сыворотка людей этой группы содержит смесь нормальной и модифицированной холинэстераз. Изучение родословных показало, что эти индивидуумы гетерозиготны, т. е. что они обладают и нормальным и модифицированным геном, так что каждый из генов, видимо, самостоятельно продуцирует фермент.

Отдельные изменения в ферментных белках, вызванные изменением гена, могут привести к появлению новых типов ферментативной активности. Ван-Асперен и Оппенурт [2029, 2030, 2715] обнаружили появление фермента, гидролизующего фосфорорганические соединения, у мутантов комнатной мухи, которые приобрели устойчивость к данному типу инсектицидов. Эти мутанты обладали очень низкой карбоксилэстеразной активностью в отношении такого субстрата, как метилбутират. По-видимому, мутация одного гена привела у них к изменению карбоксилэстеразы и превращению ее в новый фермент с чрезвычайно низкой активностью в отношении метилбутирата и относительной нечувствительностью к фосфорорганическим ингибиторам, поскольку он способен гидролизовать их с заметной скоростью. В данном случае также гетерозиготные организмы занимают промежуточное положение и, по-видимому, имеют как нормальный, так и модифицированный фермент.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУТАЦИЙ ДЛЯ ВЫЯСНЕНИЯ ХАРАКТЕРА МЕТАБОЛИЗМА

У высших организмов мутация, приводящая к выпадению какой-либо ферментативной реакции в одной из основных метаболических цепей, обычно бывает летальной, т. е. организм не развивается, и уловить такую мутацию мы поэтому не можем. Мутации, которые мы наблюдаем, связаны с относительно незначительными изменениями, в том числе с так называемыми «врожденными нарушениями обмена» [816], такими, как альбинизм, порфиринемия, алкаптонурия, тирозиноз и цистинурия.

У микроорганизмов мутации, приводящие к утрате фермента, не обязательно оказываются летальными, так как вещество, которое обычно образуется ферментом, отсутствующим у мутанта, можно просто добавить в питательную среду. Это вещество становится теперь необходимым фактором роста. Данное обстоятельство позволило использовать мутантные микроорганизмы для выяснения промежуточных этапов важных обменных процессов путем изучения потребности различных мутантов в отдельных факторах роста. Таким образом, удалось выяснить определенные пути обмена веществ еще до того, как были открыты соответствующие ферменты. Тщательные



Фиг. 147. Биосинтез некоторых ароматических соединений у нейроспоры (схема построена на основе изучения генетических блоков) [2746].

исследования такого рода нередко дают возможность установить число участвующих в том или ином процессе ферментов даже в тех случаях, когда промежуточные стадии еще не известны. Это объясняется тем, что (по крайней мере в изученных случаях) практически каждая ступень обменного процесса блокируется в результате отдельной мутации. Много данных было получено с такими организмами, как *Neurospora*, *Penicillium* и *E. coli*. В цитированных работах [980, 2746] приведен целый ряд схем, показывающих отдельные этапы промежуточного обмена, детально изученные таким способом. В виде примера на фиг. 147 мы воспроизводим часть схемы, иллюстрирующей биосинтез ароматических соединений [2746]. В этой схеме каждая стрелка представляет либо одну ступень, либо несколько последовательных ступеней процесса, а перечеркнутая стрелка указывает на существование мутанта, у которого соответствующая ступень блокирована. Каждая перечеркнутая стрелка означает отдельную и определенную мутацию. Схемы такого рода могут быть очень полезны при поисках новых ферментов.

Происхождение ферментов

В этом заключительном разделе мы хотели бы обсудить вопрос, который, откровенно говоря, носит чисто спекулятивный характер, но который тем не менее представляется нам чрезвычайно важным. Связь между ферментами и жизнью столь неразрывна, что проблема происхождения жизни в значительной степени сводится к проблеме происхождения ферментов. Это одна из наиболее трудных научных проблем, и трудность ее, по-видимому, сильно недооценивается. Рассуждать так, как это делают некоторые, заявляя, что в подходящих условиях жизнь неизбежно должна возникнуть, значит полностью игнорировать всю сложность вопроса. Не вступая в философские дискуссии, попытаемся все же рассмотреть некоторые его аспекты.

Опыт учит нас, что ферменты в настоящее время образуются только живым веществом или очень сложными системами, полученными непосредственно из живых клеток. Мы понемногу начинаем понимать, как это происходит (обсуждению этого вопроса посвящена гл. XI). Образование каждой молекулы фермента зависит от существования целого ряда предобразованных ферментов. Они необходимы для того, чтобы синтезировать аминокислоты, из которых строится ферментный белок, синтезировать различные компоненты нуклеиновой кислоты, которая участвует в этом синтезе, и обеспечить синтез энергией либо за счет расщепления органических молекул, либо за счет процесса фотосинтеза. При наличии таких предобразованных катализаторов образование других ферментов представляется нам понятным; но если ферменты образуются только ферментами, то каким образом могли возникнуть первые ферменты?

Любая теория происхождения жизни должна учитывать удивительное биохимическое единообразие живого вещества во всех его проявлениях. Не только материал, из которого построены все живые клетки, у разных организмов почти одинаков, но даже сложные кофакторы, простетические группы и сами ферменты по существу одинаковы у большей части различных организмов. Это единство, лежащее в основе строения живого мира, простирается даже в область стереохимии. Одни и те же оптические изомеры метаболитов участвуют в промежуточном обмене у всех живых существ, с какими-нибудь ничтожными исключениями; нам неизвестны, например, случаи, когда одни виды использовали бы D-глюкозу, а другие — L-глюкозу. Это, разумеется, является результатом строгой стереоспецифичности ферментов. Стереоспецифичность ферментов связана, вероятно, с асимметрией активного центра, а эта асимметрия зависит в свою очередь от того, что ферменты строятся из оптически активных соединений, а именно, насколько нам известно, исключительно из L-аминокислот.

Характерная для живого вещества асимметрия представляет собой тот трудный пункт, с которым приходится сталкиваться при попытке объяснить происхождение живого вещества, исходя из обычных химических процессов; ведь известно, что в результате таких процессов образуются рацемические смеси изомеров. Для того чтобы обойти эту трудность, выдвигались различные гипотезы: воздействие на фотохимические реакции циркулярно поляризованного света (возможно, образующегося при прохождении сквозь кварцевые кристаллы), происхождение живого вещества из одной-единственной молекулы (которая, разумеется, должна была иметь либо одну, либо другую конфигурацию), раздельная кристаллизация двух изомеров из раствора рацемической смеси или стерически избирательная адсорбция на оптически активных кристаллах кварца. Тот факт, что в живой природе встречается только один тип асимметрии, убедительно говорит о едином происхождении всего живого. Если бы жизнь произошла не в результате единственного и уникального случайного события, то в одних случаях

должна была бы образоваться одна асимметрическая форма, а в других — другая. Таким образом, появление условий, при которых могло возникнуть живое вещество, представляло крайне маловероятное событие во все времена, даже в предбиологический период.

Ряд авторов (например, Опарин [2027], Бернал [232], Блум [276]) *строили гипотезы о характере тех условий и событий*, которые должны были привести к возникновению жизни. Этому же вопросу был посвящен и недавно состоявшийся международный симпозиум [2028]. Для того чтобы доказать возможность образования аминокислот и других сходных соединений в абиотических условиях, было высказано предположение, что в первичной атмосфере Земли отсутствовал кислород, но зато имелась смесь, состоявшая из водорода и различных его соединений, среди которых с точки зрения обсуждаемого вопроса особенное значение имели вода, аммиак и углеводороды. Непрерывно пропуская в течение недели электрическую искру через смесь CH_4, NH_3, H_2O и H_2, нагретую до температуры кипения воды, Миллер [1823, 1824] обнаружил образование небольших количеств глицина, аланина, аспартата, глутамата, аминобутирата, лактата и т. п. (правда, очевидно, в форме рацемических смесей). Можно предположить, что подобные реакции *могли иметь место при грозовых разрядах и что образовавшиеся* продукты растворялись в водоемах, содержавших водные растворы аммиака, нагретые до высокой температуры (возможно, вследствие вулканической деятельности).

Допустим, таким образом, что водный раствор аминокислот так или иначе образовался. Но тут же возникает другая проблема: каким путем могли эти аминокислоты соединиться в молекулы сложных белков или ферментов? Попробуем для начала выяснить, не может ли такая реакция произойти только на основе закона действия масс. Для простоты расчета предположим, что мы имеем равные количества всех аминокислот и что все пептидные связи имеют одинаковую свободную энергию гидролиза. Приняв ее равной 1400 *кал* на одну связь [1], мы найдем, что константа гидролиза каждой связи будет равна 10. Равновесная концентрация для пептида, содержащего n аминокислотных остатков на молекулу, может быть найдена по уравнению

$$[P_n] = c^n K^{-(n-1)}, \qquad \text{(XIII.5)}$$

где c — равновесная концентрация каждой свободной аминокислоты и K — константа равновесия для гидролиза пептидной связи. Если предположить, что концентрация каждой свободной аминокислоты поддерживается равной 1 M, то равновесная концентрация белка, состоящего из 100 аминокислотных остатков (мол. вес $\approx$ 12 000), будет равна 10^{-99} M, что соответствует 1 молекуле в объеме, равном 10^{60} объемов земного шара!

Это, по-видимому, исключает возможность образования какого-либо белка по закону действия масс даже в присутствии катализатора, который приводит систему в состояние равновесия. Однако концентрация, рассчитанная по уравнению (XIII.5), есть концентрация каждого отдельного вида молекул пептида, содержащего n остатков. Если в системе присутствует только одна аминокислота, то это и будет общая концентрация белка, содержащего n аминокислотных остатков в молекуле; но если в реакции участвует несколько разных аминокислот, то будет образовываться много разных видов молекул n-пептида и общая концентрация n-пептида будет равна сумме концентраций всех этих отдельных видов.

Обозначим *число всех присутствующих* аминокислот через a; тогда число всех видов n-пептида, которое может из них образоваться, будет равно a^n.

[1] Эту величину почти с уверенностью можно считать низкой; $-\Delta F^\circ$ при 37° варьирует у разных пептидов от низких значений до 4000 *кал*, будучи в среднем равно приблизительно 3500 *кал* для гидролиза дипептидов [294]. Мы приняли $-\Delta F^\circ = 1400$ *кал* исключительно для удобства расчета.

Общую концентрацию n-пептида в момент равновесия можно найти по уравнению

$$\Sigma [P_n] = a^n c^n K^{-(n-1)} = \left(\frac{ac}{K}\right)^n \cdot K. \qquad \text{(XIII.6)}$$

Если $ac/K < 1$, то находящаяся в равновесии система будет содержать в основном свободные аминокислоты и только следы олигопептидов; но если $ac/K > 1$, то $\Sigma [P_n]$ будет *возрастать* с увеличением n и система, находящаяся в равновесии, будет состоять в основном из высокомолекулярных белков. Это объясняется огромным числом возможных сочетаний для случая, когда n велико. Если в системе присутствует 20 аминокислот и K принимается равным 10, то синтез белка может происходить, когда c поддерживается равным $M/2$.

Отсюда следует, что если концентрация свободных аминокислот поддерживается на достаточно высоком уровне, то вероятность образования белка представляет собой вполне реальную величину (хотя, конечно, вероятность образования какого-либо определенного белка будет при этом выражаться исчезающе малой величиной). Приведенные выше расчеты, конечно, нереальны, так как поставленные условия никогда не могут быть достигнуты (например, количество вещества на Земле недостаточно, чтобы образовать даже по одной молекуле каждого из возможных белков [1]); фактически в любой момент времени будет существовать скорее стационарное, нежели равновесное состояние.

Какие факторы могли бы способствовать увеличению вероятности спонтанного образования ферментов или других белков? Локальное повышение концентрации аминокислот при испарении раствора в водоеме, адсорбция на поверхности илистых частиц [232] или удаление различными способами образующихся продуктов (адсорбция, выпадение осадка, взаимное осаждение белков, возможно в виде коацерватов) — все это должно было бы приводить к увеличению количества образующегося белка. Равновесие могло бы быть также сдвинуто за счет поглощения фотохимической энергии. Не обязательно именно свободные аминокислоты были теми структурными единицами, из которых образовался первичный белок; такими единицами вполне могли послужить богатые энергией производные (например, амиды), которые могли образовываться вместо свободных аминокислот под влиянием интенсивной ультрафиолетовой радиации при отсутствии кислорода в атмосфере. Однако действие облучения часто бывает разрушительным, а не созидательным, и действительно ферменты обычно инактивируются под действием ультрафиолетовых лучей.

Предположим все-таки, что в какой-то момент белки появились на Земле. Но даже если они обладали ферментативными свойствами, то непонятно все же, почему их активности могли как-то согласоваться друг с другом, и в высшей степени неправдоподобно, чтобы они, эти биокатализаторы, могли образовать непрерывную цепь, подобную той, какая, как мы видели, необходима для улавливания энергии и ее использования в реакциях биосинтеза, являющихся основой жизни. А ведь даже и один-единственный пробел препятствует развитию всей системы. Разумеется, такая цепь могла бы возникнуть в результате процесса последовательной индукции, но это может произойти только при наличии уже действующего механизма, т. е. полной

[1] Количество белка с молекулярным весом 60 000, по весу равное земному шару, будет содержать $6 \cdot 10^{46}$ молекул. Число возможных белков с таким молекулярным весом равно 10^{650}. Поэтому в каждый данный момент времени может существовать не более чем один из 10^{603} возможных белков. Таким образом, *случайное* одновременное образование двух или более молекул любого данного фермента представляется совершенно неправдоподобным.

сложной системы, способной осуществлять индуцированный синтез ферментов.

Нестабильность, присущую живому, также необходимо учитывать, так как она означает потребность в непрерывном притоке энергии для поддержания данной системы. Пока формирование системы не завершено, т. е. пока она не приобрела способности к продуцированию энергии для удовлетворения собственных нужд, она может иметь выраженную тенденцию к дезинтеграции; *даже живые клетки, на современном высоком уровне организации*, ведут себя именно так, когда приток энергии отключается.

Остается еще один вопрос (коль скоро мы допускаем, что жизнь первоначально возникла в океане) — как же удерживались вместе отдельные компоненты системы до тех пор, пока не образовалась клеточная мембрана? Если только эти компоненты не присутствовали в самом океане в достаточно высокой концентрации (в таком случае сам океан должен был представлять *собой одну гигантскую живую клетку*!), *то они должны были быстро* рассеиваться, как это происходит и сейчас при разрушении клеточной мембраны; подобные системы должны были бы погибать в результате «летального разбавления». Но образование клеточной мембраны предполагает наличие системы, уже обладающей высокой степенью организации.

Таким образом, вопрос о происхождении ферментов, как и вопрос о происхождении жизни — что по существу почти одно и то же, — состоит *из сплошных трудностей. Мы можем с полным правом перенести на* ферменты то, что Гопкинс [1156] сказал о жизни, назвав ее возникновение «самым невероятным и самым значительным событием в истории Вселенной» [1].

[1] См. по этому поводу A. Oparin «Advances in Enzymology», Ed. F. Nord. vd. XXVII, p. 347 (1965).— *Прим. ред.*

СПИСОК ФЕРМЕНТОВ

(включает большую часть ферментов, идентифицированных к середине 1962 г.)

В первой графе указан номер (шифр) фермента (для тех ферментов, которым шифр еще не присвоен, приведены временные номера, оканчивающиеся буквой). Во второй графе приведены систематические названия ферментов, принятые Комиссией по ферментам. Исключение составляют названия, обозначенные курсивом; это названия, предложенные авторами книги (при составлении их авторы руководствовались «Правилами систематической и тривиальной номенклатуры»; стр. 154—161). В третьей графе даны тривиальные названия, которые используются в этой книге. В четвертой графе указана природа простетической группы (Фл означает, что фермент является флавопротеидом, Г — гемопротеидом, Бт — что фермент содержит связанный биотин, Cu, Zn, Fe и т. п.— что он содержит эти металлы, и М — что он содержит неидентифицированный металл); в той же графе в квадратных скобках указаны необходимые *кофакторы* (*Аск — аскорбиновая кислота*, S — сульфгидрильное соединение, Гл — восстановленный глутатион, ПФ — пиридоксальфосфат, Ф — фосфат, ФФ — пирофосфат, Т — тиаминпирофосфат, B_{12} — кофермент B_{12}; M^{2+} указывает, что фермент активируется ионами двухвалентных металлов, и А — что он активируется различными анионами). В пятой графе приведена реакция, на основании которой ферменту присвоено данное систематическое название. В шестой графе *указаны источники, из которых был получен фермент*, и кратко охарактеризована его специфичность. В седьмой графе перечислены избранные работы по данному ферменту (список неполон, но он может помочь тем, кто желает получить дополнительную информацию о том или ином ферменте). Буква К под шифром фермента указывает, что данный фермент был получен в кристаллическом виде (фотографии кристаллов приведены в Атласе кристаллических ферментов, помещенном в конце книги).

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
1. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ			
1.1. Действуют на CH—OH-группу доноров			
1.1.1 Акцептором служит НАД или НАДФ			
1.1.1.1 **К**	Алкоголь:НАД — оксидоредуктаза	Алкогольдегидрогеназа	Zn
1.1.1.2	Алкоголь:НАДФ — оксидоредуктаза	Алкогольдегидрогеназа	
1.1.1.a	*Аллил-алкоголь: НАДФ — оксидоредуктаза*	Аллилалкогольдегидрогеназа	
1.1.1.3	L-гомосерин:НАД — оксидоредуктаза	Гомосериндегидрогеназа	
1.1.1.4	2,3-бутилепгликоль: НАД — оксидоредуктаза	Бутиленгликольдегидрогеназа	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Алкоголь + НАД = Альдегид или Кетон + НАД·H_2	Дрожжи, некоторые ткани животных Действует на первичные или вторичные спирты и полуацетали; фермент животных тканей действует также на циклические спирты; дрожжевой фермент действует также на D-лактат	[288, 535, 536, 1044, 1357, 1800, 1935, 2013, 2149, 2629, 2716]
Алкоголь + НАДФ = Альдегид + НАДФ·H_2	Бактерии Действует только на первичные спирты	[590, 2612]
Аллилалкоголь + НАДФ = Акролеин + НАДФ·H_2	Бактерии Действует медленно на насыщенные первичные спирты	[2037]
L-гомосерин + НАД = β-Полуальдегид L-аспарагиновой кислоты + НАД·H_2	Дрожжи, плесневые грибы Реагирует также с НАДФ, но медленнее. Фермент *Neurospora* действует также на высшие гомологи серина	[256, 2955]
2,3-Бутиленгликоль + НАД = Ацетоин + НАД·H_2	Бактерии	[2550]

1.1.1.5	Ацетоин:НАД — оксидоредуктаза	Ацетоиндегидрогеназа
1.1.1.b	*1,2-пропандиол: НАДФ — оксидоредуктаза*	Лактальдегидредуктаза
1.1.1.6	Глицерол:НАД — оксидоредуктаза	Глицеролдегидрогеназа
1.1.1.7	1,2-пропандиол-1-фосфат:НАД — оксидоредуктаза	Пропандиолфосфатдегидрогеназа
1.1.1.8 К	L-глицерол-3-фосфат:НАД — оксидоредуктаза	Глицерофосфатдегидрогеназа
1.1.1.c	*Рибитол:НАД — оксидоредуктаза*	Рибитолдегидрогеназа
1.1.1.9	Ксилитол:НАД — оксидоредуктаза (образующая D-ксилулозу)	D-ксилулозоредуктаза
1.1.1.10	Ксилитол:НАДФ — оксидоредуктаза (образующая L-ксилулозу)	L-ксилулозоредуктаза
1.1.1.11	D-арабитол:НАД — оксидоредуктаза	D-арабитолдегидрогеназа
1.1.1.12	L-арабитол:НАД — оксидоредуктаза (образующая L-ксилулозу)	L-арабитолдегидрогеназа

[1] Названия спиртов даны в Списке ферментов в соответствии

Ацетоин + НАД = Диацетил + + НАД·H_2	Бактерии	[2550]
1,2-пропандиол + НАДФ = Альдегид L-молочной кислоты + НАДФ·H_2	Ткани животных	[954]
Глицерол D + НАД = Диоксиацетон + НАД·H_2	Бактерии Действует также на 1,2-пропандиол	[94, 370, 1593]
1,2-пропандиол-1-фосфат + + НАД = Ацетолфосфат + + НАД·H_2	Ткани животных	[2370]
L-глицерол-3-фосфат + НАД = Диоксиацетонфосфат + + НАД·H_2	Ткани животных Действует также на 1,2-пропандиолфосфат	[159, 1821]
Рибитол + НАД = D-рибулоза + НАД·H_2	Бактерии	[1136, 1987, 2913]
Ксилитол + НАД = D-ксилулоза + НАД·H_2	Ткани животных, плесневые грибы, бактерии Действует также как L-эритрулозоредуктаза	[444, 1093, 1237]
Ксилитол + НАДФ = L-ксилулоза + НАДФ·H_2	Ткани животных, плесневые грибы	[444, 1093, 1136, 2672]
D-арабитол + НАД = L-ксилулоза + НАД·H_2	Бактерии	[1592, 2913]
L-арабитол + НАД = L-к-силулоза + НАД·H_2	Плесневые грибы	[444, 445]

женевской номенклатурой, т. е. так, как они вошли в названия ферментов.— *Прим. ред.*

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.1.1.13	L-арабитол:НАД — оксидоредуктаза (образующая L-рибулозу)	L-арабитолдегидрогеназа		L-арабитол + НАД = L-рибулоза + НАД·H_2	Плесневые грибы	[445]
1.1.1.14	L-идитол:НАД — оксидоредуктаза	L-идитолдегидрогеназа		L-идитол + НАД = L-сорбоза + НАД·H_2	Ткани животных, бактерии Действует также на D-глюцитол (образуя D-фруктозу) и на другие близкородственные сахароспирты	[258, 673, 1649, 2663, 2872]
1.1.1.15	D-идитол:НАД — оксидоредуктаза	D-идитолдегидрогеназа		D-идитол + НАД = D-сорбоза + НАД·H_2	Бактерии Превращает также ксилитол в L-ксилулозу и L-глюцитол в L-фруктозу	[2381]
1.1.1.16	Галактитол:НАД — оксидоредуктаза	Галактитолдегидрогеназа		Галактитол + НАД = D-тагатоза + НАД·H_2	Бактерии Превращает также в соответствующие сахара другие полиолы, в молекуле которых имеется смежная с первичной спиртовой группой L-*трео*-конфигурация	[2381]
1.1.1.17	D-маннитол-1-фосфат:НАД — оксидоредуктаза	Маннитол-1-фосфатдегидрогеназа		D-маннитол-1-фосфат + НАД = D-фруктозо-6-фосфат + + НАД·H_2	Бактерии, дрожжи	[1726, 2898, 2899]
1.1.1.18	*мио*-Инозитол:НАД — оксидоредуктаза	Инозитолдегидрогеназа		*мио*-Инозитол + НАД = 2-оксо-*мио*-инозитол + + НАД·H_2	Бактерии	[865, 1520]
1.1.1.19	L-гулонат:НАДФ — оксидоредуктаза	Глюкуронатредуктаза		L-гулонат + НАДФ = D-глюкуронат + НАДФ·H_2	Печень, дрожжи Восстанавливает также D-галактуронат	[2421, 2950]

1.1.1.20	L-гулоно-γ-лактон: НАДФ — оксидоредуктаза	Глюкуронолактонредуктаза	
1.1.1.d	*D-маннонат: НАД — оксидоредуктаза*	Фруктуронатредуктаза	
1.1.1.e	*D-альтронат: НАД — оксидоредуктаза*	Тагатуронатредуктаза	
1.1.1.21	Полиол:НАДФ — оксидоредуктаза	Альдозоредуктаза	
1.1.1.22	УДФ-глюкоза: НАД — оксидоредуктаза	УДФГ-дегидрогеназа	
1.1.1.23	L-Гистидинол: НАД — оксидоредуктаза	Гистидинолдегидрогеназа	
1.1.1.24	Хинат:НАД — оксидоредуктаза	Хинатдегидрогеназа	
1.1.1.25	Шикимат:НАДФ — оксидоредуктаза	Шикиматдегидрогеназа	
1.1.1.26 К	Гликолат:НАД — оксидоредуктаза	Гликолатредуктаза	[A]
1.1.1.27 К	L-лактат:НАД — оксидоредуктаза	Лактатдегидрогеназа	Zn

L-гулоно-γ-лактон + НАДФ = D-глюкуроно-γ-лактон + + НАДФ·H_2	Ткани животных	[2576]
D-маннонат + НАД = D-фруктуронат + НАД·H_2	Бактерии Восстанавливает также D-тагатуронат Семенные пузырьки, плацента	[1094, 1379]
D-альтронат + НАД = D-тагатуронат + НАД·H_2	Бактерии	[1094]
Полиол + НАДФ = Альдоза + + НАДФ·H_2	Семенные пузырьки, плацента Специфичность широкая	[1086]
УДФ-глюкоза + 2НАД + + H_2O = УДФ-глюкуронат + 2НАД·H_2	Печень	[1769, 2559, 2560]
L-гистидинол + 2НАД = L-гистидин + 2НАД·H_2	Плесневые грибы, дрожжи, бактерии Окисляет также L-гистидиналь	[8, 9]
Хинат + НАД = 5-дегидрохинат + НАД·H_2	Бактерии	[1840]
Шикимат + НАДФ = 5-дегидрошикимат + НАДФ·H_2	Растения, дрожжи, бактерии	[144, 1840, 2941]
Гликолат + НАД = Глиоксилат + НАД·H_2	Растения Восстанавливает глиоксилат в гликолат и оксипируват в D-глицерат	[2964, 2965]
L-лактат + НАД = Пируват + + НАД·H_2	Ткани животных, бактерии Окисляет также другие L-2-оксимонокарбоновые кислоты; реагирует и с НАДФ, но медленнее	[593, 829, 1476, 1780, 2544, 2712]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.1.1.28	D-лактат:НАД — оксидоредуктаза	D-лактатдегидрогеназа		D-лактат + НАД = Пируват + + НАД·H_2	Бактерии	[593]
1.1.1.f	*3-оксипропионат: НАД — оксидоредуктаза*	3-оксипропионатдегидрогеназа		3-оксипропионат + НАД = Полуальдегид малоновой кислоты + НАД·H_2	Ткани животных, бактерии	[592]
1.1.1.29	D-глицерат:НАД — оксидоредуктаза	Глицератдегидрогеназа		D-глицерат + НАД = Оксипируват + НАД·H_2	Высшие растения	[1148, 2502]
1.1.1.g К	*D-глицерат: НАД(Ф) — оксидоредуктаза*	Редуктаза полуальдегида тартроновой кислоты		D-глицерат + НАД(Ф) = Полуальдегид тартроновой кислоты + НАД(Ф)·H_2	*Pseudomonas*	[875]
1.1.1.30	D-3-оксибутират: НАД — оксидоредуктаза	3-оксибутиратдегидрогеназа	[S, лецитин]	D-3-оксибутират = НАД = Ацетоацетат + НАД·H_2	Ткани животных, бактерии Окисляет также другие 3-оксимонокарбоновые кислоты	[901, 1536, 2365]
1.1.1.31	3-оксиизобутират: НАД — оксидоредуктаза	3-оксиизобутиратдегидрогеназа		3-оксиизобутират + НАД = Полуальдегид метилмалоновой кислоты + НАД·H_2	Ткани животных, плесневые грибы, бактерии	[2234]
1.1.1.h	*4-оксибутират: НАД — оксидоредуктаза*	4-оксибутиратдегидрогеназа		4-оксибутират + НАД = Полуальдегид янтарной кислоты + НАД·H_2	Бактерии	[1970]
1.1.1.32	Мевалонат:НАД — оксидоредуктаза	Мевальдатредуктаза		Мевалонат + НАД = Мевальдат + НАД·H_2	Печень	[2330]
1.1.1.33	Мевалонат:НАДФ — оксидоредуктаза	Мевальдатредуктаза		Мевалонат + НАДФ = Мевальдат + НАДФ·H_2	Ткани животных, дрожжи	[497]
1.1.1.34	Мевалонат:НАДФ — оксидоредуктаза (ацилирующая КоА)	Оксиметилглутарил-КоА — редуктаза		Мевалонат + КоА + 2НАДФ = 3-окси-3-метилглутарил-КоА + 2НАДФ·H_2	Дрожжи	[355, 661, 1403]

1.1.1.35 К	L-3-оксиацил-КоА: НАД — оксидоредуктаза	3-оксиацил-КоА — дегидрогеназа	
1.1.1.36	D-3-оксиацил-КоА: НАДФ — оксидоредуктаза	Ацетоацетил-КоА — редуктаза	
1.1.1.37 К	L-малат:НАД — оксидоредуктаза	Малатдегидрогеназа	
1.1.1.38	L-малат:НАД — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)	Малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) (ранее известная как «малик-фермент»)	[Mn^{2+}, K^+]
1.1.1.39	L-малат:НАД — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)	Малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) (ранее известная как «малик-фермент»)	[M^{2+}]
1.1.1.40	L-малат:НАДФ — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)	Малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) (ранее известная как «малик-фермент»)	[Mn^{2+}]

L-3-оксиацил-КоА + НАД = 3-оксоацил-КоА + НАД·H_2	Ткани животных Окисляет также S-3-оксиацил-N-ацилтиоэтаноламин и S-3-оксиацилгидролиноевую кислоту Фермент сердца действует также с НАДФ, но медленнее	[1535, 1641, 2515, 2755]
D-3-оксиацил-КоА + НАДФ = 3-оксоацил-КоА + НАДФ·H_2	Печень	[2754]
L-малат + НАД = Оксалоацетат + НАД·H_2	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии Окисляет также некоторые другие 2-оксидикарбоновые кислоты	[555, 697, 2546, 2651, 2652, 2895]
L-малат + НАД = Пируват + CO_2 + НАД·H_2	Бактерии Декарбоксилирует также добавленный оксалоацетат	[1320]
L-малат + НАД = Пируват + CO_2 + НАД·H_2	*Ascaris* Не декарбоксилирует добавленный оксалоацетат	[2315]
L-малат + НАДФ = Пируват + CO_2 + НАДФ·H_2	Ткани животных, растения Декарбоксилирует также добавленный оксалоацетат	[1000, 2010, 2279, 2531, 2763]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.1.1.41	L_s-изоцитрат: НАД — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)	Изоцитратдегидрогеназа	$[Mn^{2+}]$	L_s-изоцитрат [1] + НАД = 2-оксоглутарат + CO_2 + НАД·H_2	Ткани животных, плесневые грибы, дрожжи Не декарбоксилирует добавленный оксалосукцинат	[1436, 2096, 2165]
1.1.1.42	L_s-изоцитрат: НАДФ — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)	Изоцитратдегидрогеназа	$[Mn^{2+}]$	L_s-изоцитрат + НАДФ = 2-оксоглутарат + CO_2 + + НАДФ·H_2	Широко распространен Декарбоксилирует также добавленный оксалосукцинат	[23, 1890, 1892, 1893, 2165, 2401, 2402]
1.1.1.43	6-фосфо-D-глюконат: НАД(Ф) — оксидоредуктаза	Фосфоглюконатдегидрогеназа		6-фосфо-D-глюконат + + НАД(Ф) = 6-фосфо-2-оксо-D-глюконат + НАД(Ф)·H_2	Бактерии	[768]
1.1.1.44 К	6-фосфо-D-глюконат: НАДФ — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)	Фосфоглюконатдегидрогеназа (декарбоксилирующая)		6-фосфо-D-глюконат + + НАДФ = D-рибулозо-5-фосфат + CO_2 + НАДФ·H_2	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии	[607, 2105, 2356, 2357]
1.1.1.45	*L-3-оксикислота: НАД — оксидоредуктаза*	Дегидрогеназа 3-оксикислот (ранее известная как L-гулонатдегидрогеназа)		L-гулонат + НАД = 3-оксо-L-гулонат + НАД·H_2	Почки	[2433]
1.1.1.46	L-арабиноза:НАД — оксидоредуктаза	L-Арабинозодегидрогеназа		L-арабиноза + НАД = L-арабоно-γ-лактон + НАД·H_2	Бактерии	[2825]
1.1.1.47	β-D-глюкоза: НАД(Ф) — оксидоредуктаза	Глюкозодегидрогеназа		β-D-глюкоза + НАД(Ф) = D-глюконо-δ-лактон + + НАД(Ф)·H_2	Печень Окисляет также D-ксилозу	[330, 2551]
1.1.1.48	D-галактоза:НАД — оксидоредуктаза	Галактозодегидрогеназа		D-галактоза + НАД = D-галактоно-γ-лактон + НАД·H_2	Бактерии	[588]

1.1.1.49 К	D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ — оксидоредуктаза	Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа
1.1.1.50	3-α-оксистероид: НАД(Ф) — оксидоредуктаза	3-α-оксистероид-дегидрогеназа
1.1.1.i	*Эстрадиол: НАД — 17-β-оксидоредуктаза*	Эстрадиол-17-β-дегидрогеназа
1.1.1.j	*17-β-оксистероид: НАД — 17-β-оксидоредуктаза*	Тестостерон-17-β-дегидрогеназа
1.1.1.k	*17-β-оксистероид: НАДФ — 17-β-оксидоредуктаза*	Тестостерон-17-β-дегидрогеназа
1.1.1.51	3-(или 17-)-β-оксистероид: НАД(Ф) — оксидоредуктаза	β-Оксистероид-дегидрогеназа
1.1.1.52	3-α-оксихоланат: НАД — оксидоредуктаза	α-Оксихоланат-дегидрогеназа
1.1.1.53 К	*20-дигидрокортизон: НАД — оксидоредуктаза*	Кортизонредуктаза
1.1.1.1	*Пиридоксин: НАДФ — оксидоредуктаза*	Пиридоксиндегидрогеназа

[1] Согласно стереохимической конвенции, предложенной Н. В.

D-глюкозо-6-фосфат + + НАДФ = D-глюконо-δ-лактон-6-фосфат + + НАДФ·H_2	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии Препараты из некоторых видов бактерий восстанавливают наряду с НАДФ также и НАД	[849, 1276, 1725, 1986, 2356]
Андростерон + НАД(Ф) = Андростан-3,17-диол + + НАД(Ф)·H_2	Печень, бактерии Действует также на другие 3-α-оксистероиды	[1414, 1713, 2608, 2666]
Эстрадиол + НАД = Эстрон + + НАД·H_2	Ткани животных	[1514]
Тестостерон + НАД = Δ^5-Андростен-3,17-диол + НАД·H_2	Ткани животных	[695, 1414, 2582, 2736]
Тестостерон + НАД = Δ^5Андростен-3,17-диол + НАД·H_2	Ткани животных	[695, 1414, 2582, 2736]
Тестостерон + НАД(Ф) = Δ^5-Андростен-3,17-диол + + НАД(Ф)·H_2	Дрожжи, бактерии Действует также на другие 3-β- и 17-β-оксистероиды	[1642, 1712, 1713, 2606, 2608, 2609]
3-α-оксихоланат + НАД = 3-оксохоланат + НАД·H_2	Бактерии Действует также на другие 3-α-оксистероиды с кислотной боковой цепью	[1039]
20-дигидрокортизон + НАД = Кортизон + НАД·H_2	Ткани животных Действует также на другие 17,20,21-триоксистероиды	[413, 1179, 1642, 2193, 2862]
Пиридоксин + НАДФ = Пиридоксаль + НАДФ·H_2	Дрожжи Окисляет также пиридоксин-фосфат	[1150]

Vickery (J. Biol. Chem., 237, 1739, 1962).— *Прим. ред.*

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
1.1.1.m	*10-оксидеканоат: НАД — оксидоредуктаза*	ω-Оксидеканоатдегидрогеназа	
	1.1.2 Акцептором служит цитохром		
1.1.2.1	L-глицерол-3-фосфат:цитохром-*c* — оксидоредуктаза	Глицерофосфатдегидрогеназа	
1.1.2.2	D-маннитол:цитохром — оксидоредуктаза	Маннитолдегидрогеназа	
1.1.2.3 К	L-лактат:цитохром-*c* — оксидоредуктаза	Лактатдегидрогеназа (цитохром b_2)	Фл, Г
1.1.2.4	*D-лактат:цитохром-c — оксидоредуктаза*	D-Лактатдегидрогеназа	Фл, Zn
	1.1.3 Акцептором служит O_2		
1.1.3.1 К	Гликолат:O_2 — оксидоредуктаза	Гликолатоксидаза	Фл
1.1.3.2 К	L-лактат:O_2 — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)	Лактатоксидаза	Фл

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
10-оксидеканоат + НАД = 10-оксодеканоат + НАД·H_2	Ткани животных Также действует (более медленно) на 9-оксинонаноат и 11-оксиундеканоат	[1841]
L-глицерол-3-фосфат + Феррицитохром *c* = Диоксиацетонфосфат + Ферроцитохром *c*	Ткани животных	[2224]
D-маннитол + Феррицитохром = D-фруктоза + Ферроцитохром	Бактерии Окисляет также эритритол, D-сорбитол, D-арабитол и рибитол	[86]
L-лактат + Феррицитохром *c* = Пируват + Ферроцитохром *c*	Дрожжи, бактерии	[82, 83, 119, 1880, 1881]
D-лактат + Феррицитохром *c* = Пируват + Ферроцитохром *c*	Дрожжи	[927, 928, 929, 2001]
Гликолат + O_2 = Глиоксилат + H_2O_2	Печень, растения Окисляет также (медленнее) L-лактат и глиоксилат	[788, 1486, 2216, 2967]
L-лактат + O_2 = Ацетат + + CO_2 + H_2O_2	Бактерии	[2574]

1.1.3.3	L-малат:O_2 — оксидоредуктаза	Малатоксидаза	
1.1.3.a	*Арил-алкоголь:O_2 — оксидоредуктаза*	Арилалкогольоксидаза	
1.1.3.b	*L-гулоно-γ-лактон:O_2 — оксидоредуктаза*	L-гулонолактоноксидаза	
1.1.3.4 К	β-D-глюкоза:O_2 — оксидоредуктаза	Глюкозооксидаза (потатин)	Фл
1.1.3.5	D-гексоза:O_2 — оксидоредуктаза	Гексозооксидаза	Фл
1.1.3.c	*D-галактоза:O_2 — оксидоредуктаза*	Галактозооксидаза	Zn
1.1.3.6	Холестерол:O_2 — оксидоредуктаза	Холестеролоксидаза	

1.1.99 Используют другие акцепторы

1.1.99.1	Холин:(акцептор) — оксидоредуктаза	Холиндегидрогеназа	Фл?
1.1.99.2	L-2-оксиглутарат:(акцептор) — оксидоредуктаза	2-оксиглутаратдегидрогеназа	

L-малат + O_2 = Оксалоацетат + (?)	Бактерии	[468]
Ароматический первичный спирт + O_2 = Ароматический альдегид + H_2O_2	Грибы — возбудители белой гнили Окисляет многие первичные спирты, содержащие ароматическое ядро; наилучшими субстратами были β-нафтилкарбинол и 3-метоксибензиловый спирт	[714]
L-гулоно-γ-лактон + O_2 = L-*ксило*-гексулонолактон + H_2O_2	Ткани животных Продукт окисления самопроизвольно изомеризуется в аскорбиновую кислоту	[442, 1216]
β-D-глюкоза + O_2 = D-глюконо-δ-лактон + H_2O_2	Плесневые грибы	[508, 1343, 1344]
β-D-Глюкоза + O_2 = D-глюконо-δ-лактон + H_2O_2	Растения Окисляет также D-галактозу, D-маннозу, мальтозу, лактозу и целлобиозу	[184, 185]
D-галактоза + O_2 = D-*галакто*-гексодиальдоза + H_2O_2	Плесневые грибы Окисляет D-галактозу в положении 6	[103, 500]
Холестерол + O_2 = Δ^4-холестен-3-он + (?)	Бактерии	[2500]
Холин + Акцептор = Бетаинальдегид + Восстановленный акцептор	Печень Использует в качестве акцептора индофенол	[668, 2211]
L-2-оксиглутарат + Акцептор = 2-оксоглутарат + Восстановленный акцептор	Сердечная мышца Использует в качестве акцепторов иноцианин и феназины	[2821]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.1.99.3	D-Глюконат:(акцептор) — оксидоредуктаза	Глюконатдегидрогеназа		D-Глюконат + Акцептор = 2-оксо-D-глюконат + Восстановленный акцептор	Бактерии Использует в качестве акцептора пиоцианин	[2166]
1.1.99.4	2-оксо-D-глюконат:(акцептор) — оксидоредуктаза	Оксоглюконатдегидрогеназа		2-оксо-D-глюконат + Акцептор = 2,5-диоксо-D-глюконат + Восстановленный акцептор	*Acetobacter* Использует в качестве акцепторов феназины и индофенол	[539]
1.1.99.a	*D-2-оксикислота:(акцептор) — оксидоредуктаза*	Дегидрогеназа D-2-оксикислот	Фл, Zn	D-Лактат + Акцептор = Пируват + Восстановленный акцептор	Ткани животных, дрожжи Действует на ряд D-2-оксикислот; использует в качестве акцепторов феррицианид, метиленовый синий и т. д.	[282, 929, 1689, 2001, 2685]
	1.2. Действуют на альдегидную или кетонную группу донора					
	1.2.1 Акцептором служит НАД или НАДФ					
1.2.1.1	Формальдегид:НАД — оксидоредуктаза	Формальдегиддегидрогеназа	Гл	Формальдегид + НАД + H_2O = Формиат + НАД·H_2	Печень	[2555]
1.2.1.2	Формиат:НАД — оксидоредуктаза	Формиатдегидрогеназа		Формиат + НАД = CO_2 + + НАД·H_2	Растения	[568]
1.2.1.3	Альдегид:НАД — оксидоредуктаза	Альдегиддегидрогеназа		Альдегид + НАД + H_2O = Кислота + НАД·H_2	Ткани животных Специфичность широкая	[2147]
1.2.1.4	Альдегид:НАДФ — оксидоредуктаза	Альдегиддегидрогеназа	[M^{2+}]	Альдегид + НАДФ + H_2O = Кислота + НАДФ·H_2	Дрожжи, бактерии	[1924, 2360]

1.2.1.5	Альдегид:НАД(Ф) — оксидоредуктаза	Альдегиддегидрогеназа	[K+] (дрожжи) [P] (бактерии)
1.2.1.6	Бензальдегид: НАД — оксидоредуктаза	Бензальдегиддегидрогеназа	
1.2.1.7	Бензальдегид: НАДФ — оксидоредуктаза	Бензальдегиддегидрогеназа	
1.2.1.8	Бетаинальдегид: НАД — оксидоредуктаза	Бетаинальдегиддегидрогеназа	[S]
1.2.1.9	D-глицеральдегид-3-фосфат:НАДФ — оксидоредуктаза	Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа, триозофосфатдегидрогеназа	
1.2.1.a	*Полуальдегид малоновой кислоты: НАД(Ф) — оксидоредуктаза*	Дегидрогеназа полуальдегида малоновой кислоты	
1.2.1.b	*Полуальдегид янтарной кислоты: НАД(Ф) — оксидоредуктаза*	Дегидрогеназа полуальдегида янтарной кислоты	
1.2.1.10	Альдегид:НАД — оксидоредуктаза (ацилирующая КоА)	Альдегиддегидрогеназа	
1.2.1.c	*Глиоксилат:НАДФ — оксидоредуктаза (ацилирующая КоА)*	Глиоксилатдегидрогеназа	

Альдегид + НАД(Ф) + H_2O = Кислота + НАД(Ф)·H_2	Дрожжи, бактерии	[253, 1233, 1385, 2612]
Бензальдегид + НАД + H_2O = Бензоат + НАД·H_2	Бактерии Специфичность широкая	[951]
Бензальдегид + НАДФ + + H_2O = Бензоат + + НАДФ·H_2	Бактерии	[951]
Бетаинальдегид + НАД + + H_2O = Бетаин + НАД·H_2	Ткани животных	[2255]
D-глицеральдегид-3-фосфат + + НАДФ + H_2O = 3-фосфо-D-глицерат + НАД·H_2	Листья зеленых растений	[2252]
Полуальдегид малоновой кислоты + НАД(Ф) = Малонат + НАД(Ф)·H_2	Бактерии	[1922]
Полуальдегид янтарной кислоты + НАД(Ф) = Сукцинат + НАД(Ф)·H_2	Мозг, бактерии Фермент мозга специфичен по отношению к НАД	[29, 1239, 1970]
Альдегид + КоА + НАД = Ацил-КоА + НАД·H_2	Бактерии	[372]
Глиоксилат + КоА + НАДФ = Оксалил-КоА + НАДФ·H_2	*Pseudomonas oxalaticus*	[2136]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.2.1.d	*Полуальдегид малоновой кислоты: НАД(Ф) — оксидоредуктаза (ацилирующая КоА)*	Дегидрогеназа полуальдегида малоновой кислоты		Полуальдегид малоновой кислоты + КоА + НАД(Ф) = Ацетил-КоА + CO_2 + + НАД(Ф)·H_2	Бактерии	[1037, 2927]
1.2.1.11	L-аспартат-β-полуальдегид:НАДФ — оксидоредуктаза (фосфорилирующая)	Дегидрогеназа полуальдегида аспарагиновой кислоты		β-Полуальдегид L-аспарагиновой кислоты + Фосфат + + НАДФ = L-β-аспартилфосфат + НАДФ·H_2	Дрожжи	[255]
1.2.1.12 К	D-глицеральдегид-3-фосфат:НАД — оксидоредуктаза (фосфорилирующая)	Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа, триозофосфатдегидрогеназа	Zn	D-глицеральдегид-3-фосфат + + Фосфат + НАД = 1,3-дифосфо-D-глицериновая кислота + НАД·H_2	Широко распространен Действует также (очень медленно) на D-глицеральдегид и другие альдегиды; меркаптаны могут заменять фосфат	[400, 505, 966, 1461, 2726, 2787]
1.2.1.13	D-глицеральдегид-3-фосфат:НАДФ — оксидоредуктаза (фосфорилирующая)	Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа, триозофосфатдегидрогеназа		D-глицеральдегид-3-фосфат + + Фосфат + НАДФ = 1-3-дифосфо-D-глицериновая кислота + НАДФ·H_2	Листья зеленых растений, *Alcaligenes*	[324, 826, 2252]
1.2.1.14	ИМФ:НАД — оксидоредуктаза	ИМФ-дегидрогеназа		ИМФ + НАД + H_2O = Ксантозин-5′-фосфат + НАД·H_2	Растения, бактерии	[1677, 2690]
1.2.1.e	*4-аминобутиральдегид:НАД — оксидоредуктаза*	Аминобутиральдегиддегидрогеназа		4-аминобутиральдегид + + НАД = 4-аминобутират + + НАД·H_2	*Pseudomonas* Природа субстрата окончательно не доказана. Субстратом служил Δ^1-пирролин	[1236]

1.2.1.f	*Полуальдегид глутаровой кислоты: НАД — оксидоредуктаза*	Дегидрогеназа полуальдегида глутаровой кислоты	

1.2.2 Акцептором служит цитохром

1.2.2.1	Формиат:цитохром-b_1—оксидоредуктаза	Формиатдегидрогеназа	
1.2.2.2 К	*Пируват:цитохром-b_1 — оксидоредуктаза*	Пируватдегидрогеназа	Фл [Т]

1.2.3 Акцептором служит O_2

1.2.3.1	Альдегид:O_2 — оксидоредуктаза	Альдегидоксидаза	Фл, Mo, Г?
1.2.3.2 К	Ксантин:O_2 — оксидоредуктаза	Ксантиноксидаза	Фл, Mo, Fe
1.2.3.3	Пируват:O_2 — оксидоредуктаза	Пируватоксидаза	Фл [Т, M^{2+}]
1.2.3.4	Оксалат:O_2 — оксидоредуктаза	Оксалатоксидаза	Фл

1.2.4 Акцептором служит липоат

1.2.4.1	Пируват:липоат — оксидоредуктаза (ацетилирующая акцептор)	Пируватдегидрогеназа	[Т]

Полуальдегид глутаровой кислоты + НАД = Глутарат + НАД·H_2	*Pseudomonas*	[1204]
Формиат + Феррицитохром b_1 = CO_2 + Ферроцитохром b_1	Бактерии	[805]
Пируват + Феррицитохром b_1 = Ацетат + CO_2 + Ферроцитохром b_1	Бактерии	[2868]
Альдегид + H_2O + O_2 = Кислота + H_2O_2	Печень Окисляет также производные хинолина и пиридина	[871, 1407, 1686]
Ксантин + H_2O + O_2 = Урат + + H_2O_2	Ткани животных, молоко, бактерии Окисляет также гипоксантин, некоторые пурины и птерины и альдегиды	[105, 594, 610, 615, 645, 1124, 1665, 1859, 2208, 2737]
Пируват + Фосфат + O_2 = Ацетилфосфат + CO_2 + H_2O_2	*Lactobacillus*	[967]
Оксалат + O_2 = 2CO_2 + H_2O_2	Мхи	[540]
Пируват + окисленный липоат = 6-S-ацетилгидролипоат + CO_2	Ткани животных, бактерии Возможно, представляет собой систему ферментов	[2007, 2359]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.2.4.2	2-оксоглутарат:липоат — оксидоредуктаза (ацилирующая акцептор)	Оксоглутаратдегидрогеназа	[T]	2-оксоглутарат + окисленный липоат = 6-S-сукцинилгидролипоат + CO_2	Ткани животных, бактерии Возможно, представляет собой систему ферментов	[1750, 2007, 2295]
	1.2.99 Используют другие акцепторы					
1.2.99.1	Урацил:(акцептор) — оксидоредуктаза	Урацилдегидрогеназа		Урацил + Акцептор = Барбитурат + Восстановленный акцептор	Бактерии Окисляет также тимин; использует в качестве акцептора метиленовый синий	[1035]
	1.3 Действуют на CH — CH-группу доноров					
	1.3.1 Акцептором служит НАД или НАДФ					
1.3.1.1	4,5-дигидроурацил: НАД — оксидоредуктаза	Дигидроурацилдегидрогеназа		4,5-дигидроурацил + НАД = Урацил + НАД·H_2	Бактерии	[387]
1.3.1.2	4,5-дигидроурацил: НАДФ — оксидоредуктаза	Дигидроурацилдегидрогеназа		4,5-дигидроурацил + НАДФ = Урацил + НАДФ·H_2	Печень Действует также на дигидротимин	[789, 934]
1.3.1.3	*4,5-β-дигидрокортизон: НАДФ-Δ^4-оксидоредуктаза*	Кортизон-β-редуктаза		4,5-β-дигидрокортизон + НАДФ = Кортизон + НАДФ·H_2	Печень	[344, 1574, 2667]
1.3.1.a	*4,5-α-дигидрокортизон: НАДФ-Δ^4-оксидоредуктаза*	Кортизон-α-редуктаза		4,5-α-дигидрокортизон + НАДФ = Кортизон + НАДФ·H_2	Микросомы печени	[1662]
1.3.1.b	*3,5-циклогексадиен-1,2-диол: НАДФ — оксидоредуктаза*	Циклогексадиендиолдегидрогеназа		3,5-циклогексадиен-1,2-диол + НАДФ = Катехол + НАДФ·H_2	Печень	[117]

1.3.2 Акцептором служит цитохром

1.3.2.1	Бутирил-КоА:цитохром-*c* — оксидоредуктаза	Бутирил-КоА—дегидрогеназа	Фл
1.3.2.2	Ацил-КоА:цитохром-*c* — оксидоредуктаза	Ацил-КоА—дегидрогеназа	Фл, Fe
1.3.2.3	L-галактоно-γ-лактон:цитохром-*c* — оксидоредуктаза	Галактонолактондегидрогеназа	

1.3.3 Акцептором служит O_2

1.3.3.1 **К**	L-4,5-дигидрооротат: O_2 — оксидоредуктаза	Дигидрооротатдегидрогеназа	Фл, Fe

1.3.99 Используют другие акцепторы

1.3.99.1	Сукцинат:(акцептор) — оксидоредуктаза	Сукцинатдегидрогеназа	Фл, Fe [Ф]
1.3.99.a	*3-кетостероид:(акцептор)-Δ^1 — оксидоредуктаза*	3-кетостероид-Δ^1-дегидрогеназа	Фл?
1.3.99.b	*3-кетостероид:(акцептор)-Δ^4 — оксидоредуктаза*	3-кетостероид-Δ^4-дегидрогеназа	Фл?

Бутирил-КоА + Феррицитохром c = Кротоноил-КоА + + Ферроцитохром c	Ткани животных Действует также (с меньшей активностью) на соединения КоА с кислотами, содержащими до 8 атомов С	[903, 1028, 1680]
Ацил-КоА + Феррицитохром c = 2,3-дегидроацил-КоА + + Ферроцитохром c	Ткани животных Окисляет наиболее активно высшие члены гомологического ряда	[514, 1028]
L-галактоно-γ-лактон + Феррицитохром c = L-аскорбат + Ферроцитохром c	Растения	[1709, 1711]
L-4,5-дигидрооротат + O_2 = Оротат + H_2O_2 (?)	Бактерии НАД может заменять O_2 и НАД·H_2 может заменять дигидрооротат	[786]
Сукцинат + Акцептор = Фумарат + Восстановленный акцептор	Ткани животных, дрожжи, бактерии Использует в качестве акцептора феназиналкилсульфат	[740, 1328, 1330, 1754, 2413, 2415, 2781, 2793, 2794]
3-кетостероид + Акцептор = Δ^1-3-кетостероид + Восстановленный акцептор	*Pseudomonas* Использует в качестве акцептора феназиналкилсульфат	[1575]
3-Кетостероид + Акцептор = Δ^4-3-кетостероид + Восстановленный акцептор	*Pseudomonas* Использует в качестве акцептора феназиналкилсульфат	[1575]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
	1.4 Действуют на CH — NH_2 группу доноров		
	1.4.1 Акцептором служит НАД или НАДФ		
1.4.1.1	L-аланин:НАД — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Аланиндегидрогеназа	
1.4.1.2	L-глутамат:НАД — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Глутаматдегидрогеназа	
1.4.1.3 К	L-глутамат: НАД(Ф) — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Глутаматдегидрогеназа	Zn
1.4.1.4	L-глутамат:НАДФ — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Глутаматдегидрогеназа	
1.4.1.5	L-аминокислота: НАД — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Дегидрогеназа L-аминокислот	[Ф]
1.4.1.6	5-аминовалерат: НАД — оксидоредуктаза (циклизующая)	D-пролин-редуктаза	$[M^{2+}]$
	1.4.3 Акцептором служит O_2		
1.4.3.1	D-аспарат:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	D-аспартат-оксидаза	Фл

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
L-аланин + H_2O + НАД = Пируват + NH_3 + НАД·H_2	Бактерии	[2013, 2085]
L-глутамат + H_2O + НАД = 2-оксоглутарат + NH_3 + + НАД·H_2	Ткани животных, растения бактерии	[162, 357, 709, 1976]
L-глутамат + H_2O + НАД(Ф) = 2-оксоглутарат + NH_3 + + НАД(Ф)·H_2	Печень	[2023, 2461, 2549, 2709]
L-глутамат + H_2O + НАДФ = 2-оксоглутарат + NH_3 + + НАДФ·H_2	Плесневые грибы, дрожжи, бактерии	[18, 19, 2743]
L-аминокислота + H_2O + + НАД = 2-оксокислота + + NH_3 + НАД·H_2	*Clostridia* Действует на алифатические аминокислоты	[1977]
5-аминовалерат + НАД = D-пролин + НАД·H_2	Бактерии	[2499, 2501]
D-аспартат + H_2O + O_2 = Оксалоацетат + NH_3 + H_2O_2	Почки	[2533, 2534]

1.4.3.2 К	L-аминокислота: O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Оксидаза L-аминокислот	Фл
1.4.3.3 К	D-аминокислота: O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Оксидаза D-аминокислот	Фл
1.4.3.4 К	Моноамин:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Моноаминоксидаза (ранее известная как «тираминаза»)	Cu
1.4.3.5	*Пиридоксаминфосфат:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)*	Пиридоксаминфосфат-оксидаза	Фл
1.4.3.6	Диамин:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	Диаминоксидаза, гистаминаза	[ПФ]

1.5 Действуют на C — NH-группу доноров

1.5.1 Акцептором служит НАД или НАДФ

1.5.1.1	L-пролин:НАД(Ф) — 2-оксидоредуктаза	Пирролин-2-карбоксилат-редуктаза	

L-аминокислота + H_2O + O_2 = 2-оксокислота + NH_3 + H_2O_2	Печень, почки, змеиный яд, плесневые грибы, бактерии Фермент печени и почек, окисляет также 2-оксикислоты; фермент змеиного яда их не окисляет	[264—266, 299, 368, 1463, 2411, 2838]
D-аминокислота + H_2O + O_2 = 2-оксокислота + NH_3 + H_2O_2	Печень, почки, плесневые грибы, бактерии Широкая специфичность в отношении D-аминокислот	[1463, 1753]
Моноамин + H_2O + O_2 = Альдегид + NH_3 + H_2O_2	Ткани животных, растения Действует на первичные, вторичные и третичные амины	[1152, 2593, 2834, 2928, 2929, 2968]
Пиридоксаминфосфат + H_2O + O_2 = Пиридоксальфосфат + NH_3 + H_2O_2	Ткани животных, дрожжи, бактерии Окисляет также пиридоксамин-5-фосфат и пиридоксин	[2744]
Диамин + H_2O + O_2 = Аминоальдегид + NH_3 + H_2O_2	Ткани животных, растения, бактерии Окисляет также гистамин	[1705, 2700, 2968]
L-пролин + НАД(Ф) = Δ^1-Пирролин-2-карбоксилат + + НАД(Ф)·H_2	Ткани животных, растения, плесневые грибы Восстанавливает Δ^1-пирролин-2-карбоновую кислоту в L-пролин и Δ^1-пиперидин-2-карбоновую в L-пипеколиновую кислоту	[1787]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.5.1.2	L-пролин:НАД(Ф)—5-оксидоредуктаза	Пирролин-5-карбоксилат-редуктаза		L-пролин + НАД(Ф) = Δ^1-пирролин-5-карбоксилат + + НАД(Ф)·H_2	Печень, плесени Восстанавливает также Δ^1-пирролин-3-окси-5-карбоновую кислоту в L-оксипролин	[13, 1787, 2453, 2954]
1.5.1.3	5,6,7,8-тетрагидрофолат:НАДФ — оксидоредуктаза	Тетрагидрофолатдегидрогеназа		5,6,7,8-тетрагидрофолат + + НАДФ = 7,8-дигидрофолат + НАДФ·H_2	Печень Окисляет также (медленно) 7,8-дигидрофолевую кислоту в фолевую	[2957]
1.5.1.4	7,8-дигидрофолат: НАДФ — оксидоредуктаза	Дигидрофолатдегидрогеназа		7,8-дигидрофолат + НАДФ = Фолат + НАДФ·H_2	Бактерии	[263]
1.5.1.5	*5,10-метилентетрагидрофолат: НАДФ — оксидоредуктаза*	Метилентетрагидрофолатдегидрогеназа		5,10-метилентетрагидрофолат + H^+ + НАДФ = 5,10-метенилтетрагидрофолат + + H_2O + НАДФ·H_2	Печень	[1027, 2034]
	1.5.3 Акцептором служит O_2					
1.5.3.1	Саркозин:O_2 — оксидоредуктаза (деметилирующая)	Саркозиноксидаза		Саркозин + H_2O + O_2 = Глицин + HCHO + H_2O_2 (?)	Печень	[995]
1.5.3.2	N-метил-L-аминокислота:O_2 — оксидоредуктаза (деметилирующая)	Оксидаза N-метиламинокислот	Фл	N-метил-L-аминокислота + + H_2O + O_2 = L-аминокислота + HCHO + H_2O_2	Почки	[1864, 1865]
1.5.3.3	Спермин:O_2 — оксидоредуктаза (расщепляющая донор)	Сперминоксидаза		Спермин + H_2O + O_2 = $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3CHO$ + + $NH_2(CH_2)_3NH_2$ + H_2O_2	Бактерии Окисляет также спермидин	[2802]

1.6 Используют в качестве донора $НАД \cdot H_2$ или $НАДФ \cdot H_2$

1.6.1 Акцептором служит НАД или НАДФ

1.6.1.1	$НАДФ \cdot H_2$:НАД — оксидоредуктаза	НАД(Ф)-трансгидрогеназа		$НАДФ \cdot H_2 + НАД = НАДФ + НАД \cdot H_2$	Ткани животных, дрожжи, бактерии Действует также на дезаминокоферменты	[482, 1189, 1306, 1307]

1.6.2 Акцептором служит цитохром

1.6.2.1	$НАД \cdot H_2$:цитохром-*c* — оксидоредуктаза	$НАД \cdot H_2$-цитохром-*c*-редуктаза	Фл	$НАД \cdot H_2$ + Феррицитохром *c* = НАД + Ферроцитохром *c*	Ткани животных, бактерии	[331, 576, 778, 1682, 1688]
1.6.2.2	$НАД \cdot H_2$:цитохром-b_5 — оксидоредуктаза	$НАД \cdot H_2$-цитохром-b_5-редуктаза	Фл, Mg	$НАД \cdot H_2$ + Феррицитохром b_5 = НАД + Ферроцитохром b_5	Микросомы печени	[1687, 2557]
1.6.2.3	$НАДФ \cdot H_2$:цитохром-*c* — оксидоредуктаза	$НАД \cdot H_2$-цитохром-*c*-редуктаза	Фл	$НАДФ \cdot H_2$ + Феррицитохром *c* = НАДФ + Ферроцитохром *c*	Ткани животных, дрожжи	[961, 962, 1159, 1510]

1.6.4 Акцептором служит дисульфидное соединение

1.6.4.1	$НАД \cdot H_2$:L-цистин — оксидоредуктаза	Цистинредуктаза		$НАД \cdot H_2$ + L-цистин = НАД + 2 L-цистеин	Растения, дрожжи	[2243]
1.6.4.2	$НАД(Ф) \cdot H_2$:глутатион — оксидоредуктаза	Глутатионредуктаза	Фл	$НАД(Ф) \cdot H_2$ + Окисленный глутатион = НАД(Ф) + 2 Восстановленный глутатион	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии	[1710, 2153, 2163, 2575, 2719]
1.6.4.3	$НАД \cdot H_2$:липоамид — оксидоредуктаза	Липоамиддегидрогеназа (ранее известная как «диафораза»	Фл	$НАД \cdot H_2$ + Липоамид = НАД + Дигидролипоамид	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии	[178, 527, 968, 1419, 1749, 1752, 2310, 2543]

1.6.5 Акцептором служит хинон или родственное соединение

1.6.5.1	$НАД(Ф) \cdot H_2$:хинон — оксидоредуктаза	Хинонредуктаза	Фл	$НАД(Ф) \cdot H_2$ + Хинон = НАД(Ф) + Дифенол	Растения, дрожжи, бактерии	[648, 2917, 2918]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.6.5.2	НАД(Ф)·H_2:2-метил-1,4-нафтохинон-оксидоредуктаза	Менадионредуктаза	Фл	НАД(Ф)·H_2 + 2-метил-1,4-нафтохинон = НАД(Ф) + 2-метилнафтогидрохинон	Ткани животных, растения, бактерии Действует также на другие нафтохиноны	[843, 1722, 2916]
1.6.5.3	НАД(Ф)·H_2:убихинон — оксидоредуктаза	Убихинонредуктаза	Фл	НАД(Ф)·H_2 + Убихинон = НАД(Ф) + Дигидроубихинон	Ткани животных Возможно, представляет собой систему ферментов	[1026]
1.6.5.4	НАД(Ф)·H_2:окисленный аскорбат — оксидоредуктаза	Редуктаза окисленного аскорбината		НАД(Ф)·H_2 + Окисленный аскорбат = НАД(Ф) + Аскорбат	Растения, дрожжи, бактерии	[1365, 1927]
	1.6.6 Акцептором служит азотистая группа					
1.6.6.1	НАД·H_2:нитрат — оксидоредуктаза	НАД·H_2-нитратредуктаза	Фл, М	НАД·H_2 + Нитрат = НАД + Нитрит + H_2O	Растения, плесневые грибы, бактерии	[726, 1963, 2481]
1.6.6.2	НАД(Ф)·H_2:нитрат — оксидоредуктаза	Нитратредуктаза	Фл	НАД(Ф)·H_2 + Нитрат = НАД(Ф) + Нитрит + H_2O	Растения	[1964]
1.6.6.3	НАДФ·H_2:нитрат — оксидоредуктаза	НАДФ·H_2-нитратредуктаза	Фл, Мо [Ф]	НАДФ·H_2 + Нитрат = НАДФ + Нитрит + H_2O	Растения, плесневые грибы	[1926, 1962, 2615]
1.6.6.4	НАД(Ф)·H_2:нитрит — оксидоредуктаза	Нитритредуктаза	Фл, М	3НАД(Ф)·H_2 + Нитрит = 3НАД(Ф) + NH_4OH + H_2O	Растения, плесневые грибы, бактерии	[1527, 1961, 2615]
1.6.6.6	НАД·H_2:гипонитрит — оксидоредуктаза	Гипонитритредуктаза	Фл? М	НАД·H_2 + Гипонитрит = НАД + NH_2OH	Плесневые грибы	[1774]
1.6.6.7	НАДФ·H_2:диметиламиноазобензол — оксидоредуктаза	Азобензолредуктаза		НАДФ·H_2 + Диметиламиноазобензол = НАДФ + Диметилпарафенилендиамин + Анилин	Ткани животных	[1897]

1.6.6.a	*НАДФ·H_2:ГМФ — оксидоредуктаза (дезаминирующая)*	ГМФ-редуктаза	[S]	НАДФ·H_2 + ГМФ = НАДФ + ИМФ + NH_3	Бактерии	[1678]

1.6.99 Используют другие акцепторы

1.6.99.1 К	НАДФ·H_2:(акцептор) — оксидоредуктаза	НАДФ·H_2-диафораза (дрожжевой фермент, ранее известный как «старый желтый фермент»)	Фл	НАДФ·H_2 + Акцептор = НАДФ + Восстановленный акцептор	Растения, дрожжи Реагирует с метиленовым синим в качестве акцептора (и медленно с кислородом)	[107, 567, 1351, 2625, 2632]

1.7 Используют в качестве доноров другие азотистые соединения

1.7.3 Акцептором служит O_2

1.7.3.1	Нитроэтан:O_2 — оксидоредуктаза	Нитроэтаноксидаза		$C_2H_5NO_2 + H_2O + O_2 = CH_3CHO + HNO_2 + H_2O_2$	Плесневые грибы Действует на некоторые другие алифатические нитросоединения	[1606]
1.7.3.2	N-ацетилиндоксил:O_2 — оксидоредуктаза	Ацетилиндоксилоксидаза		N-ацетилиндоксил + O_2 = N-ацетилизатин + ?	Растения	[193]
1.7.3.3	Урат:O_2 — оксидоредуктаза	Уратоксидаза (ранее известная как «уриказа»)	Cu	Урат + O_2 = Неидентифицированные продукты	Ткани животных, адаптированные дрожжи	[1180, 1552, 1613, 1685, 2226, 2257]

1.7.99 Используют другие акцепторы

1.7.99.1	Аммиак:(акцептор) — оксидоредуктаза	Гидроксиламинредуктаза	Фл, Mn	Аммиак + Акцептор = Гидроксиламин + Восстановленный акцептор	Растения, плесневые грибы, бактерии Донорами для восстановления гидроксиламина могут служить восстановленный пиоцианин, метиленовый синий или флавины	[2614, 2615, 2765]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.7.99.2	Азот:(акцептор)—оксидоредуктаза	Редуктаза окиси азота	Фл, Fe	$N_2 + 2H_2O + Акцептор = 2NO + Восстановленный акцептор$	Бактерии Донором для восстановления NO может служить восстановленный пиоцианин	[455, 725]
1.7.99.в	*Окись азота: (акцептор)—оксидоредуктаза)*	Нитритредуктаза	Фл, Cu	$2NO + 2H_2O + Акцептор = 2 Нитрит + Восстановленный акцептор$	Бактерии Донорами для восстановления нитрита могут служить восстановленный пиоцианин, дигидрофлавины и т. п.	[454, 2764]

1.8 Действуют на серусодержащие группы доноров

1.8.1 Акцептором служит НАД или НАДФ

1.8.1.1	Цистеамин:НАД—оксидоредуктаза	Цистеаминдегидрогеназа		Цистеамин + 3НАД + $2H_2O$ = Цистаминдисульфоксид + + 3НАД·H_2	Печень	[2293]
1.8.1.2	H_2S:НАДФ—оксидоредуктаза См. также 1.6.4.1—3	Сульфитредуктаза		H_2S + 3НАДФ + $3H_2O$ = Сульфит + 3НАДФ·H_2	Дрожжи	[1105]

1.8.3 Акцептором служит O_2

1.8.3.1	Сульфит:O_2—оксидоредуктаза	Сульфитоксидаза	Г	Сульфит + O_2 + H_2O = Сульфат + H_2O_2	Ткани животных, растения, бактерии	[1668, 2600]
1.8.3.2	Тиол:O_2—оксидоредуктаза	Тиолоксидаза		4R=CR′—SH + O_2 = 2R=CR′—S—S—CR′=R + + $2H_2O$	Грибы R может означать =S или =O, или ряд других групп. Фермент не специфичен в отношении R′	[1948]

1.8.4 Акцептором служит дисульфидное соединение

1.8.4.1	Глутатион:гомоцистин — оксидоредуктаза	Глутатион-гомоцистин-трансгидрогеназа		2 Восстановленный глутатион + Гомоцистин = Окисленный глутатион + 2 Гомоцистеин	Печень	[2154]

1.8.5 Акцептором служит хинон или родственное соединение

1.8.5.1	Глутатион:дегидроаскорбат — оксидоредуктаза	Глутатиондегидрогеназа		2 Восстановленный глутатион + Дегидроаскорбат = Окисленный глутатион + + Аскорбат	Высшие растения, дрожжи	[520]

1.8.6 Акцептором служит азотистая группа

1.8.6.1	Глутатион:полинитрат — оксидоредуктаза	Редуктаза эфиров азотной кислоты		2 Восстановленный глутатион + Полинитрат = Окисленный глутатион + Нитрит + Неидентифицированный продукт	Печень	[1066]

1.9 Действуют на группы гема донором

1.9.3 Акцептором служит O_2

1.9.3.1 К	Цитохром *c*:O_2 — оксидоредуктаза	Цитохромоксидаза (цитохром a_3)	Г, Cu	4 Ферроцитохром *c* + O_2 = 4 Феррицитохром *c* + $2H_2O$	Широко распространен	[933, 1340, 1341, 2424, 2452, 2749, 2948, 2949]
1.9.3.a К	*Цитохром (c_4, c_5): O_2 — оксидоредуктаза*	Цитохромоксидаза *Pseudomonas* (цитохром CD)	Г	4 Ферроцитохром c_4 (или c_5) + O_2 = 4 Феррицитохром + $2H_2O$	*Pseudomonas*	[1167, 2451. 2656, 2934]

1.9.6 Акцептором служит азотистая группа

1.9.6.1	Цитохром:нитрат — оксидоредуктаза	Нитратредуктаза		Ферроцитохром + Нитрат = Феррицитохром + Нитрит	Бактерии	[2286]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.10 Используют в качестве доноров дифенолы и родственные им соединения						
1.10.3 Акцептором служит O_2						
1.10.3.1	*о*-Дифенол:O_2 — оксидоредуктаза	Катехолоксидаза	Cu	2 *о*-Дифенол + O_2 = 2 *о*-Хинон + $2H_2O$	Растения, грибы, некоторые ткани животных Действует на различные *о*-дифенолы; окисляет также монофенолы	[337, 533, 570, 680, 1348, 1367, 1473, 1741]
1.10.3.2	*п*-Дифенол:O_2 — оксидоредуктаза	*п*-Дифенолоксидаза	Cu	2 *п*-Дифенол + O_2 = 2 *п*-Хинон + $2H_2O$	Растения, грибы Действует на различные *п*-дифенолы и *п*-фенилендиамины	[926, 1349, 1741, 1923]
1.10.3.3	L-Аскорбат: O_2 — оксидоредуктаза	Аскорбатоксидаза	Cu	2L-Аскорбат + O_2 = 2 Дегидроаскорбат + $2H_2O$	Растения	[570]
1.11 Использует в качестве акцептора H_2O_2						
1.11.1.1	НАД·H_2:H_2O_2 — оксидоредуктаза	НАД-пероксидаза	Фл	НАД·H_2 + H_2O_2 = НАД + + $2H_2O$	Бактерии Феррицианид, хиноны и т. п. заменяют H_2O_2	[646, 647, 1843]
1.11.1.2	НАДФ·H_2:H_2O_2 — оксидоредуктаза	НАДФ-пероксидаза		НАДФ·H_2 + H_2O_2 = НАДФ + + $2H_2O$	Растения	[489]
1.11.1.3	Пальмитат:H_2O_2 — оксидоредуктаза	Пероксидаза жирных кислот		Пальмитиновая кислота + + $2H_2O_2$ = 1-пентадеканаль + CO_2 + $3H_2O$	Растения Действует на жирные кислоты с длинной цепью (от лауриновой до стеариновой)	[1739]
1.11.1.5	Цитохром-*с*:H_2O_2 — оксидоредуктаза	Цитохромпероксидаза	Г	2 Ферроцитохром *с* + H_2O_2 = 2 Феррицитохром *с* + $2H_2O$	Плесневые грибы, дрожжи, бактерии	[56, 1550]
1.11.1.a	*Глутатион:* H_2O_2 — *оксидоредуктаза*	Глутатионпероксидаза		2 Восстановленный глутатион + H_2O_2 = Окисленный глутатион + $2H_2O$	Ткани животных	[1826]

1.11.1.6 К	H_2O_2:H_2O_2 — оксидоредуктаза	Каталаза	Г	$H_2O_2 + H_2O_2 = O_2 + 2H_2O$	Широко распространен Донорами водорода могут служить некоторые органические соединения, в частности этиловый спирт	[1077, 1078, 1336, 2119, 2567, 2628]
1.11.1.7 К	Донор:H_2O_2 — оксидоредуктаза	Пероксидаза	Г	Донор + H_2O_2 = Окисленный донор + $2H_2O$	Ткани животных, растения	[22, 420, 1170, 1171, 1364, 1734, 1861, 1870, 2308, 2599, 2626]
1.11.1.8	Иодид:H_2O_2 — оксидоредуктаза	Иодиназа	Г	2 Иодид + H_2O_2 = Иод + $2H_2O$	Ткани животных	[523, 1173, 1174, 2374]

1.98 Ферменты, использующие в качестве восстановителя H_2

1.98.1.1	*H_2:ферредоксин — оксидоредуктаза*	Гидрогеназа	Fe	H_2 + 2Ферредоксин = 2 Восстановленный ферредоксин	Бактерии Использует молекулярный водород для восстановления различных веществ	[1871, 2039, 2066, 2221, 2287, 2393, 2597, 2705]

1.99 Прочие ферменты, использующие O_2 в качестве окислителя

(природа реакций не совсем ясна; рекомендаций по систематическим названиям не дается)

1.99.1 Гидроксилазы

1.99.1.1		Арил-4-гидроксилаза		Гидроксилирует анилин и другие ароматические соединения; в реакции участвует НАДФ·H_2	Печень	[290, 1837]
1.99.1.2		Фенилаланин-4-гидроксилаза		Гидроксилирует L-фенилаланин в L-тирозин. В реакции участвует восстановленный птеридин	Печень	[1317, 1321, 1836, 2693]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1.99.1.3		Никотинат-6-гидроксилаза		Гидроксилирует никотиновую кислоту в 6-оксиникотиновую кислоту	*Pseudomonas*	[195, 1190]
1.99.1.4		Триптофан-5-гидроксилаза		Гидроксилирует L-триптофан в 5-окситриптофан	Печень, бактерии	[1838, 2994]
1.99.1.5		Кинуренин-3-гидроксилаза		Гидроксилирует L-кинуренин в 3-оксикинуренин. В реакции участвует НАДФ·H_2	Печень	[577, 2289]
1.99.1.a		Стероид-2-гидроксилаза		Гидроксилирует эстриол в 2-оксиэстриол; в реакции участвует НАД(Ф)·H_2	Печень	[1384]
1.99.1.6		Стероид-11-α-гидроксилаза		Гидроксилирует стероиды в 11-α-оксистероиды	Плесневые грибы	[1700, 2079]
1.99.1.7		Стероид-11-β-гидроксилаза		Гидроксилирует стероиды в 11-β-оксистероиды; в реакции участвует НАДФ·H_2	Ткани животных	[885, 1043, 2581, 2668]
1.99.1.8		Стероид-6-β-гидроксилаза		Гидроксилирует стероиды в 6-β-оксистероиды	Надпочечники	[977]
1.99.1.9		Стероид-17-α-гидроксилаза		Гидроксилирует стероиды в 17-α-оксистероиды; в реакции участвует НАДФ·H_2	Надпочечники, семенники, *Cephalothecium*	[1642, 1790]
1.99.1.10		Стероид-19-гидроксилаза		Гидроксилирует 11-дезоксикортикостерон в 19-окси-11-дезоксикортикостерон	Надпочечники	[1804]
1.99.1.11		Стероид-21-гидроксилаза		Гидроксилирует стероиды в 21-оксистероиды; в реакции участвует НАДФ·H_2	Надпочечники	[1042, 2093, 2281]

1.99.1.12	Алкоксиарил-гидроксилаза	
1.99.1.13	Сквален-циклогидроксилаза	
1.99.1.14	*n*-Оксифенилпируват-гидроксилаза	

1.99.2 Оксигеназы

1.99.2.1 К	Липоксигеназа (ранее известная как «липоксидаза»)	
1.99.2.2	Катехол-1,2-оксигеназа	[Fe^{2+}]
1.99.2.a	Катехол-2,3-оксигеназа	
1.99.2.3	Протокатехинат-оксигеназа	[Fe^{2+}]
1.99.2.4	Гентизат-оксигеназа	[Fe^{2+}]
1.99.2.5	Гомогентизат-оксигеназа	[Fe^{2+}]
1.99.2.b	3-оксиантрапилат-оксигеназа	
1.99.2.6	*Мио*-инозитол-оксигеназа	[Fe^{2+}]
1.99.2.c	Триптофан-оксигеназа	Г

Превращает $R-CH_2OC_6H_4-R'$ в $R-CHO$ и $HO-C_6H_4R'$; в реакции участвует НАДФ·H_2	Печень	[109]
Превращает сквален в ланостерин; в реакции участвует НАДФ·H_2	Печень	[2623]
Превращает *п*-оксифенилпируват в гомогентизиновую кислоту и CO_2	Печень	[969, 1501]
Ненасыщенный жир + O_2 = Пероксид ненасыщенного жира	Растения	[2617, 2634, 2670]
Катехол + O_2 = *цис-цис*-Муконат	*Pseudomonas*	[1034, 2419]
Катехол + O_2 = Полуальдегид 2-оксимуконата	Бактерии	[1420]
Протокатехинат + O_2 = 3-карбокси-*цис-цис*-Муконат	*Pseudomonas*, плесневые грибы	[936, 2506]
Гентизат + O_2 = Малеилпируват	*Pseudomonas*	[2563]
Гомогентизат + O_2 = 4-малеилацетоацетат	Печень, почки, бактерии	[512, 1409, 2183, 2665]
3-оксиантранилат + O_2 = Полуальдегид 2-амино 3-карбоксимуконата	Печень, почки	[578]
Мио-инозитол + O_2 = D-глюкуронат	Почки	[435]
L-триптофан + O_2 = Формилкинуренин	Ткани животных, бактерии	[1038, 2611]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
2. ТРАНСФЕРАЗЫ						
2.1 Переносят одноуглеродные остатки						
2.1.1 Метилтрансферазы (в тривиальных названиях вместо «метилтрансфераза» допустимо обозначение «трансметилаза»)						
2.1.1.a	*S-аденозилметионин: катехол — О-метилтрансфераза*	Катехол-метилтрансфераза	$[M^{2+}]$	S-аденозилметионин + Катехол = S-аденозилгомоцистеин + Гваякол	Ткани животных	[115]
2.1.1.b	*S-аденозилметионин: никотинат — N-метилтрансфераза*	Никотинат-метилтрансфераза		S-аденозилметионин + Никотинат = S-аденозилгомоцистеин + N-метилникотинат	Растения	[1269]
2.1.1.1	S-аденозилметионин: никотинамид — N-метилтрансфераза	Никотинамид-метилтрансфераза		S-аденозилметионин + Никотинамид = S-аденозилгомоцистеин + N-метилникотинамид	Печень	[393]
2.1.1.c	*S-аденозилметионин: гистамин — N-метилтрансфераза*	Гистамин-метилтрансфераза		S-аденозилметионин + Гистамин = S-аденозилгомоцистеин + 1-метилгистамин	Ткани животных	[334]
2.1.1.2	S-аденозилметионин: гуанидинацетат — N-метилтрансфераза	Гуанидинацетат-метилтрансфераза		S-аденозилметионин + Гуанидинацетат = S-аденозилгомоцистеин + Креатин	Печень	[397, 398]
2.1.1.d	*S-аденозилметионин: тиол — S-метилтрансфераза*	Тиол-метилтрансфераза		S-аденозилметионин + Тиол = S-аденозилгомоцистеин + Тиоэфир	Ткани животных В качестве акцепторов могут реагировать различные тиолы и окситиолы	[323]
2.1.1.e	*S-аденозилметионин: L-гомоцистеин-S-метилтрансфераза*	Гомоцистеин-метилтрансфераза		S-аденозилметионин + L-гомоцистеин = S-аденозилгомоцистеин + L-метионин	Дрожжи, бактерии	[2379, 2380]

2.1.1.3	Диметилтетин:L-гомоцистеин — S-метилтрансфераза	Диметилтетин-гомоцистеин-метилтрансфераза		Диметилтетин + L-гомоцистеин = S-метилтиогликолат + + L-метионин	Печень	[660, 1394, 1762, 1763]
2.1.1.4	S-аденозилметионин:N-ацетилсеротонин — O-метилтрансфераза	Ацетилсеротонин-метилтрансфераза		S-аденозилметионин + N-ацетилсеротонин = S-аденозилгомоцистеин + N-ацетил-5-метокситриптамин	Шишковидное тело	[116]
2.1.1.5	Бетаин:L-гомоцистеин — S-метилтрансфераза	Бетаин-гомоцистеин-метилтрансфераза		Бетаин + L-гомоцистеин = Диметилглицин + L-метионин	Печень	[1394]

2.1.2 Трансферазы оксиметильных, формильных и родственных групп

(В тривиальных названиях вместо «оксиметилтрансфераза», «формилтрансфераза», «формиминотрансфераза» допустимы обозначения «трансоксиметилаза», «трансформилаза», «трансформиминаза»)

2.1.2.1	*L-серин:тетрагидрофолат — 5,10-оксиметилтрансфераза*	Серин-оксиметилтрансфераза	[ПФ] [Mn^{2+}]	L-серин + Тетрагидрофолат = Глицин + 5,10-метилентетрагидрофолат	Печень	[261, 1182, 1390]
2.1.2.2	5′-фосфорибозил-N-формилглицинамид:тетрагидрофолат — 5,10-формилтрансфераза	Фосфорибозилглицинамид-формилтрансфераза		5′-фосфорибозил-N-формилглицинамид + Тетрагидрофолат = 5′-фосфорибозилглицинамид + 5,10-метенилтетрагидрофолат + H_2O	Печень	[1017, 2792]
2.1.2.3	5′-фосфорибозил-5-формамидо-4-имидазолкарбоксамид:тетрагидрофолат — 10-формилтрансфераза	Фосфорибозил-аминоимидазолкарбоксамид-формилтрансфераза	[K^+]	5′-фосфорибозил-5-формамидо-4-имидазолкарбоксамид + + Тетрагидрофолат = 5′-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксамид + 10-формилтетрагидрофолат	Печень	[1017]
2.1.2.a	*N-формил-L-глутамат:тетрагидрофолат — 5-формилтрансфераза*	Формилглутамат-формилтрансфераза		N-формил-L-глутамат + Тетрагидрофолат = L-глутамат + 5-формилтетрагидрофолат	Печень	[2405]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
2.1.2.4	L-формиминоглицин:тетрагидрофолат — 5-формиминотрансфераза	Глицин-формиминотрансфераза		N-формиминоглицин + Тетрагидрофолат = Глицин + + 5-формиминотетрагидрофолат	Бактерии	[2141, 2143, 2288]
2.1.2.5	N-формимино-L-глутамат:тетрагидрофолат — 5-формимипотрансфераза	Глутамат-формиминотрансфераза		N-формимино-L-глутамат + + Тетрагидрофолат = L-глутамат + 5-формиминотетрагидрофолат	Печень	[1817, 2596]

2.1.3 Карбоксил- и карбамоилтрансферазы

(В тривиальных названиях вместо «карбокситрансфераза» и «карбамоилтрансфераза» допустимы обозначения «транскарбоксилаза», «транскарбамоилаза»)

2.1.3.1	Метилмалонил-КоА: пируват — карбоксилтрансфераза	Метилмалонил-КоА — карбокситрансфераза	Бт	Метилмалонил-КоА + Пируват = Пропионил-КоА + Оксалоацетат	Бактерии	[2588, 2909]
2.1.3.2 К	Карбамоилфосфат: L-аспартат — карбамоилтрансфераза	Аспартат-карбамоилтрансфераза		Карбамоилфосфат + L-аспартат = Ортофосфат + N-карбамоил-L-аспартат	Ткани животных, бактерии	[1621, 2203, 2383]
2.1.3.3	Карбамоилфосфат: L-орнитин — карбамоилтрансфераза	Орнитин-карбамоилтрансфераза		Карбамоилфосфат + L-орнитин = Ортофосфат + L-цитруллин	Ткани животных, бактерии	[364, 1266, 1406, 2184, 2201]

2.2 Переносят альдегидные или кетонные остатки

2.2.1.1 К	D-седогептулозо-7-фосфат:D-глицеральдегид-3-фосфат — гликольальдегидтрансфераза	Транскетолаза, гликольальдегидтрансфераза	[Mg^{2+}, Т]	D-седогептулозо-7-фосфат + + D-глицеральдегид-3-фосфат = D-рибозо-5-фосфат + + D-ксилулозо-5-фосфат	Растения, дрожжи, бактерии Проявляет широкую специфичность в отношении обоих субстратов, например превращает оксипируват и RCHO в CO_2 и $RCHOHCOCH_2OH$	[587, 1162, 1164, 2156]

2.2.1.2 К	D-седогептулозо-7-фосфат:D-глицеральдегид-3-фосфат — диоксиацетонтрансфераза	Трансальдолаза, диоксиацетонтрансфераза		D-седогептулозо-7-фосфат + + D-глицеральдегид-3-фосфат = D-эритрозо-4-фосфат + + D-фруктозо-6-фосфат	Печень, растения, дрожжи	[1163, 2731]

2.3 Ацилтрансферазы

2.3.1 Ацилтрансферазы

(В тривиальных названиях вместо «ацетилтрансфераза» и т. п. допустимо обозначение «трансацетилаза» и т. п.)

2.3.1.a	*Ацетил-КоА:L-аспартат — N-ацетилтрансфераза*	Аспартат-ацетилтрансфераза	[A]	Ацетил-КоА + L-аспартат = КоА + N-ацетил-L-аспартат	Мозг	[863]
2.3.1.1	Ацетил-КоА:L-глутамат — N-ацетилтрансфераза	Ацетилтрансфераза аминокислот	[HCN]	Ацетил-КоА + L-глутамат = КоА + N-ацетилглутамат	Бактерии Действует также с аспарагиновой кислотой и (медленнее) с некоторыми другими аминокислотами	[1647]
2.3.1.2	Ацетил-КоА:имидазол — N-ацетилтрансфераза	Имидазол-ацетилтрансфераза		Ацетил-КоА + Имидазол = КоА + N-ацетилимидазол	*Clostridium* Действует также с пропионил-КоА	[1387]
2.3.1.3	Ацетил-КоА:2-амино-2-дезокси-D-глюкозо — N-ацетилтрансфераза	Глюкозамин-ацетилтрансфераза		Ацетил-КоА + 2-амино-2-дезокси-D-глюкоза = КоА + 2-ацетиламино-2-дезокси-D-глюкоза	Печень	[452]
2.3.1.4	Ацетил-КоА:2-амино-2-дезокси — D-глюкозо-6-фосфат — N-ацетилтрансфераза	Глюкозаминфосфат-ацетилтрансфераза		Ацетил-КоА + 2-амино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат = КоА + 2-ацетиламино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат	Ткани животных, плесневые грибы, дрожжи, бактерии	[336, 549]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
2.3.1.5	Ацетил-КоА:ариламин — N-ацетилтрансфераза	Ариламин-ацетилтрансфераза		Ацетил-КоА + Ариламин = КоА + N-ацетилариламин	Ткани животных Широкая специфичность в отношении ароматических аминов, включая серотонин; катализирует также перенос ацетильных остатков между ариламинами без участия КоА	[240, 451, 2595, 2833]
2.3.1.6	Ацетил-КоА:холин — О-ацетилтрансфераза	Холин-ацетилтрансфераза		Ацетил-КоА + Холин = КоА + О-ацетилхолин	Первная ткань Пропионил-КоА может заменять ацетил-КоА (в этом случае реакция идет медленнее)	[231, 237]
2.3.1.7	Ацетил-КоА:карнитин — О-ацетилтрансфераза	Карнитин-ацетилтрансфераза		Ацетил-КоА + Карнитин = КоА + О-ацетилкарнитин	Печень	[785]
2.3.1.b	*Ацетил-КоА:галактозид — 6-О-ацетилтрансфераза*	Галактозид-ацетилтрансфераза		Ацетил-КоА + β-D-галактозид = КоА + 6-ацетил-β-D-галактозид	*E. coli* Лучшими акцепторами являются тиогалактозиды	[2956]
2.3.1.8	Ацетил-КоА:ортофосфат — ацетилтрансфераза	Фосфат-ацетилтрансфераза	[K^+]	Ацетил-КоА + Ортофосфат = КоА + Ацетилфосфат	Бактерии	[2497]
2.3.1.9	Ацетил-КоА:ацетил-КоА — С-ацетилтрансфераза	Ацетил-КоА — ацетилтрансферазa, ацетоацетил-КоА — тиолаза		Ацетил-КоА + Ацетил-КоА = КоА + Ацетоацетил-КоА	Ткани животных	[2989, 2523]
2.3.1.10	Ацетил-КоА:H_2S—S-ацетилтрансфераза	H_2S-ацетилтрансфераза		Ацетил-КоА + H_2S = КоА + Тиоацетат	Печень, бактерии	[309]

2.3.1.11	Ацетил-КоА:тиоэтаноламин — S-ацетилтрансфераза	Тиоэтаноламин-ацетилтрансфераза (ранее известная как «тиолтрансацетилаза B»)	
2.3.1.12	Ацетил-КоА:дигидролипоат — S-ацетилтрансфераза	Липоат-ацетилтрансфераза (ранее известная как «тиолтрансацетилаза A»)	
2.3.1.c	*Бутирил-КоА:ортофосфат — бутирилтрансфераза*	Фосфат-бутирилтрансфераза	
2.3.1.13	Ацил-КоА:глицин — N-ацилтрансфераза	Глицин-ацилтрансфераза	
2.3.1.14	Фенилацетил-КоА: L-глутамин — α-N-фенилацетилтрансфераза	Глутамин-фенилацетилтрансфераза	
2.3.1.15	Ацил-КоА:L-глицерол-3-фосфат — O-ацилтрансфераза	Глицерофосфат-ацилтрансфераза	[S]
2.3.1.d	*Ацил-КоА:1,2-диглицерид — O-ацилтрансфераза*	Диглицерид-ацилтрансфераза	

Ацетил-КоА + Тиоэтаноламин = КоА + S-ацетилтиоэтаноламин	Печень, бактерии	[309, 947]
Ацетил-КоА + Дигидролипоат = КоА + 6-S-ацетилгидролипоат	Печень, бактерии Ацетилирует также монотиогликоль	[309, 947, 948]
Бутирил-КоА + Ортофосфат = КоА + Бутирилфосфат	Бактерии	[2706]
Ацил-КоА + Глицин = КоА + + N-ацилглицин	Ткани животных Реагирует с КоА-производными многих жирных и ароматических кислот	[2321]
Фенилацетил-КоА + L-глутамин = КоА + α-N-фенилацетил-L-глутамин	Ткани животных	[1846]
Ацил-КоА + L-глицерол-3-фосфат = КоА + Моноглицеридфосфат	Печень Действует только с КоА-производными жирных кислот с длиной цепи ($> C_{10}$); образует также диглицеридфосфаты	[1440]
Ацил-КоА + 1,2-диглицерид = КоА + Триглицерид	Печень, жировая ткань	[861, 2828]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
2.3.1.16	Ацил-КоА:ацетил-КоА — С-ацилтрансфераза	Ацетил-КоА — ацилтрансфераза, 3-кетоацил-КоА — тиолаза		Ацил-КоА + Ацетил-КоА = КоА + 3-оксоацил-КоА	Ткани животных, бактерии	[199, 860, 2517, 2524]
	2.3.2 Аминоацилтрансферазы					
2.3.2.1	Глутамин:D-глутамил — глутамилтрансфераза	D-Глутамилтрансфераза		L-(или D-)-глутамин + D-глутамил-R = NH_3 + 5-глутамил-D-глутамил-R	Бактерии	[2871]
	2.4 Гликозилтрансферазы (В тривиальных названиях вместо «глюкозилтрансфераза», «фруктозилтрансфераза» и т. д. допустимы обозначения «трансглюкозилаза», «трансфруктозилаза» и т. п.)					
	2.4.1 Гексозилтрансферазы					
2.4.1.1 К	α-1,4-глюкан:ортофосфат — глюкозилтрансфераза	α-Глюканфосфорилаза	ПФ (фермент млекопитающих)	(α-1,4-глюкозил)$_n$ + Ортофосфат ⇌ (α-1,4-глюкозил)$_{n-1}$ + + α-D-глюкозо-1-фосфат	Широко распространен Действует на крахмал, гликоген и т. д.	[179, 501, 509, 893, 997, 998, 2164, 2566, 2573]
2.4.1.2	Декстрин:α-1,6-глюкан — 6-глюкозилтрансфераза	Декстрин — 6-глюкозилтрансфераза		(α-1,4-глюкозил)$_n$ + (α-1,6-глюкозил)$_m$ = (α-1,4-глюкозил)$_{n-1}$ + (α-1,6-глюкозил)$_{m+1}$	Бактерии Превращает декстрины в 1,6-глюканы	[1050—1052]
2.4.1.3	α-1,4-глюкан:D-глюкоза — 4-глюкозилтрансфераза	Мальтозо — 4-глюкозилтрансфераза; амиломальтаза		(α-1,4-глюкозил)$_n$ + D-глюкоза = (α-1,4-глюкозил)$_{n-1}$ + + Мальтоза	Плазма крови, бактерии Превращает мальтозу в 1,4-глюкан и глюкозу	[165, 651, 1050, 1819, 1851]
2.4.1.4	α-1,4-глюкан:D-фруктоза — 2-глюкозилтрансфераза	Сахарозо-глюкозилтрансфераза; амилосахараза		(α-1,4-глюкозил)$_n$ + D-фруктоза = (α-1,4-глюкозил)$_{n-1}$ + + Сахароза	Бактерии Превращает сахарозу в 1,4-глюкан и фруктозу	[720, 1050, 1053]

2.4.1.5	α-1,6-глюкан:D-фруктоза — 2-глюкозилтрансфераза	Сахарозо — 6-глюкозилтрансфераза, декстрансахараза	
2.4.1.6	Мальтоза:D-глюкоза — 3-глюкозилтрансфераза	Мальтозо — 3-глюкозилтрансфераза	
2.4.1.7	Дисахарид — глюкозилтрансфераза (неспецифическая)	Сахарозо-глюкозилтрансфераза (ранее известная как сахарозофосфорилаза)	
2.4.1.8	Мальтоза:ортофосфат — глюкозилтрансфераза	Мальтозофосфорилаза	
2.4.1.a	*Целлобиоза:ортофосфат — глюкозилтрансфераза*	Целлобиозофосфорилаза	
2.4.1.9	β-1,2-фруктан:D-глюкоза — 1-фруктозилтрансфераза	Сахарозо — 1-фруктозилтрансфераза, инулосахараза	
2.4.1.10	β-2,6-фруктан:D-глюкоза — 6-фруктозилтрансфераза	Сахарозо — 6-фруктозилтрансфераза, левансахараза	
2.4.1.11	*УДФ-глюкоза:гликоген — α-4-глюкозилтрансфераза*	УДФ-глюкоза-гликоген — глюкозилтрансфераза, гликоген-УДФ — глюкозилтрансфераза	[Mg^{2+}, S]

(α-1,6-глюкозил)$_n$ + D-фруктоза = (α-1,6-глюкозил)$_{n-1}$ + + Сахароза	*Leuconostoc*, *Streptococcus* Превращает сахарозу в 1,6-глюкан и фруктозу	[139, 762, 870, 1049, 1050, 2538]
Мальтоза + D-глюкоза = D-глюкоза + α-1,3-глюкозил-глюкоза	Плесневые грибы	[168, 2061]
α-D-глюкозил-1-R + R′ = α-D-глюкозил-1-R′ + R	Бактерии R и R′ могут представлять собой различные кетозы, L-арабинозу, фосфат или арсенат	[1021, 1023]
Мальтоза + Ортофосфат = β-D-глюкозо-1-фосфат + D-глюкоза	Бактерии	[746, 2128, 2908]
Целлобиоза + Ортофосфат = α-D-глюкозо-1-фосфат + + D-глюкоза	Бактерии	[118]
(β-1,2-фруктозил)$_n$ + D-глюкоза = (β-1,2-фруктозил)$_{n-1}$ + + Сахароза	Растения Превращает сахарозу в инулин и глюкозу	[243, 579, 670]
(β-2,6-фруктозил)$_n$ + D-глюкоза = (β-2,6-фруктозил)$_{n-1}$ + + Сахароза	Бактерии Превращает сахарозу в фруктан и глюкозу; в качестве акцепторов фруктозильного остатка могут служить некоторые другие сахара	[104, 719, 720, 1050, 1090]
УДФ-глюкоза + (Гликоген)$_n$ = УДФ + (Гликоген)$_{n+1}$	Ткани животных, дрожжи, бактерии Превращает УДФ-глюкозу в гликоген и УДФ Активируется D-глюкозо-6-фосфатом и другими гексозофосфатами	[49, 177, 1543, 1545, 2230, 2734]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
2.4.1.b	*УДФ-глюкоза:α-1,4-глюкан — α-4-глюкозилтрансфераза*	УДФ-глюкоза-крахмал — глюкозилтрансфераза		УДФ-глюкоза + $(\alpha\text{-1,4-глюкозил})_n$ = УДФ + $(\alpha\text{-1,4-глюкозил})_{n+1}$	Растения Акцепторами могут служить крахмал, олигосахариды с 1,4-связями или мальтоза	[1541]
2.4.1.12	УДФ-глюкоза:β-1,4-глюкан — β-4-глюкозилтрансфераза	УДФ-глюкоза-β-глюкан — глюкозилтрансфераза; УДФ-глюкоза-целлюлоза — глюкозилтрансфераза, β-глюкан-УДФ — глюкозилтрансфераза		УДФ-глюкоза + $(\beta\text{-1,4-глюкозил})_n$ = УДФ + $(\beta\text{-1,4-глюкозил})_{n+1}$	Бактерии Превращает УДФ-глюкозу в целлюлозу и УДФ	[846]
2.4.1.13	УДФ-глюкоза:D-фруктоза — 2-глюкозилтрансфераза	УДФ-глюкоза-фруктоза — глюкозилтрансфераза, сахароза-УДФ — глюкозилтрансфераза		УДФ-глюкоза + D-фруктоза = УДФ + Сахароза	Растения	[406]
2.4.1.14	УДФ-глюкоза:D-фруктозо-6-фосфат — 2-глюкозилтрансфераза	УДФ-глюкоза-фруктозофосфат — глюкозилтрансфераза, сахарозофосфат-УДФ — глюкозилтрансфераза		УДФ-глюкоза + D-фруктозо-6-фосфат = УДФ + сахарозо-6-фосфат	Растения	[1796]

2.4.1.15	УДФ-глюкоза:D-глюкозо-6-фосфат — 1-глюкозилтрансфераза	УДФ-глюкоза-глюкозофосфат — глюкозилтрансфераза, трегалозофосфат-УДФ — глюкозилтрансфераза
2.4.1.16	УДФ-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкоза:хитин — ацетиламинодезоксиглюкозилтрансфераза	Хитин-УДФ — ацетиламинодезоксиглюкозилтрансфераза
2.4.1.c	*УДФ-галактоза*:D-*глюкоза — 1-галактозилтрансфераза*	УДФ-галактоза-глюкоза — галактозилтрансфераза
2.4.1.d	*УДФ-галактоза: сфингозин — О-галактозилтрансфераза*	УДФ-галактоза-сфингозин — галактозилтрансфераза, психозин-УДФ — галактозилтрансфераза
2.4.1.17	УДФ-глюкуронат — глюкуронилтрансфераза (неспецифичная к акцептору)	УДФ-глюкуронилтрансфераза
2.4.1.18 **К**	α-1,4-глюкан:α-1,4-глюкан — 6-гликозилтрансфераза	α-глюкан-ветвящая гликозилтрансфераза (ранее известная как Q-фермент или фактор разветвления)

УДФ-глюкоза + D-глюкозо-6-фосфат = УДФ + Трегалозо-6-фосфат	Ткани насекомых, дрожжи	[378, 390]
УДФ-2-ацетиламино-2-дезокси-D-глюкоза + (β-1,4-(2-ацетиламино-2-дезокси-D-глюкозил))$_n$ = УДФ + (β-1,4-(2-ацетиламино-2-дезокси-D-глюкозил))$_{n+1}$	Плесневые грибы Превращает УДФ-2-ацетиламино-2-дезокси-D-глюкозу в хитин и УДФ	[850]
УДФ-галактоза + D-глюкоза = УДФ + Лактоза	Молочная железа	[2796]
УДФ-галактоза + Сфингозин = УДФ + Психозин	Мозг	[457]
УДФ-глюкуронат + Акцептор = УДФ + Акцептор-глюкуронид	Печень Акцепторами могут служить разнообразные фенолы, спирты, амины и жирные кислоты	[112, 662, 1219, 2541]
Переносит часть цепи 1,4-глюкана из положения 4 в положение 6	Широко распространен Превращает амилозу в амилопектин	[166, 167, 179, 502, 835, 1050, 1053]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
2.4.1.e	*α-1,4-глюкан:α-1,4-олигоглюкан — 6-гликозилтрансфераза*	Олигоглюкан-ветвящая гликозилтрансфераза (ранее известная как Т-фермент растений)	
2.4.1.f	*α-1,4-глюкан:α-1,4-глюкан — 4-глюкозилтрансфераза*	Декстрин-гликозилтрансфераза (ранее известная как D-фермент, или диспропорционирующий фермент)	
2.4.1.19	α-1,4-глюкан — 4-гликозилтрансфераза (циклизующая)	Циклодекстрин-глюкозилтрансфераза	
2.4.1.g	*УДФ-глюкоза: ДНК — α-глюкозилтрансфераза*	УДФ-глюкоза-ДНК — α-глюкозилтрансфераза	
2.4.1.h	*УДФ-глюкоза: ДНК — β-глюкозилтрансфераза*	УДФ-глюкоза-ДНК — β-глюкозилтрансфераза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Переносит часть цепи 1,4-глюкана из положения 4 в положение 6	Растения, плесени Действует на 1,4-глюканы с короткой цепью	[1, 168, 2305]
Переносит часть цепи 1,4-глюкана в новое положение 4	Печень, растения Может превращать мальтодекстрин в амилозу и глюкозу	[1631, 2065, 2526, 2766]
Переносит часть цепи 1,4-глюкана на его собственный нередуцирующий конец	*B. macerans* Образует циклические декстрины	[166, 774, 1050, 2352]
Переносит α-глюкозильный остаток от УДФ-глюкозы на остаток оксиметилцитозина в молекуле ДНК	Бактерии, инфицированные фагом Различные ферменты вырабатываются различными фагами; в каждом случае ДНК инфицирующего фага не может служить акцептором	[1445]
Переносит β-глюкозильный остаток от УДФ-глюкозы на остаток оксиметилцитозина в молекуле ДНК	Бактерии, инфицированные фагом Т4 ДНК инфицирующего фага не может служить акцептором	[1445]

2.4.1.i	*УДФ-глюкоза:ДНК—β-глюкозилтрансфераза*	УДФ-глюкоза-ДНК—β-глюкозилтрансфераза	

2.4.2 Пентозилтрансферазы

2.4.2.1	Пуриннуклеозид: ортофосфат — рибозилтрансфераза	Пуриннуклеозид-фосфорилаза	
2.4.2.a	*Гуанозин:ортофосфат — рибозилтрансфераза*	Гуанозинфосфорилаза	
2.4.2.3	Уридин:ортофосфат — рибозилтрансфераза	Уридинфосфорилаза	
2.4.2.4	Тимидин:ортофосфат — дезоксирибозилтрансфераза	Тимидинфосфорилаза	
2.4.2.5	Нуклеозид:пурин (пиримидин) — рибозилтрансфераза	Нуклеозид-рибозилтрансфераза	
2.4.2.6	Нуклеозид:пурин (пиримидин) — дезоксирибозилтрансфераза	Нуклеозид-дезоксирибозилтрансфераза	
2.4.2.7	АМФ:пирофосфат—фосфорибозилтрансфераза	Аденин-фосфорибозилтрансфераза, АМФ-пирофосфорилаза	$[Mg^{2+}]$

Переносит β-глюкозильный остаток от УДФ-глюкозы на остаток глюкозилоксиметилцитозина в молекуле ДНК	Бактерии, инфицированные фагом Т6	[1445]
Пиринуклеозид + Ортофосфат = α-D-рибозо-1-фосфат + + Пурин	Ткани животных, дрожжи, бактерии Субстратная специфичность недостаточно изучена	[1069, 1184, 1287, 1289, 1422, 2139, 2266, 2681]
Гуанозин + Ортофосфат = Гуанин + D-рибозо-5-фосфат	Костный мозг Действует также на дезоксигуанозин	[2925]
Уридин + Ортофосфат = Урацил + D-рибозо-1-фосфат	Ткани животных *E. coli*	[391, 2040, 2104]
Тимидин + Ортофосфат = Тимин + 2-дезокси-D-рибозо-1-фосфат	Ткани животных	[784]
D-Рибозил-R + R′ = D-Рибозил-R′ + R	*E. coli* R и R′ — различные пурины и пиримидины	[1413]
2-дезокси-D-рибозил-R + R′ = 2-дезокси-D-рибозил-R′ + R	Бактерии R и R′ — различные пурины и пиримидины	[1291, 1670, 2256]
АМФ + Пирофосфат = Аденин + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат	Печень, дрожжи 5-амидо-4-имидазолкарбоксамид может заменять аденин	[747, 1433, 1630]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
2.4.2.8	ИМФ:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза	Гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза, ИМФ-пирофосфорилаза	[Mg^{2+}]
2.4.2.9	УМФ:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза	Урацил-фосфорибозилтрансфераза, УМФ-пирофосфорилаза	
2.4.2.10	Оротидин-5′-фосфат: пирофосфат-фосфорибозилтрансфераза	Оротат-фосфорибозилтрансфераза, оротидин-5′-фосфат — пирофосфорилаза	[Mg^{2+}]
2.4.2.11	Никотинатнуклеотид:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза	Никотинат-фосфорибозилтрансфераза	[Mg^{2+}]
2.4.2.12	Никотинамиднуклеотид: пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза	Никотинамид-фосфорибозилтрансфераза, НМН-пирофосфорилаза	
2.4.2.13	АТФ: L-метионин — S-аденозилтрансфераза	Метионин-аденозилтрансфераза	[Mg^{2+}, M^{+}, S]
2.4.2.14	Рибозиламин-5-фосфат:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза (амидирующая глутамат)	Амидофосфорибозилтрансфераза, фосфорибозилпирофосфат-амидотрансфераза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
ИМФ + Пирофосфат = Гипоксантин + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат	Печень, дрожжи Гуанин и 6-меркаптопурин могут заменять гипоксантин	[1433, 1630, 2207]
УМФ + Пирофосфат = Урацил + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат	Бактерии	[515]
Оротидин-5′-фосфат + Пирофосфат = Оротат + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат	Печень, дрожжи	[1432, 1589]
Никотинатрибонуклеотид + + Пирофосфат = Никотинат + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат	Эритроциты, дрожжи, бактерии	[1208, 1209]
Никотинамидрибонуклеотид + Пирофосфат = Никотинамид + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат	Эритроциты	[2116]
АТФ + L-метионин + H_2O = = Ортофосфат + Пирофосфат + S-аденозилметионин	Печень, дрожжи	[394, 396, 1896]
β-D-рибозиламин-5-фосфат + + Пирофосфат + L-глутамат = L-глутамин + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат + + H_2O	Печень	[866, 1015, 1016, 2922]

2.5 Переносят алкильные или родственные им группы

2.5.1.1	Диметилаллилпирофосфат:изопентенилпирофосфат — диметилаллилтрансфераза	Диметилаллилтрансфераза, пренилтрансфераза (ранее известная как фарнезилпирофосфатсинтетаза)	
2.5.1.a	*2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидинпирофосфат: 4-метил-5-(2'-фосфоэтил)-тиазол — 2-метил-4-аминопиримидин-5-метенилтрансфераза*	Тиаминфосфат-пирофосфорилаза	$[Mg^{2+}]$
2.5.1.2	Тиамин:(основание) — 2-метил-4-аминопиримидин-5-метенилтрансфераза	Тиаминаза I	
2.5.1.b	*S-аденозилметионин — алкилтрансфераза (циклизующая)*	Аденозилметионинциклотрансфераза	
2.5.1.c	*Галактозо-6-сульфат — алкилтрансфераза (циклизующая)*	Галактозо-6-сульфатаза, порфиран-сульфатаза	

Диметилаллилпирофосфат + + Изопентенилпирофосфат = Пирофосфат + Геранилпирофосфат	Дрожжи Переносит также остатки геранила и фарнезила	[1636]
2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидинпирофосфат + + 4-метил-5-(2′-фосфоэтил)-тиазол = Пирофосфат + Тиаминмонофосфат	Дрожжи	[385, 1529]
Тиамин + Пиридин = Гетеропиритиамин + Тиазол	Пресноводные рыбы, некоторые беспозвоночные, растения Различные основания и тиоловые соединения могут заменять пиридин	[797—801, 1363, 2194]
S-Аденозилметионин = 5′-метилтиоаденозин + 2-амино-γ-бутиролактон	Дрожжи, бактерии	[1894, 1895]
Отщепляет сульфат от галактозо-6-сульфатных остатков порфирана с образованием 3,6-ангидрогалактозных остатков	Морские водоросли	[2197, 2198]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7

2.6 Переносят азотистые группы

2.6.1 Аминотрансферазы

(В тривиальных названиях вместо «аминотрансфераза» допустимо обозначение «трансаминаза»)

2.6.1.1	L-аспартат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Аспартат-аминотрансфераза (ранее известная как глутамат-оксалоацетаттрансаминаза)	[ПФ]	L-аспартат + 2-оксоглутарат = Оксалоацетат + L-глутамат	Ткани животных, растения, бактерии	[158, 463, 464, 692, 864, 1254, 2877]
2.6.1.2	L-аланин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Аланин-аминотрансфераза (ранее известная как пируват-глутаматтрансаминаза)	[ПФ]	L-аланин + 2-оксоглутарат = Пируват + L-глутамат	Ткани животных, растения 2-аминобутират также реагирует (вместо аланина), но медленно	[2980, 2877]
2.6.1.3	L-цистеин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Цистеин-аминотрансфераза	[ПФ]	L-цистеин + 2-оксоглутарат = Меркаптопируват + L-глутамат	Печень	[439]
2.6.1.4	Глицин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Глицин-аминотрансфераза	[ПФ]	Глицин + 2-оксоглутарат = Глиоксилат + L-глутамат	Растения	[2307, 2877]
2.6.1.5	L-тирозин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Тирозин-аминотрансфереза	[ПФ]	L-тирозин + 2-оксоглутарат = *п*-Оксифенилпируват + L-глутамат	Ткани животных, дрожжи Фенилаланин заменяет тирозин	[392, 1108, 1361, 1410, 2267, 2373]
2.6.1.6	L-лейцин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Лейцин-аминотрансфераза	[ПФ]	L-лейцин + 2-оксоглутарат = 2-оксоизокапроат + L-глутарат	Ткани животных, растения, бактерии	[463, 2267, 2613]

2.6.1.7	L-кинуренин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Кинуренин-аминотрансфераза	[ПФ]
2.6.1.8	2,5-диаминовалерат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Аминотрансфераза диаминокислот	
2.6.1.9	L-гистидинолфосфат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Гистидинолфосфат-аминотрансфераза	[ПФ]
2.6.1.10	D-аспартат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	D-аспартат-аминотрансфераза	[ПФ]
2.6.1.11	α-N-ацетил-L-орнитин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	Ацетилорнитин-аминотрансфераза	[ПФ]
2.6.1.a	*N-сукцинил-L-2,6-диаминопимелат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза*	Сукцинилдиаминопимелат-аминотрансфераза	[ПФ]
2.6.1.12	L-аланин:2-оксокислота — аминотрансфераза	Аланин-кетокислотная аминотрансфераза	[ПФ]
2.6.1.13	L-орнитин:2-оксокислота — аминотрансфераза	Орнитин-кетокислотная аминотрансфераза	[ПФ]
2.6.1.14	L-аспарагин:2-оксокислота — аминотрансфераза	Аспарагин-кетокислотная аминотрансфераза	[ПФ]

L-кинуренин + 2-оксоглутарат = *o*-аминобензоилпируват + L-глутамат	Почки, плесневые грибы, бактерии	[1234, 1742]
2,5-диаминовалерат + 2-оксоглутарат = 5-амино-2-оксовалерат + L-глутамат	Ткани животных, плесневые грибы, бактерии 2,5-диаминоглутарат может заменять диаминовалерат	[2232]
L-гистидинолфосфат + 2-оксоглутарат = Имидазолацетолфосфат + L-глутамат	Плесневые грибы	[63]
D-аспартат + 2-оксоглутарат = Оксалоацетат + D-глутамат	Бактерии Пируват может заменять любую из двух кетокислот	[2648—2650]
α-N-ацетил-L-орнитин + 2-оксоглутарат = γ-Полуальдегид N-ацетил-L-глутаминовой кислоты + L-глутамат	Бактерии	[2739]
N-сукцинил-L-диаминопимелат + 2-оксоглутарат = N-сукцинил-2-амино-6-оксо-L-пимелат + L-глутамат	Бактерии	[2075]
L-аланин + 2-оксокислота = Пируват + L-аминокислота	Ткани животных, растения, бактерии	[55, 2268, 2292, 2877]
L-орнитин + 2-оксокислота = γ-Полуальдегид L-глутаминовой кислоты + L-аминокислота	Печень, плесневые грибы	[728, 1782, 2133]
L-аспарагин + 2-оксокислота = 2-оксосукцинамат + + Аминокислота	Печень	[1784]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
2.6.1.15	L-глутамин:2-оксокислота — аминотрансфераза	Глутамин-кетокислотная аминотрансфераза	[ПФ]	L-глутамин + 2-оксокислота = 2-оксоглутарамат + Аминокислота	Печень, почки Некоторые близкие аналоги L-глутамина могут его заменять	[1783]
2.6.1.16	L-глутамин:D-фруктозо-6-фосфат — аминотрансфераза	Глутамин-фруктозо-6-фосфат — аминотрансфераза; гексозофосфат-аминотрансфераза		L-глутамин + D-фруктозо-6-фосфат = 2-амино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат + L-глутамат	Печень, плесневые грибы	[824, 941, 1539]
2.6.1.b	*L-аланин:полуальдегид малоновой кислоты — аминотрансфераза*	β-Аланин-аминотрансфераза		L-аланин + Полуальдегид малоновой кислоты = Пируват + β-Аланин	Бактерии	[1037]
2.6.1.c	*4-аминобутират:2-оксоглутарат — аминотрансфераза*	Аминобутират-аминотрансфераза		4-аминобутират + 2-оксоглутарат = Полуальдегид янтарной кислоты + L-глутамат	Ткани животных, бактерии	[2358]
	2.6.2 Амидинотрансферазы (В тривиальных названиях вместо «амидинотрансфераза» допустимо обозначение «трансамидиназа»)					
2.6.2.1	L-аргинин:глицин — амидинотрансфераза	Глицин-амидинотрансфераза		L-аргинин + Глицин = L-орнитин + Гуанидинацетат	Почки, растения Канаванин может заменять аргинин	[295, 2181, 2182, 2769, 2770]
	2.6.3 Оксиминотрансферазы					
2.6.3.1	Пируватоксим:ацетон — оксиминотрансфераза	Оксиминотрансфераза		Пируватоксим + Ацетон = Пируват + Ацетоксим	Ткани шелковичного червя, водоросли Ацетальдегид может заменять ацетон; оксим D-глюкозы заменяет пируватоксим	[2930—2932]

2.7 Переносят группы, содержащие фосфор

2.7.1 Фосфотрансферазы со спиртовой группой в роли акцептора

2.7.1.1 К	АТФ:D-гексоза — 6-фосфотрансфераза	Гексокиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + D-гексоза = АДФ + + D-гексозо-6-фосфат	Ткани животных, плесневые грибы, дрожжи Акцепторами могут служить D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза и D-глюкозамин; ИТФ и дезокси-АТФ могут служить донорами	[138, 218, 548, 1493, 1991, 1996]
2.7.1.2	АТФ:D-глюкоза — 6-фосфотрансфераза	Глюкокиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + D-глюкоза = АДФ + + D-глюкозо-6-фосфат	Печень, бактерии	[356, 403]
2.7.1.a	*АТФ:D-глюкуронат — 1-фосфотрансфераза*	Глюкуронокиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + D-глюкуронат = АДФ + + α-D-глюкуронат-1-фосфат	Растения	[1945]
2.7.1.3	АТФ:D-фруктоза — 1-фосфотрансфераза	Кетогексокиназа	[Mg^{2+}, К]	АТФ + D-фруктоза = АДФ + + D-фруктозо-1-фосфат	Печень, мышцы, бактерии Акцепторами могут служить также D-сорбоза и D-тагатоза	[504, 1085, 1087, 1555, 2055]
2.7.1.4	АТФ:D-фруктоза — 6-фосфотрансфераза	Фруктокиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + D-фруктоза = АДФ + + D-фруктозо-6-фосфат	Растения, *Schistosoma*	[356, 1775]
2.7.1.5	АТФ:L-рамнулоза — 1-фосфотрансфераза	Рамнулокиназа		АТФ + L-рамнулоза = АДФ + + L-рамнулозо-1-фосфат	Бактерии	[2879]
2.7.1.6	АТФ:D-галактоза — 1-фосфотрансфераза	Галактокиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + D-галактоза = АДФ + + α-D-галактозо-1-фосфат	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии Акцептором может служить также D-галактозамин	[405, 1946, 2677, 2866]
2.7.1.b	*АТФ-D-галактуронат — 1-фосфотрансфераза*	Галактуронокиназа	[M^{2+}]	АТФ + D-галактуронат = АДФ + α-D-галактуронат-1-фосфат	Растения	[1947]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
2.7.1.7	АТФ:D-маннозо — 6-фосфотрансфераза	Маннокиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.8	АТФ:2-амино-2-дезокси-D-глюкоза — фосфотрансфераза	Глюкозаминкиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.10	АТФ:D-глюкозо-1-фосфат — 6-фосфотрансфераза	Фосфоглюкокиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.11	АТФ:D-фруктозо-6-фосфат — 1-фосфотрансфераза	Фосфофруктокиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.12	АТФ:D-глюконат — 6-фосфотрансфераза	Глюконокиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.13	АТФ:2-оксо-D-глюконат — 6-фосфотрансфераза	Оксоглюконокиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.c	*АТФ:2-оксо-3-дезокси-D-глюконат — 6-фосфотрансфераза*	Оксодезоксиглюконокиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.14	АТФ:D-седогептулоза — 7-фосфотрансфераза	Седогептулокиназа	$[Mg^{2+}]$

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
АТФ + D-маннноза = АДФ + D-маннозо-6-фосфат	*Schistosoma*	[356]
АТФ + 2-амино-2-дезокси-D-глюкоза = АДФ + 2-амино-2-дезокси-D-глюкозофосфат	*Schistosoma*	[356]
АТФ + D-глюкозо-1-фосфат = АДФ + D-глюкозо-1,6-дифосфат	Мышцы, дрожжи	[2045]
АТФ + D-фруктозо-6-фосфат = АДФ + D-фруктозо-1,6-дифосфат	Ткани животных, растения, дрожжи Акцептором может служить D-тагатозо-6-фосфат; УТФ, ЦТФ и ИТФ могут служить донорами	[114, 1598, 1900, 2146]
АТФ + D-глюконат = АДФ + + 6-фосфо-D-глюконат	Ткани животных, дрожжи, бактерии	[465, 1528, 1925, 2285]
АТФ + 2-оксо-D-глюконат = АДФ + 2-оксо-6-фосфо-D-глюконат	Бактерии	[769]
АТФ + 2-оксо-3-дезокси-D-глюконат = АДФ + 2-оксо-3-дезокси-6-фосфо-D-глюконат	Бактерии	[528]
АТФ + D-седогептулоза = АДФ + D-седогептулозо-7-фосфат	Бактерии	[666]

2.7.1.d	*АТФ:L-арабиноза — 1-фосфотрансфераза*	Арабинокиназа	[M^{2+}]
2.7.1.15	АТФ:D-рибоза — 5-фосфотрансфераза	Рибокиназа	[Mg^{2+}]
2.7.1.e	*АТФ:D-рибулоза — 5-фосфотрансфераза*	D-рибулокиназа	[Mg^{2+}]
2.7.1.16	АТФ:L-(или D)-рибулоза — 5-фосфотрансфераза	Рибулокиназа	[Mg^{2+}]
2.7.1.17	АТФ:D-ксилулоза — 5-фосфотрансфераза	Ксилулокиназа	[Mg^{2+}]
2.7.1.18	АТФ:D-рибозо-5-фосфат — 1-фосфотрансфераза	Фосфорибокиназа	
2.7.1.19	АТФ:D-рибулозо-5-фосфат — 1-фосфотрансфераза	Фосфорибулокиназа	[S, Mg^{2+}]
2.7.1.20	АТФ:аденозин — 5′-фосфотрансфераза	Аденозинкиназа	[Mg^{2+}]
2.7.1.f	*АТФ:уридин — 5′-фосфотрансфераза*	Уридинкиназа	[M^{2+}]
2.7.1.21	АТФ:тимидин — 5′-фосфотрансфераза	Тимидинкиназа	

АТФ + L-арабиноза = АДФ + + β-L-арабинозо-1-фосфат	Растения	[1946]
АТФ + D-рибоза = АДФ + D-рибозо-5-фосфат	Печень, дрожжи, бактерии Акцептором может служить также 2-дезокси-D-рибоза	[24, 838, 1045. 1614, 2284]
АТФ + D-рибулоза = АДФ + + D-рибулозо-5-фосфат	*Aerobacter*	[792]
АТФ + L-(или D)-рибулоза = АДФ + L-(или D)-рибулозо-5-фосфат	*Lactobacillus* Акцепторами могут служить также рибитол и L-арабитол	[361, 2406]
АТФ + D-ксилулоза = АДФ + + D-ксилулозо-5-фосфат	Печень, бактерии	[1092, 2430, 2562]
АТФ + D-рибозо-5-фосфат = АДФ + D-рибозо-1,5-дифосфат	Ткани животных	[2316]
АТФ + D-рибулозо-5-фосфат = АДФ + D-рибулозо-1,5-дифосфат	Растения	[1199, 1235]
АТФ + Аденозин = АДФ + + АМФ	Ткани животных, дрожжи Акцептором может служить также 2-аминоаденозин	[399, 1438]
АТФ + Уридин = АДФ + УМФ	Ткани животных Цитидин может служить акцептором, а ГТФ или ИТФ — донором	[2423]
АТФ + Тимидин = АДФ + Тимидин-5′-фосфат	Бактерии	[1431]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
2.7.1.22	АТФ:N-рибозилникотинамид — 5′-фосфотрансфераза	Рибозилникотинамидкиназа	
2.7.1.23	АТФ:НАД — 2′-фосфотрансфераза	НАД-киназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.24	АТФ:дефосфо-КоА — 3′-фосфотрансфераза	Дефосфо-КоА-киназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.25	АТФ:аденилилсульфат — 3′-фосфотрансфераза	Аденилилсульфаткиназа (ранее известная как АФС-киназа)	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.26	АТФ:рибофлавин — 5′-фосфотрансфераза	Рибофлавинкиназа (ранее известная как флавокиназа)	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.27	АТФ:эритритол — фосфотрансфераза	Эритритолкиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.28	АТФ:D-глицеральдегид — 3-фосфотрансфераза	Триокиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.1.29	АТФ:оксиацетон — фосфотрансфераза	Ацетолкиназа	
2.7.1.30 К	АТФ:глицерол — фосфотрансфераза	Глицеролкиназа	$[Mg^{2+}]$

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
АТФ + N-рибозилникотинамид = АДФ + Никотинамидрибонуклеотид	Печень	[2266]
АТФ + НАД = АДФ + НАДФ	Ткани животных, дрожжи	[1315, 1427, 2779]
АТФ + Дефосфо-КоА = АДФ + + КоА	Ткани животных	[2983, 2779]
АТФ + Аденилилсульфат = АДФ + 3′-фосфоаденилилсульфат	Ткани животных, дрожжи	[153, 2227]
АТФ + Рибофлавин = АДФ + + ФМН	Ткани животных, растения, дрожжи	[841, 1327]
АТФ + Эритритол = АДФ + + D-эритритол-4-фосфат	Бактерии	[1139]
АТФ + D-глицеральдегид = АДФ + D-глицеральдегид-3-фосфат	Печень	[1088]
АТФ + Оксиацетон = АДФ + + Оксиацетонфосфат	Печень	[2369]
АТФ + Глицерол = АДФ + + L-глицеро-3-фосфат	Печень, почки, дрожжи Акцепторами могут служить диоксиацетон и L-глицеральдегид; УТФ (а в случае фермента из дрожжей также ИТФ и ГТФ) может служить донором	[230, 350, 2860]

2.7.1.31	АТФ:D-глицерат — 3-фосфотрансфераза	Глицераткиназа	[Mg^{2+}]
2.7.1.32	АТФ:холин — фосфотрансфераза	Холинкиназа	[Mg^{2+}]
2.7.1.33	АТФ:пантотенат — 4′-фосфотрансфераза	Пантотенаткиназа	
2.7.1.34	АТФ:пантетеин — 4′-фосфотрансфераза	Пантетеинкиназа	[M^{2+}, Ф]
2.7.1.g	*АТФ:2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидин — 5-фосфотрансфераза*	Оксиметилпиримидинкиназа	
2.7.1.35	АТФ:пиридоксаль — 5-фосфотрансфераза	Пиридоксалькиназа	[M^{2+}]
2.7.1.h	*АТФ:4-метил-5-(2′-оксиэтил)-тиазол — 2′-фосфотрансфераза*	Оксиэтилтиазолкиназа	[Mg^{2+}]
2.7.1.36	АТФ:мевалонат — 5-фосфотрансфераза	Мевалонаткиназа	[M^{2+}]

АТФ + D-глицерат = АДФ + + 3-фосфо-D-глицерат	Печень, дрожжи	[257, 1203]
АТФ + Холин = АДФ + Фосфохолин	Ткани животных, дрожжи Акцепторами могут служить также этаноламин и его метилированные и этилированные производные	[2890]
АТФ + Пантотенат = АДФ + + 4′-фосфопантотенат	Бактерии	[339, 2086]
АТФ + Пантетеин = АДФ + + Пантетеин-4′-фосфат	Ткани животных	[1998]
АТФ + 2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидин = АДФ + + 2-метил-4-амино-5-фосфометилпиримидин	Дрожжи ЦТФ, УТФ и ГТФ также могут служить донорами	[1577]
АТФ + Пиридоксаль = АДФ + + Пиридоксаль-5-фосфат	Ткани животных, дрожжи, бактерии Акцепторами могут служить также пиридоксин, пиридоксамин и ряд их производных	[1193, 1650, 2678]
АТФ + 4-метил-5-(2′-оксиэтил)-тиазол = АДФ + 4-метил-5-(2′-фосфоэтил)-тиазол	Дрожжи	[385]
АТФ + Мевалонат = АДФ + + 5-фосфомевалонат	Печень, растения, дрожжи ГТФ, ЦТФ и УТФ также могут служить донорами	[1059, 1573, 1723, 2622]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
2.7.1.37	АТФ:протеин — фосфотрансфераза	Протеинкиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + Протеин = АДФ + фосфопротеин	Ткани животных	[174, 365, 2145]
2.7.1.38	АТФ:фосфорилаза — фосфотрансфераза	Киназа фосфорилазы	[M^{2+}]	4 АТФ + 2-фосфорилаза *b* = 4 АДФ + Фосфорилаза *a*	Ткани животных	[1459, 1460, 2164]
2.7.1.39	АТФ:L-гомосерин — О-фосфотрансфераза	Гомосеринкиназа	[M^{2+}]	АТФ + L-гомосерин = АДФ + + О-фосфогомосерин	Дрожжи	[750, 2795]
2.7.1.40 К	АТФ:пируват — фосфотрансфераза	Пируваткиназа	[Mg^{2+}, K^+]	АТФ + Пируват = АДФ + Фосфоенолпируват	Ткани животных Донорами могут служить также УТФ, ГТФ, ЦТФ, ИТФ и дезокси-АТФ. Фермент фосфорилирует также гидроксиламин и фторид в присутствии CO_2	[1438, 1477, 2558, 2654]
2.7.1.41	D-глюкозо-1-фосфат: D-глюкозо-1-фосфат — 6-фосфотрансфераза	Глюкозо-1-фосфат-фосфодисмутаза	[S]	D-глюкозо-1-фосфат + D-глюкозо-1-фосфат = D-глюкозо-1,6-дифосфат + D-глюкоза	Мышцы, бактерии	[1546, 2399]
2.7.1.42	D-глюкозо-1-фосфат: рибофлавин — 5′-фосфотрансфераза	Рибофлавинфосфотрансфераза		D-глюкозо-1-фосфат + Рибофлавин = D-глюкоза + ФМН	Бактерии	[1313]
	2.7.2 Фосфотрансферазы с карбоксильной группой в роли акцептора					
2.7.2.1	АТФ:ацетат — фосфотрансфераза	Ацетаткиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + Ацетат = АДФ + Ацетилфосфат	Бактерии, дрожжи Фосфорилирует также пропионат, но медленнее	[2246, 2524]
2.7.2.2	АТФ:карбамат — фосфотрансфераза	Карбаматкиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + NH_3 + CO_2 = АДФ + + Карбамоилфосфат	Бактерии	[852, 1266]

2.7.2.a	*АТФ:карбамат — фосфотрансфераза (дефосфорилирующая)*	Карбаматкиназа	[Mg^{2+}, Ацетилглутамат]	2 АТФ + NH_3 + CO_2 + H_2O = 2 АДФ + Фосфат + Карбамоилфосфат	Ткани животных Возможно, представляет собой систему ферментов	[1265, 1732, 1733]
2.7.2.3 К	АТФ:3-фосфо-D-глицерат — 1-фосфотрансфераза	Фосфоглицераткиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + 3-фосфо-D-глицерат = АДФ + 1,3-дифосфо-D-глицериновая кислота	Ткани животных, растения, дрожжи	[110, 354, 2169]
2.7.2.4	АТФ:L-аспартат — 4-фосфотрансфераза	Аспартаткиназа	[M^{2+}]	АТФ + L-аспартат = АДФ + 4-фосфо-L-аспартат	Дрожжи, бактерии	[254]

2.7.3 Фосфотрансферазы с азотистой группой в роли акцептора

2.7.3.1	АТФ:гуанидинацетат — фосфотрансфераза	Гуанидинацетаткиназа		АТФ + Гуанидинацетат = АДФ + Фосфогуанидинацетат	Некоторые кольчатые черви	[1114, 2640]
2.7.3.a	*АТФ:тауроциамин — фосфотрансфераза*	Тауроциаминкиназа		АТФ + Тауроциамин = АДФ + Фосфотауроциамин	Некоторые кольчатые черви	[1114, 2640]
2.7.3.2 К	АТФ:креатин — фосфотрансфераза	Креатинкиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + Креатин = АДФ + Фосфокреатин	Ткани животных Акцептором может служить также пегмин	[93, 701, 1479]
2.7.3.3 К	АТФ:L-аргинин — фосфотрансфераза	Аргининкиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + L-аргинин = АДФ + L-фосфоаргинин	Мышцы беспозвоночных	[143, 693, 932, 1868, 2592]
2.7.3.b	*АТФ:ломбрицин — фосфотрансфераза*	Ломбрицинкиназа		АТФ + Ломбрицин = АДФ + Фосфоломбрицин	Земляные черви	[2051]

2.7.4 Фосфотрансферазы с фосфатной группой в роли акцептора

2.7.4.1	АТФ:полифосфат — фосфотрансфераза	Полифосфаткиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + $(Фосфат)_n$ = АДФ + $(Фосфат)_{n+1}$	Дрожжи, бактерии	[1119, 1430, 1898]
2.7.4.2	АТФ:5-фосфомевалонат — фосфотрансфераза	Фосфомевалонаткиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + 5-фосфомевалонат = АДФ + 5-пирофосфомевалонат	Ткани животных, дрожжи	[274, 1059, 1064, 1573]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
2.7.4.a	*АТФ:2-метил-4-амино-5-фосфометилпиримидин — фосфотрансфераза*	Фосфометилпиримидинкиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.4.3 К	АТФ:АМФ — фосфотрансфераза	Аденилаткиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.4.4	АТФ:нуклеозидмонофосфат — фосфотрансфераза	Нуклеозидмонофосфаткиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.4.b	*АТФ:ГМФ — фосфотрансфераза*	Гуанилаткиназа	
2.7.4.5	АТФ:дезокси-ЦМФ — фосфотрансфераза	Дезоксицитидилаткиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.4.c	*АТФ:тимидинмонофосфат — фосфотрансфераза*	Тимидинмонофосфаткиназа	$[Mg^{2+}]$
2.7.4.6	АТФ:нуклеозиддифосфат — фосфотрансфераза	Нуклеозиддифосфаткиназа	$[M^{2+}]$
2.7.4.d	*ГТФ:АМФ — фосфотрансфераза*	ГТФ-аденилаткиназа	$[Mg^{2+}]$

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
АТФ + 2-метил-4-амино-5-фосфометилпиримидин = АДФ + 2-метил-4-амино-5-пирофосфометилпиримидин	Дрожжи	[1577]
АТФ + АМФ = АДФ + АДФ	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии Донором может служить также неорганический трифосфат	[447, 1583, 1980, 1981, 2021]
АТФ + нуклеозидмонофосфат = АДФ + нуклеозиддифосфат	Ткани животных, дрожжи Акцепторами могут служить многие нуклеотиды; другие нуклеозидтрифосфаты могут заменять АТФ	[828, 1072, 1590]
АТФ + ГМФ = АДФ + ГДФ	*Ascaris*	[702]
АТФ + дезокси-ЦМФ = АДФ + дезокси-ЦДФ	Бактерии Акцептором может служить также ЦМФ	[1195]
АТФ + Тимидинмонофосфат = АДФ + Тимидиндифосфат	Бактерии	[1195]
АТФ + Нуклеозиддифосфат = АДФ + Нуклеозидтрифосфат	Ткани животных, растения, дрожжи Акцепторами могут служить многие нуклеозиддифосфаты	[216, 828, 1389, 1464]
ГТФ + АМФ = ГДФ + АДФ	Ткани животных ИТФ может заменять ГТФ	[448]

2.7.5 Фосфотрансферазы, катализирующие реакции кажущегося внутримолекулярного переноса

2.7.5.1 К	α-D-глюкозо-1,6-дифосфат:α-D-глюкозо-1-фосфат — фосфотрансфераза	Фосфоглюкомутаза, глюкозофосфомутаза	[M^{2+}]	α-D-глюкозо-1,6-дифосфат + + α-D-глюкозо-1-фосфат = D-глюкозо-6-фосфат + α-D-глюкозо-1,6-дифосфат	Широко распространен	[335, 1651, 1829, 1920, 2109, 2530, 2571]
2.7.5.2	2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-1,6-дифосфат:2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-1-фосфат — фосфотрансфераза	Ацетилглюкозаминфосфомутаза	[Mg^{2+}]	2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-1,6-дифосфат + 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-1-фосфат = 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат + 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-1,6-дифосфат	Ткани животных, плесневые грибы	[1540, 2205]
2.7.5.3 К	2,3-дифосфо-D-глицерат:2-фосфо-D-глицерат — фосфотрансфераза	Фосфоглицеромутаза, глицератфосфомутаза		2,3-дифосфо-D-глицерат + + 2-фосфо-D-глицерат = 3-фосфо-D-глицерат + 2,3-дифосфо-D-глицерат	Широко распространен	[510, 2239, 2240, 2572]
2.7.5.4	1,3-дифосфо-D-глицериновая кислота:3-фосфо-D-глицерат — фосфотрансфераза	Дифосфоглицеромутаза, глицератфосфомутаза		1,3-дифосфо-D-глицериновая кислота + 3-фосфо-D-глицериновая кислота = 3-фосфо-D-глицерат + 2,3-дифосфо-D-глицерат	Ткани животных	[1273, 2175]

2.7.6 Пирофосфотрансферазы

2.7.6.1	АТФ:D-рибозо-5-фосфат — пирофосфотрансфераза	Рибозофосфат-пирофосфокиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + D-рибозо-5-фосфат = АМФ + 5-фосфо-α-D-рибозилпирофосфат	Печень	[1192, 1432, 2207]
2.7.6.2	АТФ:тиамин — пирофосфотрансфераза	Тиамин-пирофосфокиназа	[Mg^{2+}]	АТФ + Тиамин = АМФ + Тиаминпирофосфат	Ткани животных, дрожжи	[1554, 2391, 2529, 2822]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
	2.7.7 Нуклеотидилтрансферазы		
2.7.7.1	АТФ:НМН — аденилилтрансфераза	НМН-аденилилтрансфераза НАД-пирофосфорилаза	[Mg^{2+}]
2.7.7.a	*АТФ:никотинатмононуклеотид — аденилилтрансфераза*	Никотинатмононуклеотид-аденилилтрансфераза, дезамидо-НАД-пирофосфорилаза	[Mg^{2+}]
2.7.7.2	АТФ:ФМН — аденилилтрансфераза	ФМН-аденилилтрансфераза, ФАД-пирофосфорилаза	[Mg^{2+}]
2.7.7.3	АТФ:пантетеин-4′-фосфат — аденилилтрансфераза	Пантетеинфосфат-аденилилтрансфераза, дефосфо-КоА-пирофосфорилаза	[Mg^{2+}]
2.7.7.4	АТФ:сульфат — аденилилтрансфераза	Сульфат-аденилилтрансфераза	[Mg^{2+}]
2.7.7.5	АДФ:сульфат — аденилилтрансфераза	Сульфат-аденилилтрансфераза	
2.7.7.b	*АТФ:полинуклеотид — аденилилтрансфераза*	Полиаденилат-нуклеотидилтрансфераза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
АТФ + Никотинамидрибонуклеотид = Пирофосфат + + НАД	Ткани животных, дрожжи Акцептором может служить и никотинатнуклеотид	[95, 1426, 1437]
АТФ + Никотинатрибонуклеотид = Пирофосфат + Дезамидо-НАД	Бактерии	[1208]
АТФ + ФМН = Пирофосфат + + ФАД	Печень, растения, дрожжи, бактерии	[842, 2342]
АТФ + Пантетеин-4′-фосфат = Пирофосфат + Дефосфо-КоА	Ткани животных	[2983, 1998]
АТФ + Сульфат = Пирофосфат + Аденилилсульфат	Печень, дрожжи, плесневые грибы	[153, 1107, 2228, 2229]
АДФ + Сульфат = Ортофосфат + Аденилилсульфат	Ткани животных, дрожжи	[2227, 2228]
АТФ + (Аденилат)$_n$ = Пирофосфат + (Аденилат)$_{n+1}$	Ядра тимуса Действует также (медленно) на ЦТФ	[672]

2.7.7.c	*АТФ:РНК — аденилилтрансфераза*	РНК-аденилилтрансфераза	
2.7.7.d	*ЦТФ:РНК — цитидилилтрансфераза*	РНК-цитидилилтрансфераза	
2.7.7.6	Нуклеозидтрифосфат: РНК—нуклеотидилтрансфераза	РНК-нуклеотидилтрансфераза	
2.7.7.7	Дезоксинуклеозидтрифосфат: ДНК — дезоксинуклеотидилтрансфераза	ДНК-нуклеотидилтрансфераза	$[Mg^{2+}]$
2.7.7.8	Нуклеозиддифосфат: полинуклеотид-нуклеотидилтрансфераза	Полинуклеотид-нуклеотидилтрансфераза, полинуклеотидфосфорилаза	$[Mg^{2+}]$
2.7.7.e	*ГДФ:D-маннозо-1-фосфат — гуанилилтрансфераза*	Маннозо-1-фосфат — гуанилилтрансфераза, ГДФ-маннозофосфорилаза	
2.7.7.9	УТФ:α-D-глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза	Глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза, УДФГ-пирофосфорилаза	$[Mg^{2+}]$
2.7.7.f	*УТФ:2-ацетамидо-2-дезокси-α-D-глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза*	УДФ-глюкозамин-пирофосфорилаза	$[M^{2+}]$

АТФ + $РНК_n$ = Пирофосфат + + $РНК_{n+1}$ (РНК обозначает цепь РНК, состоящую из n нуклеотидных единиц)	Бактерии Включает также остаток ЦМФ, происходящий из молекулы ЦТФ	[803]
ЦТФ + $РНК_n$ = Пирофосфат + + $РНК_{n+1}$	Тимус	[1196]
m Нуклеозидтрифосфат + + $РНК_n$ = m Пирофосфат + + $РНК_{n+m}$	Ткани животных, бактерии В качестве «затравки» необходима ДНК	[2827]
n Дезоксинуклеозидтрифосфат + $ДНК_n$ = n Пирофосфат + 2$ДНК_n$	Ткани животных, бактерии Цепь ДНК играет роль «затравки»; фермент образует комплементарную цепь	[239, 283, 1532, 2319]
Нуклеозиддифосфат + $РНК_n$ = Ортофосфат + $РНК_{n+1}$	Сперма животных, растения, плесневые грибы, дрожжи, бактерии Донорами могут служить АДФ, ИДФ, ГДФ, УДФ и ЦДФ	[940, 978, 1605, 2008, 2011]
ГДФ + D-маннозо-1-фосфат = Ортофосфат + ГДФ-манноза	Дрожжи	[408]
УТФ + α-D-глюкозо-1-фосфат = Пирофосфат + УДФ-глюкоза	Молочная железа, растения, дрожжи	[839, 1289, 2435]
УТФ + 2-ацетамидо-2-дезокси-α-D-глюкозо-1-фосфат = Пирофосфат + УДФ-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкоза	Ткани животных, бактерии	[2056, 2561]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
2.7.7.10	УТФ:α-D-галактозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза	Галактозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза	$[Mg^{2+}]$
2.7.7.11	УТФ:α-D-ксилозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза	Ксилозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза	
2.7.7.12	УДФ-глюкоза:α-D-галактозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза	Гексозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза	$[Mg^{2+}]$
2.7.7.g	*Дезокси-ТТФ:α-D-глюкозо-1-фосфат — тимидилилтрансфераза*	Глюкозо-1-фосфат — тимидилилтрансфераза	
2.7.7.13	ГТФ:α-D-маннозо-1-фосфат — гуанилилтрансфераза	Маннозо-1-фосфат — гуанилилтрансфераза	
2.7.7.14	ЦТФ:этаноламинфосфат — цитидилилтрансфераза	Этаноламинфосфат-цитидилилтрансфераза	
2.7.7.15	ЦТФ:холинфосфат — цитидилилтрансфераза	Холинфосфат-цитидилилтрансфераза	$[Mg^{2+}]$
2.7.7.16 К	Полирибонуклеотид — 2-олигонуклеотидтрансфераза (циклизующая)	Рибонуклеаза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
УТФ + α-D-галактозо-1-фосфат = Пирофосфат + УДФ-галактоза	Ткани животных, дрожжи	[1218, 1289]
УТФ + α-D-ксилозо-1-фосфат = Пирофосфат + УДФ-ксилоза	Растения	[840]
УДФ-глюкоза + α-D-галактозо-1-фосфат = α-D-глюкозо-1-фосфат + УДФ-галактоза	Ткани животных, дрожжи, бактерии	[1290, 1498, 2435]
Дезокси-ТТФ + α-D-глюкозо-1-фосфат = Пирофосфат + + Дезокси-ТДФ-глюкоза	Бактерии	[1446, 2062]
ГТФ + α-D-маннозо-1-фосфат = Пирофосфат + ГДФ-манноза	Дрожжи	[1899]
ЦТФ + Этаноламинфосфат = Пирофосфат + ЦДФ-этаноламин	Ткани животных, растения, дрожжи	[1360]
ЦТФ + Холинфосфат = Пирофосфат + УДФ-холин	Ткани животных, растения, дрожжи	[292, 1360, 2873]
Переносит 3′-фосфат пиримидиннуклеотидного остатка полинуклеотида от положения 5′ соседнего	Ткани животных, особенно поджелудочная железа Катализирует также перенос фосфатной группы от положения 2′ циклического	[1074, 1109, 1308, 1654, 1720, 2479]

				нуклеотида на положение 2′ самого пиримидинового нуклеотида с образованием циклического 2′, 3′-нуклеотида	нуклеотида на воду: суммарная реакция приводит к деполимеризации РНК	
2.7.7.h	*Полирибонуклеотид — 2-олигонуклеотидтрансфераза (циклизующая)*	Рибонуклеаза		Действует на полирибонуклеотиды аналогично ферменту 2.7.7.16, но переносит наряду с пиримидинпуклеотидными остатками также и пуринпуклеотидные	Листья растений, бактерии Вызывает деполимеризацию РНК	[1132, 1721, 2480, 2691]

2.7.8. Переносят другие замещенные фосфатные группы

2.7.8.1	ЦДФ-этаноламин: 1,2-диглицерид — этаноламинфосфотрансфераза	Этаноламинфосфотрансфераза		ЦДФ-этаноламин + 1,2-диглицерид = ЦМФ + Фосфатидилэтаноламин	Печень, дрожжи	[1360]
2.7.8.2	ЦДФ-холин:1,2-диглицерид — холинфосфотрансфераза	Холинфосфотрансфераза	[Mg^{2+}]	ЦДФ-холин + 1,2-диглицерид = ЦМФ + Фосфатидилхолин	Печень, дрожжи	[1360, 2830]
2.7.8.a	*ЦДФ-холин:церамид — холинфосфотрансфераза*	Церамид-холинфосфотрансфераза		ЦДФ-холин + Церамид = ЦМФ + Сфингомиелин	Печень	[2493]

2.8 Переносят группы, содержащие серу

2.8.1 Сульфидтрансферазы

2.8.1.1 **K**	Тиосульфат:цианид — сульфидтрансфераза	Тиосульфат-сульфидтрансфераза (ранее известная как роданеза)		Тиосульфат + Цианид = Сульфит + Тиоцианат	Ткани животных Донорами могут служить и некоторые другие соединения, содержащие серу	[2472, 2473, 2847]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
2.8.1.2	3-меркаптопируват: цианид—сульфидтрансфераза	3-меркаптопируват-сульфидтрансфераза	
	2.8.2 Сульфотрансферазы		
2.8.2.1	3′-фосфоаденилилсульфат:фенол — сульфотрансфераза	Арилсульфотрансфераза	$[Mg^{2+}]$
2.8.2.a	*3′-фосфоаденилилсульфат:ариламин — сульфотрансфераза*	Ариламинсульфотрансфераза	$[Mg^{2+}]$
2.8.2.2	3′-фосфоаденилилсульфат:3-β-оксистероид — сульфотрансфераза	3-β-оксистероидсульфотрансфераза	
2.8.2.b	*3′-фосфоаденилилсульфат:эстронсульфотрансфераза*	Эстронсульфотрансфераза	
2.8.2.c	*3′-фосфоаденилилсульфат:хондроитин—сульфотрансфераза*	Хондроитинсульфотрансфераза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
3-меркаптопируват + Цианид = Пируват + Тиоцианат	Ткани животных Акцепторами могут служить также сульфит, сульфинаты, меркаптоэтанол и меркаптопируват	[727, 102, 2474]
3′-фосфоаденилилсульфат + + Фенол = Аденозин-3′,5′-дифосфат + Арилсульфат	Ткани животных	[347, 1107, 1997, 2228]
3′-фосфоаденилилсульфат + + Ариламин = Аденозин-3′,5′-дифосфат + Ариламинсульфат	Печень	[2273]
3′-фосфоаденилилсульфат + + 3-β-оксистероид = Аденозин-3′,5′-дифосфат + Стероид-3-β-сульфат	Печень	[1997]
3′-фосфоаденилилсульфат + + Эстрон = Аденозин-3′,5′-дифосфат + Эстрон-3-сульфат	Печень	[1997]
3′-фосфоаденилилсульфат + + Хондроитин = Аденозин-3′,5′-дифосфат + Хондроитин-4-сульфат	Ткани животных Акцепторами могут служить также олиго- и полисахариды, содержащие 2-ацетиламино-2-дезокси-D-галактозу	[550, 2577]

2.8.3 КоА-трансферазы

2.8.3.1	Ацетил-КоА:пропионат — КоА-трансфераза	Пропионат — КоА-трансфераза
2.8.3.2	*Сукцинил-КоА:оксалат — КоА-трансфераза*	Оксалат — КоА-трансфераза
2.8.3.3	Ацетил-КоА:малонат — КоА-трансфераза	Малонат — КоА-трансфераза
2.8.3.5	Сукцинил-КоА:3-оксокислота — КоА-трансфераза	КоА-трансфераза 3-кетокислот
2.8.3.6	Сукцинил-КоА:3-оксоадипат — КоА-трансфераза	3-оксоадипат — КоА-трансфераза

3. ГИДРОЛАЗЫ

3.1 Действуют на сложноэфирные связи

3.1.1 Гидролазы эфиров карбоновых кислот

3.1.1.1	Гидролаза эфиров карбоновых кислот	Карбоксилэстераза (ранее известная как алиэстераза или В-эстераза)

Ацетил-КоА + Пропионат = Ацетат + Пропионил-КоА	*Clostridia* Бутират и лактат также могут служить акцепторами	[2496]
Сукцинил-КоА + Оксалат = Сукцинат + Оксалил-КоА	*Pseudomonas oxalaticus*	[2135]
Ацетил-КоА + Малонат = Ацетат + Малонил-КоА	Бактерии	[1032]
Сукцинил-КоА + 3-оксокислота = Сукцинат + 3-оксоацил-КоА	Ткани животных, бактерии Акцепторами могут служить ацетоацетат и (в этих случаях реакция идет более медленно) 3-оксовалерат, 3-оксоизокапроат или 3-оксокапроат; малонил-КоА может заменять сукцинил-КоА	[2989, 2518]
Сукцинил-КоА + 3-оксоадипат = Сукцинат + 3-оксоадипил-КоА	*Pseudomonas*	[1314]
Эфир карбоновой кислоты + H_2O = Спирт + Карбоновая кислота	Ткани животных, растения, плесневые грибы, дрожжи Широкая специфичность	[17, 42, 43, 360, 490, 2714]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
3.1.1.2	Гидролаза арилэфиров	Ариласстераза (ранее известная как А-эстераза или, в одном случае, как параоксоназа)	
3.1.1.3	Гидролаза эфиров глицерина	Липаза	$[Ca^{2+}]$
3.1.1.4 К	Фосфатид — ацилгидролаза	Фосфолипаза А	$[Ca^{2+}]$
3.1.1.5 К	Лизолецитин — ацилгидролаза	Лизофосфолипаза, фосфолипаза В	
3.1.1.6	Гидролаза уксусных эфиров	Ацетилэстераза (фермент животных известен как С-эстераза)	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Фенилацетат + H_2O = Фенол + Уксусная кислота	Ткани животных Действует на многие эфиры фенолов; фермент из бараньей сыворотки гидролизует также параоксон	[42, 100, 1691, 1692]
Триглицерид + H_2O = Диглицерид + Жирная кислота	Ткани животных, особенно поджелудочная железа, растения, бактерии Панкреатическая липаза действует только на поверхности раздела вода — эфир. Гидролизует преимущественно внешние (α-)эфирные связи	[1425, 1643, 1737, 1760, 2302, 2303, 2410]
Лецитин + H_2O = Лизолецитин + Ненасыщенная жирная кислота	Яд змей, скорпионов, ос и т. д.; бактерии Действует также на фосфатидилэтаноламин, холинплазмалоген и фосфатидные кислоты, удаляя жирную кислоту, присоединенную в положении 2	[574, 642, 770, 965, 991, 1616, 2223]
Лизолецитин + H_2O = Глицерофосфохолин + Жирная кислота	Ткани животных, яд ос, растения, плесневые грибы	[492, 572, 573, 713, 2378]
Эфир уксусной кислоты + H_2O = Спирт + Уксусная кислота	Ткани животных, плоды цитрусовых, плесневые грибы	[42, 224, 227, 375, 1243, 1244]

3.1.1.7	Ацетилхолин — ацетилгидролаза	Ацетилхолинэстераза (ранее известная как «истинная холинэстераза»)	
3.1.1.8	Ацилхолин — ацилгидролаза	Холинэстераза (ранее известная как «псевдохолинэстераза»)	
3.1.1.9	Бензоилхолин — гидролаза	Бензоилхолинэстераза	
3.1.1.10	Атропин — ацилгидролаза	Тропинэстераза	
3.1.1.11	Пектин — пектилгидролаза	Пектинэстераза	$[M^{2+}]$
3.1.1.12	Витамин-А-ацетат — гидролаза	Витамин-А-эстераза	
3.1.1.13	Гидролаза стероловых эфиров	Холестеролэстераза	
3.1.1.14	Хлорофилл — хлорофиллидогидролаза	Хлорофиллаза	

Ацетилхолин + H_2O = Холин + Уксусная кислота	Ткани животных, яд змей Действует на различные эфиры уксусной кислоты; катализирует также реакции переноса ацетила	[97, 225, 541, 556, 1618, 1794, 1918, 2032, 2882, 2971]
Ацилхолин + H_2O = Холин + + Кислота	Ткани животных, кровь Действует на многие эфиры холина и на некоторые другие соединения	[97, 100, 556, 559, 1793, 1794, 1918, 2552]
Бензоилхолин + H_2O = Холин + Бензойная кислота	Ткани животных	[1418, 2312]
Атропин + H_2O = Тропин + + Троповая кислота	Некоторые породы кроликов Действует также на кокаин и другие эфиры тропина	[855]
Пектин + nH_2O = nМетанол + + Пектиновая кислота	Растения, плесневые грибы, бактерии	[600, 1597, 1828]
Витамин-А-ацетат + H_2O = Витамин А + Уксусная кислота	Ткани животных	[1661, 1679]
Эфир холестерола + H_2O = Холестерол + Кислота	Панкреатический сок, печень, сыворотка собаки Действует также на эфиры холестанола и некоторых других стеролов	[376, 1079, 1447, 1967, 2583, 2584]
Хлорофилл + H_2O = Фитол + + Хлорофиллид	Растения, фотосинтезирующие бактерии Катализирует также реакции переноса хлорофиллида, например превращает хлорофилл в растворе метанола в метилхлорофиллид	[1131, 1395]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
3.1.1.15	L-Арабоно-γ-лактон — гидролаза	Арабонолактоназа		L-арабоно-γ-лактон + H_2O = L-арабоновая кислота	Бактерии	[2825]
3.1.1.16	4-карбоксиметил-4-оксиизокротонолактон — гидролаза	4-карбоксиметил-4-оксиизокротонолактоназа		4-карбоксиметил-4-оксиизокротонолактон + H_2O = 3-оксоадипиновая кислота	Бактерии	[2419]
3.1.1.17	D-глюконо-δ-лактон — гидролаза	Глюконолактоназа	[M^{2+}]	D-глюконо-δ-лактон + H_2O = D-глюконовая кислота	Ткани животных, дрожжи, бактерии Действует также на D-глюконо-δ-лактон-6-фосфат	[332, 682]
3.1.1.18	D-(или L)-гулоно-γ-лактон — гидролаза	Альдонолактоназа		D-(или L)-гулоно-γ-лактон + + H_2O = Гулоновая кислота	Ткани животных	[352, 441]
3.1.1.19	D-Глюкуроно-δ-лактон — гидролаза	Уронолактоназа		D-глюкуроно-δ-лактон + + H_2O = D-глюкуроновая кислота	Ткани животных	[2889]
3.1.1.20	Таннин — ацилгидролаза	Танназа		Дигаллат + H_2O = 2 Галловая кислота	Плесневые грибы Гидролизует сложноэфирные связи и в других таннинах	[663]
	3.1.2 Гидролазы тиоловых эфиров					
3.1.2.1	Ацетил-КоА—гидролаза	Ацетил-КоА — гидролаза		Ацетил-КоА + H_2O = КоА + + Уксусная кислота	Сердце	[823]
3.1.2.2	Пальмитоил-КоА — гидролаза	Пальмитоил-КоА — гидролаза		Пальмитоил-КоА + H_2O = КоА + Пальмитиновая кислота	Ткани животных, дрожжи	[2107, 2492]
3.1.2.3	Сукцинил-КоА — гидролаза	Сукцинил-КоА — гидролаза		Сукцинил-КоА + H_2O = КоА + + Янтарная кислота	Сердце	[823]

3.1.2.4	3-оксиизобутирил-КоА — гидролаза	3-оксиизобутирил-КоА — гидролаза	
3.1.2.5	3-окси-3-метилглутарил-КоА — гидролаза	Оксиметилглутарил-КоА — гидролаза	
3.1.2.6	S-2-оксиацилглутатион — гидролаза	Оксиацилглутатионгидролаза (ранее известная как глиоксалаза II)	
3.1.2.7	S-ацилглутатион — гидролаза	Глутатион-тиолэстераза	
3.1.2.8	S-ацетоацетилглутатион — гидролаза	Ацетоацетилглутатион — гидролаза	

3.1.3 Гидролазы фосфомоноэфиров

3.1.3.1	Фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты	Щелочная фосфатаза	[M^{2+}]
3.1.3.2	Фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты	Кислая фосфатаза	
3.1.3.a	*Фосфогликолат — фосфогидролаза*	Фосфогликолат-фосфатаза	[M^{2+}]

3-оксиизобутирил-КоА + + H_2O = КоА + 3-оксиизомасляная кислота	Ткани животных, бактерии, плесневые грибы Гидролизует также 3-оксипропионил-КоА	[2210]
3-окси-3-метилглутарил-КоА + H_2O = КоА + 3-окси-3-метилглутаровая кислота	Ткани животных, плесневые грибы, бактерии	[585]
S-2-оксиацилглутатион + + H_2O = Восстановленный глутатион + 2-оксикислота	Ткани животных	[2150]
S-ацилглутатион + H_2O = Восстановленный глутатион + Кислота	Ткани животных	[1375]
S-ацетоацетилглутатион + + H_2O = Восстановленный глутатион + Ацетоуксусная кислота	Печень	[2522]
Моноэфир ортофосфорной кислоты + H_2O = Спирт + H_3PO_4	Ткани животных, молоко Широкая специфичность; катализирует также реакции трансфосфорилирования	[57, 699, 1873—1876, 2676]
Моноэфир ортофосфорной кислоты + H_2O = Спирт + + H_3PO_4	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии Широкая специфичность; катализирует также реакции трансфосфорилирования	[868, 1274, 1496, 1612, 2680, 2683]
Фосфогликолат + H_2O = Гликолат + H_3PO_4	Растения	[2217]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
3.1.3.3	Фосфосерин — фосфогидролаза	Фосфосеринфосфатаза	$[M^{2+}]$	L-(или D)-фосфосерин + $+H_2O$ = L-(или D)-серин + $+H_3PO_4$	Печень, дрожжи, бактерии	[293, 1951]
3.1.3.b	*2-фосфоглицерол — фосфогидролаза*	Глицеролфосфатаза	$[Fe^{3+}]$	2-фосфоглицерол + H_2O = Глицерол + H_3PO_4	Растения	[2171]
3.1.3.4	L-α-фосфатидат — фосфогидролаза	Фосфатидатфосфатаза		L-α-фосфатидат + H_2O = D-2,3 (или L-1,2)-диглицерид + $+H_3PO_4$	Ткани животных	[2456]
3.1.3.5	5′-рибонуклеотид — фосфогидролаза	5-нуклеотидаза	$[Mg^{2+}]$	5′-рибонуклеотид + H_2O = Рибонуклеозид + H_3PO_4	Ткани животных, яд змей, бактерии Широкая специфичность в отношении 5′-нуклеотидов	[946, 1067, 2362]
3.1.3.6	3′-рибонуклеотид — фосфогидролаза	3-нуклеотидаза		3′-рибонуклеотид + H_2O = Рибонуклеозид + H_3PO_4	Растения Широкая специфичность в отношении 3′-нуклеотидов	[2397]
3.1.3.7	Аденозин-3′, 5′-дифосфат — 3′-фосфогидролаза	Фосфоаденилат-3-нуклеотидаза	$[Mg^{2+}]$	Аденозин-3′,5′-дифосфат + $+H_2O$ = АМФ + H_3PO_4	Печень Действуют также на 3′-фосфоаденилилсульфат	[347]
3.1.3.8	*мио*-Инозитолгексафосфат — фосфогидролаза	Фитаза	$[Mg^{2+}]$	*мио*-Инозитолгексафосфат + $+6H_2O$ = *мио*-Инозитол + $+6H_3PO_4$	Растения, плесневые грибы	[752, 1648, 2067]
3.1.3.9	D-глюкозо-6-фосфат — фосфогидролаза	Глюкозо-6-фосфатаза		D-глюкозо-6-фосфат + H_2O = D-глюкоза + H_3PO_4	Печень Действует также на 2-амино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат	[1087, 1512, 1694, 2579]

3.1.3.10	D-глюкозо-1-фосфат — фосфогидролаза	Глюкозо-1-фосфатаза	
3.1.3.11	D-фруктозо-1,6-дифосфат — 1-фосфогидролаза	Гексозодифосфатаза	$[Mg^{2+}]$
3.1.3.12	Трегалозо-6-фосфат — фосфогидролаза	Трегалозофосфатаза	$[Mg^{2+}]$
3.1.3.13	2,3-дифосфо-D-глицерат — 2-фосфогидролаза	Дифосфоглицератфосфатаза	
3.1.3.14	Метилтио-3-фосфо-D-глицерат — фосфогидролаза	Метилтиофосфоглицератфосфатаза	
3.1.3.15	L-гистидинолфосфат — фосфогидролаза	Гистидинолфосфатаза	
3.1.3.16	Фосфопротеин — фосфогидролаза	Фосфопротеинфосфатаза	
3.1.3.17	Фосфогидролаза фосфорилазы	Фосфатаза фосфорилазы (ранее известная как PR-фермент)	

D-глюкозо-1-фосфат + H_2O = D-глюкоза + H_3PO_4	Кровь шелковичных червей, растения Действует также (медленно) на D-галактозо-1-фосфат	[716, 2688]
D-фруктозо-1,6-дифосфат + + H_2O = D-фруктозо-6-фосфат + H_3PO_4	Ткани животных	[867, 1844]
Трегалозо-6-фосфат + H_2O = Трегалоза + H_3PO_4	Ткани насекомых, дрожжи	[378, 390]
2,3-дифосфо-D-глицерат + + H_2O = 3-фосфо-D-глицерат + H_3PO_4	Ткани животных, дрожжи	[1272, 2174]
Метилтио-3-фосфо-D-глицерат + H_2O = Метилтио-D-глицерат + H_3PO_4	Дрожжи	[257]
L-гистидинолфосфат + H_2O = L-гистидинол + H_3PO_4	Плесневые грибы	[60]
Фосфопротеин + nH_2O = Протеин + nH_3PO_4	Ткани животных Действует на казеин и другие фосфопротеины; фермент из селезенки действует также на фосфоэфиры фенолов и фосфоамиды	[2041, 2249, 2568]
Фосфорилаза *a* + $4H_2O$ = 2 Фосфорилаза *b* + $4H_3PO_4$	Ткани животных	[890, 1355, 2164, 2919]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
	3.1.4 Гидролазы фосфодиэфиров					
3.1.4.1	Фосфогидролаза ортофосфорных диэфиров	Фосфодиэстераза	[Mg^{2+}]	Фосфодиэфир + H_2O = Фосфомоноэфир + Спирт	Широко распространен Широкая специфичность; из полинуклеотидов фосфодиэстераза селезенки образует 3′-нуклеотиды, а фермент змеиного яда — 5′-нуклеотиды	[28, 561, 582, 945, 1104, 1678, 2190—2192, 2856, 2867]
3.1.4.2	L-3-глицерилфосфорилхолин — глицерофосфогидролаза	Глицерофосфорилхолин-диэстераза		L-3-глицерилфосфорилхолин + H_2O = Холин + Глицерол-1-фосфат	Ткани животных, бактерии Действует также на L-3-глицерилфосфорилэтаноламин	[571, 1033, 1036, 2814]
3.1.4.3	Фосфатидилхолин — холинфосфогидролаза	Фосфолипаза C (α-токсин *Clostridium Welchii*; β- и γ-токсины *Clostridium oedematiens*)	[Ca^{2+}]	Фосфатидилхолин + H_2O = = 1,2-диглицерид + Холинфосфат	Мозг, бактериальные токсины, яды змей Действует также на сфингомиелин	[321, 655, 994, 1615, 1656, 1657]
3.1.4.4	Фосфатидилхолин — фосфатидогидролаза	Фосфолипаза D	[Ca^{2+}]	Фосфатидилхолин + H_2O = Холин + Фосфатидат	Растения Действует также на другие фосфатиды	[681, 992, 993, 2669]
3.1.4.5 К	Дезоксирибонуклеат — олигонуклеотидогидролаза	Дезоксирибонуклеаза	[Mg^{2+}]	ДНК + $(n-1)$ H_2O = n Олигодезоксирибонуклеотид	Ткани животных, особенно поджелудочная железа	[583, 1492, 2403]
3.1.4.6	Дезоксирибонуклеат — 3′-нуклеотидогидролаза	Дезоксирибонуклеаза II		Образует 3′-нуклеотиды из ДНК	Ткани животных, бактерии	[524, 583, 771, 1416, 1452, 2403]

3.1.4.7		Нуклеаза микрококков		Расщепляет РНК и ДНК с образованием 3′-нуклеотидов; у ДНК проявляет предпочтительное сродство к аденин-тимин-нуклеотидной паре	*Micrococcus*	[48]
3.1.4.a		Нуклеаза *Azotobacter*		Расщепляет РНК и ДНК с образованием 5′-нуклеотидов	*Azotobacter*	[2528]
3.1.4.8	Рибонуклеат — 3′-гуанилогидролаза	Рибонуклеаза *Aspergillus oryzae*		Расщепляет РНК, образуя 3′-гуанилат или олигонуклеотиды с гуанилатными концевыми группами	*Aspergillus*	[2602]
	3.1.5 Гидролазы трифосфомоноэфиров					
3.1.5.1	Дезокси-ГТФ — трифосфогидролаза	Дезокси-ГТФ-аза		Дезокси-ГТФ + H_2O = Дезоксигуанозин + Трифосфат	Бактерии Действует также на ГТФ	[1443]
	3.1.6 Гидролазы сульфоэфиров					
3.1.6.1	Арилсульфат — сульфогидролаза	Арилсульфатаза	$[Cl^-]$ (в некоторых случаях)	Фенолосерный эфир + H_2O = Фенол + H_2SO_4	Ткани животных, растения, плесневые грибы, бактерии Группа ферментов, сходных по специфичности	[637, 638, 641, 2269, 2271, 2272, 2809]
3.1.6.a	*Холинсульфат — сульфогидролаза*	Холинсульфатаза		Холинсульфат + H_2O = Холин + H_2SO_4	*Pseudomonas*	[2605]
3.1.6.2	Стеролсульфат — сульфогидролаза	Стеролсульфатаза		Дегидро-*эпи*-андростерон-3-сульфат + H_2O = Дегидро-*эпи*-андростерон + H_2SO_4	Различные беспозвоночные Действует также на некоторые родственные стеролсульфаты	[2270, 2272, 2535]
3.1.6.3	Сульфогидролаза гликосульфатов	Гликосульфатаза		D-глюкозо-6-сульфат + H_2O = = D-глюкоза + H_2SO_4	Различные беспозвоночные бактерии Действует также на другие сульфаты моно- и дисахаров и на аденозин-5′-сульфат	[635, 676, 790, 2272]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
3.1.6.4	Хондроитинсульфат — сульфогидролаза	Хондросульфатаза	
3.1.6.b	*Целлюлозосульфат — сульфогидролаза*	Целлюлозо-полисульфатаза	

3.2 Действуют на гликозильные соединения

3.2.1 Гидролазы гликозидов

3.2.1.1 К	α-1,4-глюкан — 4-глюканогидролаза	α-Амилаза	Ca,[A]
3.2.1.2 К	α-1,4-глюкан — мальтогидролаза	β-Амилаза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Гидролитически отщепляет 6-сульфатные группы от 2-ацетамидо-2-дезокси-D-галактозо-6-сульфатных единиц хондроитинсульфата	Моллюски, плесневые грибы, бактерии	[636, 639, 1942, 2089]
Отщепляет гидролитически 2- и 3-сульфатные группы от полисульфатов целлюлозы и харонина	Морские беспозвоночные	[2603]
Гидролизует α-1,4-глюкановые связи в полисахаридах, содержащих три или более остатков D-глюкозы, соединенных α-1,4-связями	Ткани животных, слюна, растения, плесневые грибы, бактерии Действует на крахмал, гликоген и родственные поли- и олигосахариды; связи разрываются без определенного порядка	[27, 333, 739, 1707, 1708, 1724, 2353, 2699]
Гидролизует α-1,4-глюкановые связи в полисахаридах, последовательно отщепляя остатки мальтозы от нередуцирующих концов цепей	Растения Действует на крахмал, гликоген и родственные поли- и олигосахариды, образуя путем инверсии β-мальтозу	[148, 772, 1707, 1807]

3.2.1.3	α-1,4-глюкан — глюкогидролаза	Глюкоамилаза
3.2.1.4 К	β-1,4-глюкан — 4-глюканогидролаза	Целлюлаза
3.2.1.6	*β-1,3(4)-глюкан — глюканогидролаза*	Ламинариназа
3.2.1.7	Инулин — 1-фруктаногидролаза	Инулаза
3.2.1.8 К	Ксилан — 4-ксиланогидролаза	Ксиланаза
3 2.1.a	*Ксилан — 3-ксиланогидролаза*	1,3-ксиланаза
3.2.1.9	*Амилопектин — 6-глюканогидролаза*	Амилопектин-1,6-глюкозидаза (ранее известная как R-фермент)
3.2.1.b	*Декстрин — 6-глюканогидролаза*	Декстрин-1,6-глюкозидаза (ранее известная как амило-1,6-глюкозидаза)

Гидролизует α-1,4-глюкановые связи в полисахаридах, последовательно отщепляя остатки глюкозы от нередуцирующих концов цепей	Кровь, плесневые грибы, бактерии Действует на крахмал, гликоген и родственные поли- и олигосахариды	[773, 1366, 1818, 2083]
Гидролизует β-1,4-глюкановые связи в целлюлозе	*Helix*, растения, грибы, бактерии Фермент из грибов катализирует также перенос остатков целлобиозы	[983, 1909, 1974, 1975, 2542, 2851, 2852]
Гидролизует β-1,3-глюкановые связи или β-1,4-глюкановые связи, соседние с β-1,3-связью	Растения, водоросли, грибы Гидролизует ламинарин; гидролизует также лихенин до β-1,3-целлобиозил-D-глюкозы	[526, 659, 1866, 1904, 2199]
Гидролизует β-1,2-фруктановые связи в инулине	Дрожжи	[16]
Гидролизует β-1,4-ксилановые связи	Беспозвоночные, растения, плесневые грибы, бактерии	[889, 1175, 1210, 2850]
Гидролизует β-1,3-ксилановые связи		[802]
Гидролизует α-1,6-глюкановые связи в амилопектине	Растения	[1115, 1673, 1707]
Гидролизует α-1,6-глюкановые связи в декстринах, содержащих короткие боковые цепи с 1,6-связями	Ткани животных, дрожжи	[503, 1522, 1707]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
3.2.1.10 К	*Олигодекстрин — 6-глюканогидролаза*	Олиго-1,6-глюкозидаза (ранее известная как «предельная декстраназа»)		Гидролизует α-1,6-глюкановые связи в изомальтозе, панозе и декстринах, образуемых α-амилазой из крахмала и гликогена	Кишечник, растения, плесневые грибы	[1519, 1521, 1673, 2699]
3.2.1.11	α-1,6-глюкан—6-глюканогидролаза	Декстраназа		Гидролизует α-1,6-глюкановые связи	Ткани животных, плесневые грибы, бактерии	[21, 140, 531, 738, 1188, 2275]
3.2.1.12	Циклогептаглюкан — 4-глюканогидролаза	Циклогептаглюканаза	[Ca^{2+}]	Гидролизует одну α-1,4-глюкановую связь в циклогептаглюкане, образуя линейный гептаглюкан	Плесневые грибы Не вызывает инверсии	[206, 1405]
3.2.1.13	Циклогексаглюкан—4-глюканогидролаза	Циклогексаглюканаза	[Ca^{2+}]	Гидролизует одну α-1,4-глюкановую связь в циклогексаглюкане, образуя линейный гексаглюкан	Плесневые грибы Действие связано с инверсией и приводит к образованию концевой β-конфигурации	[206, 1405]
3.2.1.14	Хитин — гликаногидролаза	Хитиназа		Гидролизует α-1,4-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозидные связи в хитине и хитодекстрине	Беспозвоночные, растения, плесневые грибы	[1255, 1257, 2674, 2962, 2963]
3.2.1.15	Полигалактуронид — гликаногидролаза	Полигалактуроназа (ранее известная как пектиназа)		Гидролизует α-1,4-D-галактуронидные связи в пектинатах и других полигалактуронидах	Улитки, некоторые растения, грибы, дрожжи, бактерии	[600, 1597, 1628, 1652, 1816, 2082]
3.2.1.16	Альгинат — гликаногидролаза	Альгиназа		Гидролизует β-1,4-маннуронидные связи в альгинатах	Бактерии	[1421, 2758]

3.2.1.17 **K**	N-ацетилмурамид — гликаногидролаза	Мурамидаза (ранее известная как лизоцим)	
3.2.1.18	N-ацетилнейраминат — гликогидролаза	Нейраминидаза	
3.2.1.c	*Хондроитинсульфат — глюканогидролаза*	Хондроитиназа	
3.2.1.d	*Гиалуронат — гликаногидролаза*	Гиалуронидаза	
3.2.1.e	*Гиалуронат — гликаногидролаза*	Гиалуронидаза	
3.2.1.19	Гепарин — гликаногидролаза	Гепариназа	

Вероятно, гидролизует β-1,4-связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозы в мукополисахариде или мукопептиде	Селезенка, яичный белок, слизь из полости носа, латекс растений Растворяет вещество клеточной оболочки некоторых видов бактерий; медленно действует также на хитин	[3, 40, 345, 1260, 1261, 1805, 2446]
Вероятно, гидролизует концевые α-2,6-связи между остатками N-ацетилнейраминовой кислоты и 2-ацетамидо-2-дезокси-D-галактозы в различных мукополисахаридах	Некоторые патогенные бактерии и миксовирусы	[880—882]
Гидролизует β-1,4-связи между остатками 2-ацетамидо-2-дезокси-D-галактозосульфата и D-глюкуроната в хондроитинсульфате	Бактерии Гидролизует также гиалуронат	[1740]
Гидролизует связи между остатками 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозы и D-глюкуроната в гиалуронате	Семенники, яд змей Действует также на сульфаты хондроитина и мукоитина; может катализировать трансгликозилирование	[1806, 2176, 2836]
Гидролизует β-1,3-связи между D-глюкуронатом и 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозой в гиалуронате	Пиявки	[1600]
Гидролизует α-1,4-связи между остатками 2-амино-2-дезокси-D-глюкозы и D-глюкуроновой кислоты в гепарине	Печень, почки	[1249, 1250, 1423, 1424]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
3.2.1.20	α-D-глюкозид — глюкогидролаза	α-Глюкозидаза		α-D-глюкозид + H_2O = Спирт + D-глюкоза	Широко распространен Проявляет широкую специфичность в отношении α-D-глюкопиранозидов, варьирующую в зависимости от источника фермента Катализирует также глюкотрансферазные реакции	[182, 1517, 1586, 2274, 2854]
3.2.1.21	β-D-глюкозид — глюкогидролаза	β-Глюкозидаза		β-D-глюкозид + H_2O = Спирт + D-глюкоза	Ткани животных, растения, плесневые грибы, бактерии Проявляет широкую специфичность в отношении β-D-глюкопиранозидов; возможно, действует и на β-D-галактозиды. Катализирует также глюкотрансферазные реакции	[486, 522, 532, 1091, 1517, 1928]
3.2.1.22	α-D-галактозид — галактогидролаза	α-Галактозидаза		α-D-галактозид + H_2O = Спирт + D-галактоза	Растения, дрожжи, бактерии	[1128, 2725]
3.2.1.23 К	β-D-галактозид — галактогидролаза	β-Галактозидаза		β-D-галактозид + H_2O = Спирт + D-галактоза	Растения, плесневые грибы, бактерии Катализирует также галактотрансферазные реакции	[488, 1478, 1508, 2775—2777]
3.2.1.24	α-D-маннозид — маногидролаза	α-Маннозидаза		α-D-маннозид + H_2O = Спирт + D-маноза	Ткани животных, растения, актиномицеты	[487, 1117, 2725]
3.2.1.25	β-D-маннозид — маногидролаза	β-Маннозидаза		β-D-Маннозид + H_2O = Спирт + D-маноза	Дрожжи К числу субстратов фермента относятся маннановые камеди	[16, 599]

3.2.1.1	β-D-*ксилозид — ксилогидролаза*	β-Ксилозидаза, ксилобиаза	
3.2.1.26	β-D-Фруктофуранозид — фруктогидролаза	β-Фруктофуранозидаза (ранее известная как инвертаза, сахараза и т. д.)	
3.2.1.27	Нигероза — 3-глюкогидролаза	α-1,3-глюкозидаза	
3.2.1.28	Трегалоза — 1-глюкогидролаза	Трегалаза	
3.2.1.29	Хитобиоза — ацетамидодезоксиглюкогидролаза	Хитобиаза	
3.2.1.30	β-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозид — ацетамидодезоксиглюкогидролаза	β-Ацетамидоделоксиглюкозидаза	
3.2.1.31	β-D-глюкуронид — глюкуроногидролаза	β-Глюкуронидаза	

β-D-ксилозид + H_2O = Спирт + D-ксилоза	Бактерии Отщепляет последовательно остатки ксилозы от β-1,4-ксилана; гидролизует также ксилобиозу	[1175]
β-D-фруктофуранозид + + H_2O = Спирт + D-фруктоза	Растения, плесневые грибы, дрожжи К числу субстратов принадлежит сахароза Катализирует также фруктотрансферазные реакции	[124, 182, 183, 1061, 1915, 1943]
Нигероза + H_2O = 2D-глюкоза	Слизистая кишечника Действует также на другие α-1,3-D-глюкозиды	[1518]
Трегалоза + H_2O = 2D-глюкоза	Насекомые, плесневые грибы, дрожжи Действует и на замещенные в положении 6 производные трегалозы	[1292, 1917]
Хитобиоза + H_2O = 2(2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкоза)	Беспозвоночные, растения, плесневые грибы	[2962, 2963]
β-Фенил-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозид + + H_2O = Фенол + 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкоза	Ткани животных, растения, плесневые грибы	[732, 2121, 2915, 2962, 2963]
β-D-глюкуронид + H_2O = Спирт + D-глюкуроновая кислота	Ткани животных, растения, бактерии Катализирует также глюкуронотрансферазные реакции	[652, 743, 744, 1564—1566, 1730, 1827, 2434, 2750]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
	3.2.2 Гидролазы N-гликозильных соединений		
3.2.2.1	N-рибозилпурин — рибогидролаза	Нуклеозидаза	
3.2.2.2	Инозин — рибогидролаза	Инозиназа	
3.2.2.3	Уридин — рибогидролаза	Уридиннуклеозидаза	
3.2.2.4	АМФ — фосфорибогидролаза	АМФ-нуклеозидаза	[ФФ, M^{2+}]
3.2.2.5	НАД — гликогидролаза	НАД-нуклеозидаза	
3.2.2.6	НАД(Ф) — гликогидролаза	НАД(Ф)-нуклеозидаза	
	3.2.3 Гидролазы S-гликозильных соединений		
3.2.3.1	*Тиоглюкозид — глюкогидролаза*	Тиоглюкозидаза	
	3.3 Действуют на эфирные связи		
	3.3.1 Гидролазы тиоэфиров		
3.3.1.1	S-аденозил-L-гомоцистеин — гидролаза	Аденозилгомоцистеиназа	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
N-рибозилпурин + H_2O = Пуриновое основание + + D-рибоза	Мышцы рыб, растения, дрожжи, бактерии	[1069, 1288, 1507, 2115, 2231, 2601, 2618]
Инозин + H_2O = Гипоксантин + D-рибоза	Мышцы рыб, бактерии	[1413, 2618]
Уридин + H_2O = Урацил + D-рибоза	Дрожжи	[411]
АМФ + H_2O = Аденин + D-рибозо-5-фосфат	Бактерии	[1197]
НАД + H_2O = Никотинамид + R	Эритроциты; «R-никотинамид» соответствует НАД	[1121]
НАД (Ф) + H_2O = Никотинамид + R (Ф)	Ткани животных, плесневые грибы, бактерии Катализирует также R-трансферазные реакции	[50, 2959, 2960]
Тиогликозид + H_2O = Тиол + + Сахар	Ткани животных, растения Проявляет широкую специфичность в отношении тиогликозидов	[507, 869, 2088]
S-аденозил-L-гомоцистеин + + H_2O = Аденозин + L-гомоцистеин	Печень	[586]

3.4 Действуют на пептидные связи (пептид-гидролазы)

(В этом разделе лишь для немногих ферментов возможны систематические названия)

3.4.1 α-Аминопептид-аминоацидогидролазы

3.4.1.1		Лейцинаминопептидаза	[M^{2+}]	Гидролизует L-пептиды, отщепляя N-концевой остаток со свободной α-аминогруппой, особенно когда N-концевым остатком служит лейцин или сходная аминокислота	Ткани животных, кишечный сок, дрожжи	[1101, 2438, 2444, 2478]
3.4.1.2		Аминопептидаза		Действует на ди- и трипептиды, отщепляя N-концевой остаток	Сперма	[1634]
3.4.1.3		Аминотрипептидаза		Гидролизует пептиды, содержащие нейтральные аминокислотные остатки, отщепляя N-концевой остаток	Ткани животных	[11, 26, 691, 2682]
3.4.1.a		Пролинаминопептидаза		Гидролизует L-пептиды, отщепляя N-концевые остатки L-пролина	Бактерии	[2304]

3.4.2 α-Карбоксипептид-аминоацидогидролазы

3.4.2.1 К		Карбоксипептидаза А	Zn	Гидролизует пептиды с отщеплением С-концевого L-аминокислотного остатка, если таковым не является остаток пролина или диаминокислоты	Образуется из панкреатической прокарбоксипептидазы А	[76, 1956, 1996, 2438, 2710]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
3.4.2.2		Карбоксипептидаза В (ранее известная как протаминаза)	Zn
3.4.2.3		Дрожжевая карбоксипептидаза	

3.4.3 Дипептид-гидролазы

3.4.3.1	Глицилглицин — гидролаза	Глицилглицин-дипептидаза	$[Co^{2+}]$
3.4.3.2	Глицил-L-лейцин — гидролаза	Глицилллейцин-дипептидаза	$[M^{2+}]$
3.4.3.3	Аминоацил-L-гистидин — гидролаза	Аминоацилгистидин-дипептидаза, карнозиназа	$[M^{2+}]$
3.4.3.4	Аминоацил-1-метил-L-гистидин — гидролаза	Аминоацил-метилгистидин-дипептидаза, ансериназа	$[Zn^{2+}]$
3.4.3.5	L-цистеинилглицин — гидролаза	Цистеинилглицин-дипептидаза	$[M^{2+}]$
3.4.3.6		Иминодипептидаза	$[M^{2+}]$

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Гидролизует пептиды с остатком L-аргинина и L-лизина на С-конце, отщепляя этот остаток	Панкреатический сок	[758, 1956]
Гидролизует пептиды с остатком глицина или L-лейцина на С-конце, отщепляя этот остаток	Дрожжи	[722]
Гидролизует глицилглицин и саркозилглицин	Ткани животных, растения	[613, 2436]
Гидролизует глицин-L-лейцин	Ткани животных	[2437]
Гидролизует дипептиды L-гистидина и их амиды	Ткани животных	[999, 2251, 2438]
Ансерин + H_2O = β-Аланин + + 1-метил-L-гистидин	Мышцы рыб	[1267]
Гидролизует L-цистеинилглицин	Ткани животных	[248, 2372]
Гидролизует дипептиды или амиды, содержащие остаток пролина в качестве α-иминоконцевой группы	Ткани животных	[564, 1952, 2438]

3.4.3.7		Имидодипептидаза, пролидаза	$[Mg^{2+}]$

3.4.4 Пептид-пептидогидролазы

3.4.4.1 К		Пепсин	
3.4.4.2		Пепсин В (ранее известный как парапепсин)	
3.4.4.a К		Гастрицин	
3.4.4.3 К		Реннин	
3.4.4.4 К		Трипсин	

Гидролизует дипептиды, в которых остаток пролина связан через иминогруппу	Ткани животных	[12, 14, 565]
Гидролизует пептиды, особенно по связям, прилегающим к остаткам ароматических или дикарбоновых L-аминокислот	Желудочный сок Образуется из пепсиногена	[303, 1083, 1988, 1990, 1991, 1996, 2621]
Гидролизует пептиды; по специфичности сходен с ферментом 3.4.4.1	Желудочный сок Образуется из пепсиногена B	[2282]
Гидролизует пептиды	Желудочный сок человека Оптимальный pH при действии на гемоглобин равен 3, т. е. оптимум pH лежит выше, чем у фермента 3.4.4.1	[2616]
Гидролизует пептиды; по специфичности, возможно, аналогичен ферменту 3.4.4.1	Желудочный сок молодых животных Образуется из прореннина	[235, 236, 741]
Гидролизует пептиды, амиды, сложные эфиры и т. п. по месту связей, в которых участвуют карбоксильные группы L-аргинина и L-лизина	Панкреатический сок Образуется из трипсиногена	[597, 1495, 1994, 1996 2569]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
3.4.4.5 **К**		Химотрипсин	
3.4.4.6 **К**		Химотрипсин B	
3.4.4.7 **К**		Панкреатопептидаза E (ранее известная как эластаза)	
3.4.4.8		Энтеропептидаза (ранее известная как энтерокиназа)	
3.4.4.9		Катепсин C	[S]
3.4.4.b		Катепсин D	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Гидролизует пептиды, амиды, сложные эфиры и т. п., в особенности по месту связей, в которых участвуют карбоксильные группы ароматических L-аминокислот	Панкреатический сок Образуется из химотрипсиногена; при этом возникает ряд химотрипсинов в зависимости от числа связей, расщепленных в молекуле предшественника	[596, 643, 1487, 1494, 1955, 1996]
По специфичности сходен с ферментом 3.4.4.5	Панкреатический сок Образуется из химотрипсиногена B	[342]
Гидролизует пептиды, особенно по связям, прилегающим к остаткам нейтральных аминокислот	Поджелудочная железа	[154, 886, 982, 1579, 1580, 1703, 1930]
Гидролизует пептиды: превращает трипсиноген в трипсин	Кишечный сок	[1489, 1996, 2936]
Гидролизует пептиды, особенно по связям, содержащим ароматическую аминокислоту, смежную со свободной α-аминогруппой	Ткани животных	[794, 2610]
Гидролизует пептиды; специфичность аналогична специфичности фермента 3.4.4.1, но более ограничена	Селезенка	[1516, 2117]

3.4.4.10 К		Папаин	[S]
3.4.4.11 К		Химопапаин	[S]
3.4.4.12 К		Фицин	[S]
3.4.4.c		Бромелаин	[S]
3.4.4.13		Тромбин	$[Ca^{2+}]$
3.4.4.14		Плазмин (ранее известный как фибринолизин)	
3.4.4.15		Ренин	
3.4.4.16 К		Субтилопептидаза А (ранее известная как субтилизин)	

Гидролизует пептиды, амиды и сложные эфиры, особенно по связям, в которых участвуют диаминокислоты, глицин или лейцин	Латекс *Carica papaya*	[147, 1259, 1380, 1381, 2445]
Гидролизует пептиды и т. п.; по специфичности сходен с ферментом 3.4.4.10	Латекс *Carica papaya*	[1240]
Гидролизует пептиды, амиды и сложные эфиры; по специфичности аналогичен ферменту 3.4.4.10	Латекс вида *Ficus*	[2445, 2778]
Гидролизует пептиды, амиды и эфиры; по специфичности близок к ферменту 3.4.4.10	Стебли ананаса	[1901]
Гидролизует пептиды, амиды и сложные эфиры L-аргинина; превращает фибриноген в фибрин	Сыворотка крови Образуется из протромбина	[2386, 2801]
Гидролизует пептиды и эфиры L-аргинина и L-лизина; превращает фибрин в растворимые продукты	Сыворотка крови Образуется из плазминогена	[2, 245, 2206, 2675]
Превращает гипертензиноген в гипертензин	Почки	[963, 964]
Гидролизует пептиды; превращает яичный альбумин в пластинчатый альбумин	*B. subtilis* Гидролизует также некоторые сложные эфиры жирных кислот	[883, 952, 953, 970, 972]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
3.4.4.17 К		Аспергиллопептидаза А		Гидролизует пептиды, особенно по связям, в которых участвуют карбоксильные группы аргинина или лейцина; превращает трипсиноген в трипсин	*Aspergillus saitoi*	[518, 1842]
3.4.4.18 К		Стрептококковая пептидаза А		Гидролизует пептиды и амиды; проявляет широкую специфичность, но не атакует связи, смежные с остатком глицина	*Streptococcus*	[687]
3.4.4.19		Клостридиопептидаза А (ранее известная как коллагеназа)	[M^{2+}]	Гидролизует пептиды, содержащие пролин, в том числе коллаген и желатину	*Clostridium*	[246, 575, 1415, 1703, 2364]
3.4.4.20		Клостридиопептидаза В		Гидролизует пептиды по связям, в которых участвуют остатки аргинина	*Clostridium*	[575, 2015]

Помимо перечисленных выше ферментов, несомненно, существует множество других пептидаз. Многие из них описаны в литературе под такими названиями, как катепсины, асклепаин, пингвинаин, мексиканаин, табермонтанаин, эйфорбаин, соланаин, бактериальная протеиназа, дрожжевая полипептидаза и т. п.

3.5 Действуют на C—N-связи, отличные от пептидных связей

3.5.1 В линейных амидах

3.5.1.1	L-аспарагин—амидогидролаза	Аспарагиназа		L-аспарагин + H_2O = L-аспартат + NH_3	Растения, дрожжи, бактерии	[888, 939, 984]

3.5.1.2	L-глутамин — амидогидролаза	Глутаминаза	[A]
3.5.1.3	ω-Амидодикарбоксилат — амидогидролаза	ω-Амидаза	
3.5.1.4	Ациламид — амидогидролаза	Амидаза	
3.5.1.5 К	Карбамид — амидогидролаза	Уреаза	[Ф]
3.5.1.6	N-Карбамоил-β-аланин — амидогидролаза	β-Уреидопропионаза	
3.5.1.7	N-карбамоил-L-аспартат — амидогидролаза	Уреидосукциназа	[M^{2+}, S]
3.5.1.8	N-формиласпартат — амидогидролаза	Формиласпартат-деформилаза	[Fe^{2+}]
3.5.1.9	Арилформиламин — амидогидролаза	Формамидаза	
3.5.1.a	*Арилациламин — амидогидролаза*	Арилациламидаза	
3.5.1.10	10-формилтетрагидрофолат — амидогидролаза	Формилтетрагидрофолат-деформилаза	

L-глутамин + H_2O = L-глутамат + NH_3	Ткани животных, *Protozoa*, бактерии	[85, 1186, 1399, 2036]
ω-Амидодикарбоновая кислота + H_2O = Дикарбоновая кислота + NH_3	Ткани животных Действует на глутарамат, сукцинамат и соответствующие α-кето-ω-амидодикарбоновые кислоты	[1786]
Амид монокарбоновой кислоты + H_2O = Монокарбоновая кислота + NH_3	Ткани животных	[318, 319]
Мочевина + H_2O = CO_2 + $2NH_3$	Растения, плесневые грибы, бактерии	[2565]
N-карбамоил-β-аланин + + H_2O = β-Аланин + CO_2 + + NH_3	Печень, бактерии Фермент из тканей животных действует также на β-уреидоизобутират	[388, 402, 934]
N-карбамоил-L-аспартат + + H_2O = L-аспартат + CO_2 + + NH_3	Бактерии	[1588]
N-формил-L-аспартат + H_2O = Формиат + L-аспартат	Бактерии	[2018]
N-формил-L-кинуренин + + H_2O = Формиат + L-кинуренин	Печень, плесневые грибы, бактерии Действует и на другие ароматические формиламины	[1041, 1232, 1778]
N-ациланилид + H_2O = Жирная кислота + Анилин	Почки цыплят Действует также на *n*-замещенные ациланилиды	[1969]
10-формилтетрагидрофолат + + H_2O = Формиат + Тетрагидрофолат	Печень	[1181]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
3.5.1.11	Бензилпенициллин—амидогидролаза	Пенициллин-амидаза	
3.5.1.12	*п*-Биотиниламинобензоат — амидогидролаза	Биотинидаза	$[M^{2+}]$
3.5.1.b	*Амидогидролаза N-ациламинокислот*	Аминоацилаза I (ранее известная как дегидропептидаза II или гиппуриказа)	
3.5.1.c	*N-ациласпартат — амидогидролаза*	Аспартоацилаза (ранее известная как аминоацилаза II)	
3.5.1.d	*α-N-ацетил-L-орнитин — амидогидролаза*	Ацетилорнитин-деацетилаза	$[Co^{2+}]$
3.5.1.e	*ε-N-ацил-L-лизин — амидогидролаза*	Ацил-лизин-деацилаза	
3.5.1.f	*N-сукцинил-L-2,6-диаминопимелат — амидогидролаза*	Сукцинилдиаминопимелат-десукцинилаза	
	3.5.2 В циклических амидах		
3.5.2.1	Барбитурат—амидогидролаза	Барбитураза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Бензилпенициллин + H_2O = Фенилацетат + Пеницин	Плесневые грибы	[2290]
n-Биотиниламинобензоат + + H_2O = Биотин + *n*-Аминобензоат	Ткани животных Действует также на другие биотиниды	[2642]
N-ациламинокислота + H_2O = Жирная кислота + Аминокислота	Ткани животных, грибы, бактерии Широкая специфичность; гидролизует также дегидропептиды	[250, 251, 759, 918, 2054]
N-ациласпартат + H_2O = Жирная кислота + Аспартат	Почки	[250, 251]
α-N-ацетил-L-орнитин + + H_2O = Уксусная кислота + L-орнитин	Бактерии Гидролизует также N-ацетилметионин	[2739, 2741]
ε-N-ацил-L-лизин + H_2O = Жирная кислота + L-лизин	Ткани животных	[2042]
N-сукцинил-L-2,6-диаминопимелат + H_2O = Сукцинат + + L-2,6-диаминопимелат	Бактерии	[1382]
Барбитурат + $2H_2O$ = Малонат + Мочевина	Бактерии	[1035]

3.5.2.2	4,5-дигидропиримидин—амидогидролаза	Дигидропиримидиназа (ранее известная как гидантоиназа)	$[M^{2+}]$
3.5.2.3	L-4,5-дигидрооротат — амидогидролаза	Дигидрооротаза	
3.5.2.4	L-5-карбоксиметилгидантоин — амидогидролаза	Карбоксиметилгидантоиназа	
3.5.2.5	Аллантоин — амидогидролаза	Аллантоиназа	
3.5.2.6 К	Пенициллин — амидогидролаза	Пенициллиназа	
3.5.2.a	*4-имидазолон-5-пропионат — амидогидролаза*	Имидазолонпропионаза	

3.5.3 В линейных амидинах

3.5.3.1 К	L-аргинин — уреогидролаза	Аргиназа	$[M^{2+}]$
3.5.3.2	Гуанидинацетат — уреогидролаза	Гликоциаминаза	$[Mn^{2+}]$
3.5.3.3	Креатинин — уреогидролаза	Креатининаза	
3.5.3.4	Аллантоат — уреогидролаза	Аллантоиказа	
3.5.3.5	N-формимино-L-аспартат — иминогидролаза	Формиминоаспартат-дезиминаза	

4,5-дигидроурацил + H_2O = 3-уреидопропионат	Ткани животных, растения Действует также на гиданто-ин и дигидротимин	[664, 934, 935, 2773]
L-4,5-дигидрооротат + H_2O = N-карбамоил-L-аспартат	Печень, бактерии	[499, 1587]
L-5-карбоксиметилгиданто-ин + H_2O = N-карбамоил-L-аспартат	Бактерии	[1587]
Аллантоин + H_2O = Аллан-тоиновая кислота	Амфибии, некоторые беспоз-воночные, растения, дрож-жи	[346, 754]
Пенициллин + H_2O = Пени-циллоевая кислота	Бактерии	[2102]
4-имидазолон-5-пропионат + + H_2O = N-формимино-L-глутамат	Ткани животных, бактерии	[2168, 2465]
L-аргинин + H_2O = L-орни-тин + Мочевина	Ткани животных, растения Гидролизует также α-N-за-мещенные производные L-аргинина и канаванин	[120, 121, 377, 911, 912]
Гуанидинацетат + H_2O = Гли-цин + Мочевина	Бактерии	[2237]
Креатин + H_2O = Саркозин + + Мочевина	Бактерии	[2237]
Аллантоат + H_2O = Глиокси-лат + 2Мочевина	Амфибии и некоторые бес-позвоночные	[754]
N-формимино-L-аспартат + + H_2O = N-формил-L-аспар-тат + NH_3	Бактерии	[693]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
3.5.3.6	L-аргинин — иминогидролаза	Аргининдезиминаза	
	3.5.4 В циклических амидинах		
3.5.4.1	Цитозин — аминогидролаза	Цитозиндезаминаза	
3.5.4.2	Аденин — аминогидролаза	Адениндезаминаза (ранее известная как аденаза)	
3.5.4.3	Гуанин — аминогидролаза	Гуаниндезаминаза (ранее известная как гуаназа)	
3.5.4.a	*Птерин — аминогидролаза*	Птериндезаминаза	
3.5.4.4	Аденозин — аминогидролаза	Аденозиндезаминаза	
3.5.4.5	Цитидин — аминогидролаза	Цитидиндезаминаза	
3.5.4.6 К	АМФ — аминогидролаза	АМФ-дезаминаза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
L-аргинин + H_2O = L-цитруллин + NH_3	Ткани животных, дрожжи, бактерии Действует также на канаванин	[2014, 2081, 2177, 2236]
Цитозин + H_2O = Урацил + NH_3	Ткани животных, дрожжи, бактерии Действует также на 5-метилцитозин	[436, 467, 1035, 1458]
Аденин + H_2O = Гипоксантин + NH_3	Ткани животных, бактерии	[273, 1071]
Гуанин + H_2O = Ксантин + NH_3	Ткани животных, адаптированные дрожжи, бактерии Действует также на 1-метилгуанин	[1112, 1286, 2139]
Птерин + H_2O = Люмазин + NH_3	Бактерии	[1557]
Аденозин + H_2O = Инозин + NH_3	Ткани животных, плесневые грибы, бактерии	[1285, 1286, 1305, 2115]
Цитидин + H_2O = Уридин + NH_3	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии	[493, 2231, 2335, 2780]
АМФ + H_2O = ИМФ + NH_3	Ткани животных, растения	[1285, 1286, 1530, 1797, 1968, 2689, 2823]

3.5.4.b	*Дезокси-ЦМФ — аминогидролаза*	Дезокси-ЦМФ-дезаминаза	
3.5.4.7	АДФ — аминогидролаза	АДФ-дезаминаза	
3.5.4.8	4-аминоимидазол — аминогидролаза	Аминоимидазолаза	
3.5.4.9	5,10-метенилтетрагидрофолат — 5-гидролаза (дециклизующая)	Метенилтетрагидрофолат-циклогидролаза	
3.5.4.10	ИМФ — 1,2-гидролаза (дециклизующая)	ИМФ-циклогидролаза	

3.5.99 В других соединениях

3.5.99.1	Рибофлавин — гидролаза	Рибофлавиназа	
3.5.99.2 К	Тиамин — гидролаза	Тиаминаза II	

3.6 Действуют на кислотноангидридные связи

3.6.1 В фосфорилсодержащих ангидридах

3.6.1.1 К	Пирофосфат — фосфогидролаза	Неорганическая пирофосфатаза	$[Mg^{2+}]$
3.6.1.2	Триметафосфат — фосфогидролаза	Триметафосфатаза	$[M^{2+}]$

Дезокси-ЦМФ + H_2O = Дезокси-УМФ + NH_3	Яйца морского ежа Действует также на некоторые 5-замещенные производные дезокси-ЦМФ	[2317, 2318]
АДФ + H_2O = ИДФ + NH_3	Мышцы	[601]
4-аминоимидазол + H_2O = Неидентифицированный продукт + NH_3	Бактерии	[2142]
5,10-метенилтетрагидрофолат + H_2O = 10-формилтетрагидрофолат	Печень, бактерии	[2140, 2596]
ИМФ + H_2O = 5′-фосфорибозил-5-формамидо-4-имидазолкарбоксамид	Печень	[748]
Рибофлавин + H_2O = Рибитол + Люмихром	Бактерии	[2940]
Тиамин + H_2O = 2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидин + 4-метил-5-(2′-оксиметил)-тиазол	Бактерии	[799, 1206]
Пирофосфат + H_2O = 2 Ортофосфат	Широко распространены	[137, 1068, 1491, 1919, 2160]
Триметафосфат + H_2O = Трифосфат	Ткани животных, дрожжи	[1444, 1811]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
3.6.1.a	*Пирофосфат — фосфогидролаза*	Пирофосфатаза	
3.6.1.3	АТФ — фосфогидролаза	АТФ-аза(миозин)	$[Ca^{2+}]$
3.6.1.4	АТФ — фосфогидролаза	АТФ-аза	$[Mg^{2+}]$
3.6.1.5	АТФ — дифосфогидролаза	Апираза	$[Ca^{2+}]$
3.6.1.6	Нуклеозиддифосфат — фосфогидролаза	Нуклеозиддифосфатаза	$[Mg^{2+}]$
3.6.1.7	Ацилфосфат — фосфогидролаза	Ацилфосфатаза	
3.6.1.8	АТФ — пирофосфогидролаза	АТФ-аза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Пирофосфат + H_2O = 2 Ортофосфат	Растения Слабо выраженная специфичность; гидролизует АТФ, АДФ и неорганический пирофосфат примерно с одинаковой скоростью	[763, 1960]
АТФ + H_2O = АДФ + Ортофосфат	Мышцы Действует также на ИТФ, ЦТФ, ГТФ, УТФ и трифосфат	[787, 931, 1374, 1376, 1932, 2074]
АТФ + H_2O = АДФ + Ортофосфат	Ткани животных Действует также на ИТФ и, возможно, на АДФ	[379, 857, 1377, 2072]
АТФ + H_2O = АДФ + Ортофосфат	Растения Гидролизует также АДФ	[1283, 1467]
Нуклеозиддифосфат + H_2O = Нуклеотид + Ортофосфат	Печень, почки Действует на ИДФ, ГДФ, УДФ, а также на D-рибозо-5-пирофосфат	[827, 1160, 2095]
Ацилфосфат + H_2O = Кислота + Ортофосфат	Широко распространен	[1603, 2161]
АТФ + H_2O = АМФ + Пирофосфат	Ткани животных Действует также на ИТФ	[1070, 1258]

3.6.1.b	*Дезокси-ЦТФ — нуклеотидогидролаза*	Дезокси-ЦТФ-аза	
3.6.1.9	Динуклеотид — нуклеотидогидролаза	Нуклеотид-пирофосфатаза	
3.6.1.10	Полифосфат — полифосфогидролаза	Полифосфатаза	

3.7 Действуют на С—С-связи

3.7.1 В кетосоединениях

3.7.1.1	Оксалоацетат — ацетилгидролаза	Оксалоацетаза	$[Mn^{2+}]$
3.7.1.2	4-фумарилацетоацетат — фумарилгидролаза	Фумарилацетоацетаза (ранее известная как β-дикетоназа)	

3.8 Действуют на галоидные связи

3.8.1 В С—галоидных соединениях

3.8.1.1	Галоидалкил — галоидгидролаза	Алкилгалоидаза	[S]

3.8.2 В Р—галоидных соединениях

3.8.2.1	Диизопропилфторфосфат — фторгидролаза	ДФФ-аза	$[M^{2+}]$

Дезокси-ЦТФ + H_2O = Дезокси-ЦМФ + Пирофосфат	Бактерии, инфицированные фагом Гидролизует также дезокси-ЦДФ до дезокси-ЦМФ и ортофосфата	[2970]
Динуклеотид + H_2O = 2 Мононуклеотид	Ткани животных, змеиный яд, растения К числу субстратов относятся НАД, ФАД, КоА, а также АТФ и АДФ	[2984, 1434, 1999, 2580]
Полифосфат + nH_2O = n Пентафосфат	Плесневые грибы, дрожжи	[1695]
Оксалоацетат + H_2O = Оксалат + ацетат	Плесневые грибы	[1040]
4-фумарилацетоацетат + + H_2O = Ацетоацетат + + Фумарат	Печень Действует и на другие 3,5- и 2,4-дикетокислоты	[491, 674, 1785, 2183]
$CH_2BrCl + H_2O$ = HCHO + + HBr + HCl	Печень	[1073]
Диизопропилфторфосфат + + H_2O = Диизопропилфосфат + HF	Ткани животных, бактерии Действует также на другие фосфорорганические соединения и «нервные газы»	[99, 462, 1883—1886]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
	3.9 Действуют на P — N-связи		
3.9.1.1	Фосфоамид — гидролаза	Фосфоамидаза	
	4. ЛИАЗЫ		
	4.1 Углерод — углерод-лиазы		
	4.1.1 Карбокси-лиазы		
4.1.1.1	Карбокси-лиаза 2-оксокислот	Пируватдекарбоксилаза (ранее известная как α-карбокиназа)	[T, M^{2+}]
4.1.1.2	Оксалат — карбокси-лиаза	Оксалатдекарбоксилаза	
4.1.1.3 К	Оксалоацетат — карбокси-лиаза	Оксалоацетатдекарбоксилаза	[M^{2+}]
4.1.1.4	Ацетоацетат — карбокси-лиаза	Ацетоацетатдекарбоксилаза	
4.1.1.5	2-ацетолактат — карбокси-лиаза	Ацетолактатдекарбоксилаза	[Mn^{2+}]
4.1.1.6	*цис*-Аконитат — карбокси-лиаза	Аконитатдекарбоксилаза	
4.1.1.a	*3-оксо-L-гулонат — карбокси-лиаза*	Оксо-L-гулонат — декарбоксилаза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Фосфокреатин + H_2O = Креатин + Ортофосфат	Ткани животных, змеиный яд, растения Действует также на фосфоаргинин и другие фосфоамиды	[322, 2408, 2568, 2759]
2-оксокислота = Альдегид + + CO_2	Растения, дрожжи, бактерии Катализирует также образование ацилоина	[902, 1147, 2416, 2417]
Оксалат = Формиат + CO_2	Грибы	[2389, 2390]
Оксалоацетат = Пируват + + CO_2	Ткани животных, бактерии	[506, 1075]
Ацетоацетат = Ацетон + CO_2	*Clostridium*	[560]
(+)-2-ацетолактат = (−)-Ацетоин + CO_2	Бактерии	[1278, 2798]
цис-Аконитат = Итаконат + + CO_2	Плесневые грибы	[208]
3-оксо-L-гулонат = L-ксилулоза + CO_2	Ткани животных	[2888]

4.1.1.7	Бензоилформиат — карбокси-лиаза	Бензоилформиатдекарбоксилаза	[Т]
4.1.1.8	Оксалил-КоА — карбокси-лиаза	Оксалил-КоА — декарбоксилаза	[Т]
4.1.1.9	Малонил-КоА — карбокси-лиаза	Малонил-КоА — декарбоксилаза	
4.1.1.10	Аминомалонат — карбокси-лиаза	Аминомалонатдекарбоксилаза	
4.1.1.11	L-аспартат — 1-карбокси-лиаза	Аспартат — 1-декарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.12	L-аспартат — 4-карбокси-лиаза	Аспартат — 4-декарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.13	N-карбамоил-L-аспартат — 1-карбокси-лиаза	Карбамоиласпартатдекарбоксилаза	
4.1.1.14	L-валин — карбокси-лиаза	Валиндекарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.15	L-глутамат — 1-карбокси-лиаза	Глутаматдекарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.16	3-окси-L-глутамат — 1-карбокси-лиаза	Оксиглутаматдекарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.17	L-орнитин — карбокси-лиаза	Орнитиндекарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.18	L-лизин-карбокси-лиаза	Лизиндекарбоксилаза	[ПФ]

Бензоилформиат = Бензальдегид + CO_2	Бактерии	[951]
Оксалил-КоА = Формил-КоА + CO_2	Бактерии	[1238, 2135]
Малонил-КоА = Ацетил-КоА + CO_2	Ткани животных, бактерии	[1032]
Аминомалонат = Глицин + + CO_2	Ткани животных	[2392]
L-аспартат = β-Аланин + CO_2	Бактерии	[547, 806]
L-аспартат = L-аланин + CO_2	Бактерии	[244, 1789]
N-карбамоил-L-аспартат = = Карбамоил-β-аланин + + CO_2	Бактерии	[934]
L-валин = Изобутиламин + + CO_2	Бактерии Действует также на L-лейцин	[2987]
L-глутамат = 4-аминобутират + CO_2	Мозг, растения, дрожжи, бактерии Фермент из мозга млекопитающих действует также на L-цистеинат и L-цистеинсульфинат	[566, 765, 806, 1468, 2324, 2394, 2619]
3-окси-L-глутамат = 3-окси-4-аминобутират + CO_2	Бактерии	[2697]
L-орнитин = Путресцин + CO_2	Бактерии	[806, 2619]
L-лизин = Кадаверин + CO_2	Бактерии Действует и на 5-окси-L-лизин	[806, 810, 1595, 2384]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
4.1.1.19	L-аргинин — карбокси-лиаза	Аргининдекарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.20	*мезо*-2,6-диаминопимелат — карбоксилиаза	Диаминопимелатдекарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.21	5′-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксилат — карбокси-лиаза	Фосфорибозиламиноимидазол-карбоксилаза	
4.1.1.22	L-гистидин — карбокси-лиаза	Гистидиндекарбоксилаза	[ПФ, M^{2+}]
4.1.1.23	Оротидин-5′-фосфат — карбоксилиаза	Оротидин-5′-фосфат — декарбоксилаза	
4.1.1.24	Аминобензоат — карбокси-лиаза	Аминобензоатдекарбоксилаза	[ПФ, M^{2+}]
4.1.1.25	L-тирозин — карбокси-лиаза	Тирозиндекарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.26	3,4-диокси-L-фенилаланин — карбокси-лиаза	ДОПА-декарбоксилаза	[ПФ]

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
L-аргинин = Агматин + CO_2	Бактерии	[806, 2385, 2619]
мезо-2,6-диаминопимелат = L-лизин + CO_2	Бактерии	[602]
5′-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксилат = 5′-фосфорибозил-5-аминоимидазол + CO_2	Печень	[1629]
L-гистидин = Гистамин + CO_2	Ткани животных, бактерии	[703, 806, 1144, 1146, 2832, 2842]
Оротидин-5′-фосфат = УМФ + + CO_2	Печень, дрожжи	[517]
п (или *о*)-Аминобензоат = Анилин + CO_2	Бактерии	[1653]
L-тирозин = Тирамин + CO_2	Ткани животных, бактерии Бактериальный фермент действует также на 3-окситирозин и (медленнее) на 3-оксифенилаланин	[806, 1145, 2431]
3,4-диокси-L-фенилаланин = Диоксифенилэтиламин + + CO_2	Ткани животных Действует также на 2-(или 3)-оксифенилаланин и на 3-оксифенилсерин	[268, 2980, 1018, 1145, 2325, 2477]

4.1.1.27	L-триптофан — карбокси-лиаза	Триптофандекарбоксилаза	
4.1.1.28	5-окси-L-триптофан — карбокси-лиаза	Окситриптофандекарбоксилаза	[ПФ]
4.1.1.b	*УДФ-глюкуронат — карбокси-лиаза*	УДФ-глюкуронатдекарбоксилаза	
4.1.1.29	L-Цистеинсульфинат — карбокси-лиаза	Цистеинсульфинатдекарбоксилаза	[ПФ, S]
4.1.1.30	N-(L-пантотеноил)-L-цистеин — карбокси-лиаза	Пантотеноилцистеин-декарбоксилаза	
4.1.1.c	*4′-фосфо-N-(L-пантотеноил)-L-цистеин — карбокси-лиаза*	Фосфопантотеноилцистеин-декарбоксилаза	
4.1.1.d	*Уропорфириноген-III — карбокси-лиаза*	Уропорфириногендекарбоксилаза	
4.1.1.31	Ортофосфат:оксалоацетат — карбокси-лиаза (фосфорилирующая)	Фосфопируваткарбоксилаза	[Mg^{2+}, S]
4.1.1.e	*Пирофосфат:оксалоацетат — карбокси-лиаза (фосфорилирующая)*	Фосфопируваткарбоксилаза	
4.1.1.32	ГТФ:оксалоацетат — карбокси-лиаза (трансфосфорилирующая)	Фосфопируваткарбоксилаза	[Mn^{2+}]

L-триптофан = Триптамин + $+CO_2$	Ткани животных	[2844]
5-окси-L-триптофан = 5-окси-триптамин + CO_2	Ткани животных	[374, 2692]
УДФ-глюкуронат = УДФ-ксилоза + CO_2	Растения	[721]
L-цистеинсульфинат = Гипотаурин + CO_2	Печень, почки	[219, 267, 440, 566, 1151, 2475]
N-(L-пантотеноил)-L-цистеин = Пантетеин + CO_2	Печень, бактерии	[338, 339]
4′-фосфо-N-(L-пантотеноил)-L-цистеин = Пантетеин-4′-фосфат + CO_2	Бактерии	[2976]
Уропорфириноген-III = Копропорфириноген + $+4CO_2$	Ткани животных	[1771]
Ортофосфат + Оксалоацетат = H_2O + Фосфоенолпируват + $+CO_2$	Растения	[151, 2624]
Пирофосфат + Оксалоацетат = Ортофосфат + Фосфоенолпируват + CO_2	Бактерии	[2420]
ГТФ + Оксалоацетат = ГДФ + $+$ Фосфоенолпируват + CO_2	Печень, почки Донором фосфата может служить ИТФ	[152, 891, 1497, 2532 2702]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
4.1.1.33	АТФ:5-пирофосфомевалонат — карбокси-лиаза (дегидратирующая)	Пирофосфомевалонат-декарбоксилаза	[Mg^{2+}]
4.1.1.f	*3-фосфо-D-глицерат — карбоксилиаза (димеризующая)*	Рибулозодифосфат-карбоксилаза	[M^{2+}]
	4.1.2 Альдегид-лиазы		
4.1.2.1	2-оксо-4-оксибутират — формальдегид-лиаза	Оксооксибутират-альдолаза	[M^{2+}]
4.1.2.a	*2-оксопантоат — формальдегид-лиаза*	Кетопантоальдолаза	[M^{2+}]
4.1.2.2	Эритрулозо-1-фосфат — формальдегид-лиаза	Кетотетрозоальдолаза	
4.1.2.3	Рибозо-5-фосфат — формальдегид-лиаза	Пентозоальдолаза	
4.1.2.4	2-дезокси-D-рибозо-5-фосфат — ацетальдегид-лиаза	Дезоксирибоальдолаза	
4.1.2.5	L-треонин — ацетальдегид-лиаза	Треонинальдолаза	[ПФ]
4.1.2.6	L-аллотреонин — ацетальдегид-лиаза	Аллотреонинальдолаза	[ПФ]

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
АТФ + 5-пирофосфомевалонат = АДФ + Ортофосфат + + Изопентенилпирофосфат + CO_2	Ткани животных, дрожжи	[274, 1064]
2 (3-фосфо-D-глицерат) = D-рибулозо-1,5-дифосфат + + CO_2	Растения	[384, 1235, 1770, 2831]
2-оксо-4-оксибутират = Пируват + Формальдегид	Печень Действует также на фенилпируват	[1095]
2-оксопантоат = 2-оксоизовалерат + Формальдегид	Бактерии	[1663]
Эритрулозо-1-фосфат = Диоксиацетонфосфат + Формальдегид	Печень	[433]
Рибозо-5-фосфат = Эритрулозо-1-фосфат + Формальдегид	Ткани животных	[434]
2-дезокси-D-рибозо-5-фосфат = D-глицеральдегид-3-фосфат + Ацетальдегид	Бактерии	[2120, 2151]
L-треонин = Глицин + Ацетальдегид	Печень, почки	[312, 1309, 1594]
L-аллотреонин = Глицин + + Ацетальдегид	Печень	[312, 1309, 1594]

4.1.2.7 К	Кетозо-1-фосфат — альдегид-лиаза	Альдолаза	
4.1.2.b К	*Фруктозо-1,6-дифосфат — D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза*	Фруктозодифосфатальдолаза	
4.1.2.8	Индол-3-глицерофосфат — D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза	Индолглицерофосфат-альдолаза	
4.1.2.c	*6-фосфо-2-оксо-3-дезокси-D-глюконат — D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза*	Альдолаза	
4.1.2.9	D-ксилулозо-5-фосфат — D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза (ацетилирующая фосфат)	Фосфокетолаза	[T, S]
4,1.2.d	*7-фосфо-2-оксо-3-дезокси — D-арабиногептонат — D-аритрозо-4-фосфат-лиаза (фосфорилирующая пируват)*	Фосфо-2-оксо-3-дезоксигептонат-альдолаза	
4.1.2.e	*8-фосфо-2-оксо-3-дезокси-D-октонат — D-арабинозо-5-фосфат-лиаза (фосфорилирующая пируват)*	Фосфо-2-оксо-3-дезоксиоктонат-альдолаза	

Кетозо-1-фосфат = Диоксиацетонфосфат + Альдегид	Печень Широкая специфичность	[2063, 2280]
Фруктозо-1,6-дифосфат = Диоксиацетонфосфат + D-глицеральдегид-3-фосфат	Мышцы, плесневые грибы, дрожжи	[1231, 2215, 2248, 2280, 2620, 2789]
Индол-3-глицерофосфат = Индол + D-глицеральдегид-3-фосфат	Бактерии	[2944]
6-фосфо-2-оксо-3-дезокси-D-глюконат = Пируват + D-глицеральдегид-3-фосфат	Грамотрицательные бактерии	[1455]
D-ксилулозо-5-фосфат + Ортофосфат = Ацетилфосфат + + D-глицеральдегид-3-фосфат + H_2O	*Lactobacillus*	[1047]
7-фосфо-2-оксо-3-дезокси-D-*арабино*-гептонат + Ортофосфат = Фосфоенолпируват + D-эритрозо-4-фосфат + + H_2O	Бактерии	[1559, 2495]
8-фосфо-2-оксо-3-дезокси-D-октонат + Ортофосфат = Фосфоенолпируват + D-арабинозо-5-фосфат + H_2O	Бактерии	[1559]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
4.1.2.10	Манделонитрил — бензальдегид-лиаза	Оксинитрил-лиаза	Фл
4.1.2.f	*п-Оксиманделонитрил — оксибензальдегид-лиаза*	Оксинитрил-лиаза	
	4.1.3 Лиазы кетокислот		
4.1.3.1	L_s-изоцитрат — глиоксилат-лиаза	Изоцитрат-лиаза	[Mg^{2+}, S]
4.1.3.2	L-малат — глиоксилат-лиаза (ацетилирующая КоА)	Малат-синтала (ранее известная как глиоксилаттрансацетаза)	
4.1.3.3	N-ацетилнейраминат — пируват-лиаза	N-ацетилнейраминат-лиаза	
4.1.3.4	3-окси-3-метилглутарил-КоА — ацетоацетат-лиаза	Оксиметилглутарил-КоА — лиаза	[Mg^{2+}, S]
4.1.3.5	3-окси-3-метилглутарил-КоА — ацетоацетил-КоА-лиаза (ацетилирующая КоА)	Оксиметилглутарил-КоА—синтаза	
4.1.3.6	Цитрат — оксалоацетат-лиаза	Цитрат-лиаза	[Mg^{2+}]

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Нитрил миндальной кислоты = Бензальдегид + HCN	Миндаль	[1466, 1664]
Нитрил *п*-оксиминдальной кислоты = *п*-Оксибензальдегид + HCN	Сорго	[302]
L_s-изоцитрат = Сукцинат + + Глиоксилат	Растения, плесневые грибы, дрожжи, бактерии	[410, 1441, 2022, 2314, 2454]
L-малат + КоА = Ацетил-КоА + H_2O + Глиоксилат	Растения, дрожжи, бактерии	[2904, 2933]
N-ацетилнейраминат = 2-ацетамидо-2-дезокси-D-манноза + Пируват	Бактерии Действует также на N-гликолилнейраминат	[485]
3-окси-3-метилглутарил-КоА = Ацетил-КоА + Ацетоацетат	Ткани животных	[123, 355]
3-окси-3-метилглутарил-КоА + КоА = Ацетил-КоА + H_2O + Ацетоацетил-КоА	Ткани животных, дрожжи	[355, 723, 2276]
Цитрат = Ацетат + Оксалоацетат	Бактерии	[530 2849]

4.1.3.7 К	Цитрат — оксалоацетат-лиаза (ацетилирующая КоА)	Цитрат-синтаза (ранее известная как «цитрат-конденсирующий фермент» и оксалоацетат-трансацетаза)	
4.1.3.a	*АТФ:цитрат — оксалоацетат-лиаза (ацетилирующая КоА и дефосфорилирующая АТФ)*	АТФ-цитрат-лиаза	[Mg^{2+}]

4.2 Углерод — кислород-лиазы

4.2.1 Гидро-лиазы

4.2.1.1 К	Карбонат — гидро-лиаза	Карбонат-дегидратаза, карбоангидраза	Zn
4.2.1.2 К	L-малат — гидро-лиаза	Фумаратгидратаза (ранее известная как фумараза)	
4.2.1.3	Цитрат (изоцитрат) — гидро-лиаза	Аконитатгидратаза (ранее известная как аконитаза)	[Fe^{2+}, S]
4.2.1.4	Цитрат — гидро-лиаза	Цитрат-дегидратаза	
4.2.1.5	D-арабонат — гидро-лиаза	Арабонат-дегидратаза	
4.2.1.a	*L-арабонат — гидро-лиаза*	L-арабонат-дегидратаза	
4.2.1.6	D-галактонат — гидро-лиаза	Галактонат-дегидратаза	

Цитрат + КоА = Ацетил-КоА + H_2O + Оксалоацетат	Широко распространен	[2012, 2490, 2525]
АТФ + Цитрат + КоА = АДФ + Ортофосфат + Ацетил-КоА + Оксалоацетат	Широко распространен	[2487, 2488]
$H_2CO_3 = CO_2 + H_2O$	Ткани животных, растения	[626, 2005, 2259, 2355]
L-малат = Фумарат + H_2O	Широко распространен	[35, 1743]
Цитрат = *цис*-Аконитат + H_2O	Широко распространен Превращает также изоцитрат в *цис*-аконитат	[609, 1867]
Цитрат = *цис*-Аконитат + H_2O	*Aspergillus* Не действует на изоцитрат	[1936]
D-арабонат = 2-оксо-3-дезокси-D-арабонат + H_2O	Бактерии	[2049]
L-арабонат = 2-оксо-3-дезокси-L-арабонат + H_2O	Бактерии	[2824]
D-галактонат = 2-оксо-3-дезокси-D-галактонат + H_2O	Бактерии	[588]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
4.2.1.7	D-альтронат — гидро-лиаза	Альтронат-дегидратаза	[Fe^{2+}]	D-альтронат = 2-оксо-3-дезокси-D-глюконат + H_2O	Бактерии	[2432]
4.2.1.8	D-маннонат — гидро-лиаза	Маннонат-дегидратаза		D-маннонат = 2-оксо-3-дезокси-D-глюконат + H_2O	Бактерии	[2432]
4.2.1.9	Гидро-лиаза 2,3-диоксикислот	Дегидратаза диоксикислот	[M^{2+}, S]	2,3-диоксиизовалерат = 2-оксоизовалерат + H_2O	Плесневые грибы, дрожжи	[1910, 2891]
4.2.1.10	5-дегидрохинат — гидро-лиаза	5-дегидрохинат-дегидратаза		5-дегидрохинат = 5-дегидрошикимат + H_2O	Растения, бактерии	[145, 1839]
4.2.1.11 К	2-фосфо-D-глицерат — гидро-лиаза	Фосфопируват-гидратаза (ранее известная как енолаза)	[M^{2+}]	2-фосфо-D-глицерат = Фосфоенолпируват + H_2O	Широко распространен	[529, 718, 1137, 1697, 2788]
4.2.1.12	6-фосфо-D-глюконат — гидро-лиаза	Фосфоглюконат-дегидратаза	[M^{2+}]	6-фосфо-D-глюконат = 2-оксо-3-дезокси-6-фосфо-D-глюконат + H_2O	Бактерии	[1454, 1660, 2049]
4.2.1.13	L-серин — гидро-лиаза (дезаминирующая)	L-сериндегидратаза (ранее известная как сериндезаминаза или цистатионинсинтетаза)	[ПФ, M^{+}]	L-серин + H_2O = Пируват + + NH_3 + H_2O	Печень, дрожжи, бактерии Образует также цистатионин из L-серина и L-гомоцистеина	[2368, 2911, 2945]
4.2.1.14	D-серин — гидро-лиаза (дезаминирующая)	D-сериндегидратаза	[ПФ]	D-серин + H_2O = Пируват + + NH_3 + H_2O	Плесени, бактерии Действует также (медленно) на D-треонин	[1803, 2943]
4.2.1.15 К	L-гомосерин — гидро-лиаза (дезаминирующая)	Гомосериндегидратаза (ранее известная как цистатионаза)	[ПФ]	L-гомосерин + H_2O = 2-оксобутират + NH_3 + H_2O	Печень Превращает также цистатионин в 2-оксобутират, NH_3 и цистеин	[312, 314, 1757, 1758]

4.2.1.16	L-треонин — гидро-лиаза (дезаминирующая)	Треониндегидратаза	[ПФ]
4.2.1.b	*2-амино-2-дезокси-D-глюконат — гидролиаза (дезаминирующая)*	Аминодезоксиглюконат-дегидратаза	[ПФ]
4.2.1.17 К	L-3-оксиацил-КоА — гидро-лиаза	Еноил-КоА — гидратаза (ранее известная как кротоназа)	
4.2.1.18	3-окси-3-метилглутарил-КоА — гидро-лиаза	Метилглутаконил-КоА — гидратаза	
4.2.1.19	D-*эритро*-имидазолглицерофосфат — гидро-лиаза	Имидазолглицерофосфат-дегидратаза	[Mn^{2+}, S]
4.2.1.20	L-серин — гидро-лиаза (присоединяющая индол)	Триптофан-синтаза	[ПФ]
4.2.1.22	L-серин — гидро-лиаза (присоединяющая сероводород)	Цистеин-синтаза	[ПФ]
4.2.1.23	L-серин — гидро-лиаза (присоединяющая метантиол)	Метилцистеин-синтаза	[ПФ]
4.2.1.24	5-аминолевулинат — гидро-лиаза (присоединяющая 5-аминолевулинат и циклизующая)	Порфобилиноген-синтаза, аминолевулинатдегидратаза	[S]

L-треонин + H_2O = 2-оксобутират + NH_3 + H_2O	Печень, бактерии	[1972, 2052, 2278]
2-амино-2-дезокси-D-глюконат + H_2O = 2-оксо-3-дезокси-D-глюконат + NH_3 + H_2O	Бактерии	[1799]
L-3-оксиацил-КоА = 2,3-(или 3,4)-*транс*-еноил-КоА + H_2O	Ткани животных Катализирует также обратную реакцию с соответствующими *цис*-соединениями	[2516, 2520, 2521, 2752]
3-окси-3-метилглутарил-КоА = *транс*-3-метилглутаконил-КоА + H_2O	Ткани животных, растения, бактерии	[1106]
D-*эритро*-имидазолглицерофосфат = Имидазолацетолфосфат + H_2O	Плесневые грибы, бактерии	[61]
L-серин + Индол = L-триптофан + H_2O	Растения, плесневые грибы Бактериальный фермент представляет собой систему двух белков	[516, 2103, 2570, 2942]
L-серин + H_2S = L-цистеин + H_2O	Дрожжи	[2331, 2332]
L-серин + Метантиол = S-метил-L-цистеин + H_2O	Дрожжи	[2896]
2,5-аминолевулинат = Порфобилиноген + $2H_2O$	Ткани животных, бактерии	[832, 884]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
4.2.1.c	*Гидро-лиаза полуальдегида малоновой кислоты*	Дегидратаза полуальдегида малоновой кислоты	

4.2.99 Прочие углерод — кислород-лиазы

4.2.99.1	Гиалуронат — лиаза	Гиалуронат-лиаза (ранее известная как гиалуронидаза, но см. также 3.2.1.d, e)	
4.2.99.2	О-фосфогомосерин — фосфо-лиаза (присоединяющая H_2O)	Треонин-синтаза	[ПФ]

4.3 Углерод — азот-лиазы

4.3.1 Аммиак-лиазы

4.3.1.1	L-аспартат — аммиак-лиаза	Аспартат — аммиак-лиаза (ранее известная как аспартаза)	[M^{2+}]
4.3.1.2	L-*трео*-3-метиласпартат — аммиак-лиаза	Метиласпартат — аммиак-лиаза	
4.3.1.3	L-гистидин — аммиак-лиаза	Гистидин — аммиак-лиаза (ранее известная как гистидин-α-дезаминаза)	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
Полуальдегид малоновой кислоты = Ацетиленмонокарбоксилат + H_2O	Бактерии	[2926]
Гиалуронат = *n*3 (β-D-глюко-3,4-ен-уроно)-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкоза	Бактерии Действует также на хондроитинсульфат	[1599, 1627, 1806]
О-фосфогомосерин + H_2O = Треонин + Фосфат	Грибы	[749, 750, 751]
L-аспартат = Фумарат + NH_3	Некоторые растения, бактерии	[284, 705, 804, 2870]
L-*treo*-3-метиласпартат = Мезаконат + NH_3	Бактерии	[164]
L-гистидин = Уроканат + NH_3	Печень, бактерии	[981, 1205, 2594, 2858]

4.3.1.a	*L-фенилаланин — аммиак-лиаза*	Фенилаланин — аммиак-лиаза	
4.3.1.4	5-формиминотетрагидрофолат — аммиак-лиаза (циклизующая)	Формиминотетрагидрофолат-циклодезаминаза	
4.3.1.b	*β-Аланин-КоА — аммиак-лиаза*	β-Аланил-КоА — аммиак-лиаза	
	4.3.2 Амидин-лиазы		
4.3.2.1	L-аргининосукцинат — аргинин-лиаза	Аргининосукцинатлиаза (ранее известная как аргининосукциназа)	
4.3.2.2	Аденилосукцинат — АМФ-лиаза	Аденилосукцинатлиаза (ранее известная как аденилосукциназа)	
	4.4 Углерод — сера-лиазы		
4.4.1.1	L-цистеин — сероводород-лиаза (дезаминирующая)	Цистеиндесульфгидраза	[ПФ]
4.4.1.2	L-гомоцистеин — сероводород-лиаза (дезаминирующая)	Гомоцистеин-десульфгидраза	[ПФ]
4.4.1.3	S-диметил-β-пропиотетин — диметилсульфид-лиаза	Диметилпропиотетин-детиометилаза	[S]
4.4.1.4	Аллиин — аллилсульфенат-лиаза (дезаминирующая)	Аллиин-лиаза	[ПФ]

L-фенилаланин = *транс*-Циннамат + NH_3	Растения	[1453]
5-формиминотетрагидрофолат = 5,10-метенилтетрагидрофолат + NH_3	Печень, бактерии	[2141, 2596]
β-Аланил-КоА = Акрилил-КоА + NH_3	Бактерии	[2704]
L-аргининосукцинат = Фумарат + L-аргинин	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии	[2177, 2179, 2767, 2768]
Аденилосукцинат = Фумарат + АМФ	Печень, дрожжи, бактерии Действует также на 5'-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазол	[412, 1585, 1822]
L-цистеин + H_2O = Пируват + + NH_3 + H_2S	Ткани животных, бактерии	[313, 1525, 2459]
L-гомоцистеин + H_2O = 2-оксобутират + NH_3 + H_2S	Ткани животных, бактерии	[791, 1293]
S-диметил-β-пропиотетин = Акрилат + Диметилсульфид	Водоросли	[395]
S-алкил-L-цистеинсульфоксид = Пируват + NH_3 + + Алкилсульфенат	Чеснок	[874, 2540]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакции	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
4.4.1.5	S-лактоилглутатион — метилглиоксаль-лиаза (изомеризующая)	Лактоилглутатионлиаза (ранее известная как глиоксилаза I)		S-лактоилглутатион = Глутатион + Метилглиоксаль	Ткани животных Действует также на 3 фосфоглицероилглутатион	[460, 521, 2150, 2803]

4.5 Углерод — галоид-лиазы

4.5.1.1	1,1,1-трихлор-2,2-*бис* (*n*-хлорфенил)-этан — гидрохлорид-лиаза	ДДТ-дехлоргидраза	[S]	1,1,1-трихлор-2,2-*бис* (*n*-хлорфенил)-этан = 1,1-дихлор-2,2-*бис* (*n*-хлорфенил)-этилен + HCl	Насекомые	[1602, 1854]

5. ИЗОМЕРАЗЫ

5.1 Рацемазы и эпимеразы

5.1.1 Действуют на аминокислоты и их производные

5.1.1.1	Аланинрацемаза	Аланинрацемаза	[ПФ]	L-аланин = D-аланин	Бактерии	[1728, 2910, 2912]
5.1.1.2	Метионинрацемаза	Метионинрацемаза	[ПФ]	L-метионин = D-метионин	Бактерии	[1294]
5.1.1.3	Глутаматрацемаза	Глутаматрацемаза	[ПФ]	L-глутамат = D-глутамат	Бактерии	[848]
5.1.1.4	Пролинрацемаза	Пролинрацемаза	[S]	L-пролин = D-пролин	Бактерии	[2501]
5.1.1.5	Лизинрацемаза	Лизинрацемаза		L-лизин = D-лизин	Бактерии	[1176]
5.1.1.6	Треонинрацемаза	Треонинрацемаза		L-треонин = D-треонин	Бактерии	[65]
5.1.1.7	2,6-L, L-диаминопимелат — 2-эпимераза	Диаминопимелат-эпимераза	[S]	2,6-LL-диаминопимелат = *мезо*-Диаминопимелат	Бактерии	[80]

5.1.1.a	*Оксипролин — 2-эпимераза*	Оксипролинэпимераза	

5.1.2 Действуют на оксикислоты и их производные

5.1.2.1	Лактатрацемаза	Лактатрацемаза	
5.1.2.2	Манделатрацемаза	Манделатрацемаза	
5.1.2.3	3-оксибутирил-КоА — 3-эпимераза	3-оксибутирил-КоА — эпимераза	

5.1.3 Действуют на углеводы и их производные

5.1.3.1	D-рибулозо-5-фосфат — 3-эпимераза	Рибулозофосфат-3-эпимераза	
5.1.3.a	*L-рибулозо-5-фосфат — 4-эпимераза*	Рибулозофосфат-4-эпимераза	
5.1.3.2	УДФ-глюкозо — 4-эпимераза	УДФ-глюкозо-эпимераза (ранее известная как галактовальденаза)	[НАД, Mg^{2+}]
5.1.3.b	*УДФ-арабинозо — 4-эпимераза*	УДФ-арабинозо-эпимераза	
5.1.3.c	*УДФ-глюкуронат — 4-эпимераза*	УДФ-глюкуронат-эпимераза	
5.1.3.d	*УДФ-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкоза — 4-эпимераза*	УДФ-ацетилглюкозамин-эпимераза	[НАД] (для фермента печени)
5.1.3.3	Альдозо — 1-эпимераза	Альдозо-1-эпимераза, альдозомутаротаза	

L-оксипролин = D-аллооксипролин	*Pseudomonas* Катализирует также взаимопревращение D-оксипролина и L-аллооксипролина	[10]
L-лактат = D-лактат	Ткани животных, бактерии	[1183, 1392]
L-манделат = D-манделат	Бактерии	[951]
L-3-оксибутирил-КоА = D-3-оксибутирил-КоА	Печень	[2519, 2751]
D-рибулозо-5-фосфат = D-ксилулозо-5-фосфат	Широко распространен	[90, 608, 1047, 1198, 2489, 2562, 2900]
L-рибулозо-5-фосфат = D-ксилулозо-5-фосфат	Бактерии	[362, 2900]
УДФ-глюкоза = УДФ-галактоза	Ткани животных, дрожжи, бактерии	[401, 1537, 1538, 1765, 1767, 1768]
УДФ-L-арабиноза = УДФ-D-ксилоза	Растения	[721]
УДФ-D-глюкуронат = УДФ-D-галактуронат	Растения	[721]
УДФ-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкоза = УДФ-2-ацетамидо-2-дезокси-D-галактоза	Печень, бактерии	[847]
α-D-глюкоза = β-D-глюкоза	Почки, плесени Действует также на L-арабинозу, D-ксилозу, D-галактозу, мальтозу и лактозу	[207, 1345, 1369, 1567]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакции	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
	5.1.99 Действуют на другие соединения					
5.1.99.a	*Метилмалонил-КоА — рацемаза*	Метилмалонил-КоА — рацемаза		D-метилмалонил-КоА = L-метилмалонил-КоА	Ткани животных, бактерии	[1773, 2038]
	5.2 *цис-транс*-Изомеразы					
5.2.1.1	Малеинат — *цис-транс*-изомераза	Малеинат-изомераза		Малеинат = Фумарат	*Pseudomonas*, адаптированный к никотиновой кислоте	[195]
5.2.1.2	4-малеилацетоацетат — *цис-транс*-изомераза	Малеилацетоацетат-изомераза	[Гл]	4-малеилацетоацетат = 4-фумарилацетоацетат	Печень Действует также на малеилпируват	[674, 1500]
5.2.1.a	*3-малеилпируват — цис-транс-изомераза*	Малеилпируват-изомераза	[Гл]	3-малеилпируват = 3-фумарилпируват	Бактерии	[1500]
5.2.1.3	Все-*транс*-ретинен — 11-*цис-транс*-изомераза	Ретинен-изомераза		Все-*транс*-ретинен = 11-*цис*-ретинен	Сетчатка На свету равновесие смещается в пользу *цис*-изомера	[1178]
	5.3 Внутримолекулярные оксидоредуктазы					
	5.3.1 Катализируют взаимопревращения альдоз и кетоз					
5.3.1.1 К	D-глицеральдегид-3-фосфат — кетол-изомераза	Триозофосфат-изомераза		D-глицеральдегид-3-фосфат = Диоксиацетонфосфат	Широко распространен	[1808, 1810]
5.3.1.2	D-эритрозо — кетол-изомераза	Эритрозоизомераза		D-эритроза = D-эритрулоза	Ткани животных	[2694]

5.3.1.3	D-арабинозо — кетол-изомераза	Арабинозоизомераза	[M^{2+}]
5.3.1.4	L-арабинозо — кетол-изомераза	L-арабинозоизомераза	
5.3.1.5	D-ксилозо — кетол-изомераза	Ксилозоизомераза	[Mg^{2+}]
5.3.1.6	D-рибозо-5-фосфат — кетол-изомераза	Рибозофосфат-изомераза	
5.3.1.a	*D-арабинозо-5-фосфат — кетол-изомераза*	Арабинозофосфат-изомераза	
5.3.1.7	D-маннозо — кетол-изомераза	Маннозоизомераза	
5.3.1.8	D-маннозо-6-фосфат — кетол-изомераза	Маннозофосфат-изомераза	
5.3.1.b	*L-рамнозо — кетол-изомераза*	Рамнозоизомераза	
5.3.1.9	D-глюкозо-6-фосфат — кетол-изомераза	Глюкозофосфат-изомераза	
5.3.1.10	2-амино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат — кетол-изомераза (дезаминирующая)	Глюкозаминфосфат-изомераза	[M^{2+}]

D-арабиноза = D-рибулоза	Бактерии Действует также на L-фукозу и (медленнее) на L-галактозу и D-альтрозу	[466, 908]
L-арабиноза = L-рибулоза	Бактерии	[1046]
D-ксилоза = D-ксилулоза	Бактерии	[1116, 2430]
D-рибозо-5-фосфат = D-рибулозо-5-фосфат	Широко распространен Действует также на D-рибозо-5-пирофосфат и D-рибозо-5-трифосфат	[113, 608, 1160, 1165, 1199]
D-арабинозо-5-фосфат = D-рибулозо-5-фосфат	Бактерии	[2742]
D-манноза = D-фруктоза	Бактерии Действует также на D-ликсозу и D-рамнозу	[2048]
D-маннозо-6-фосфат = D-фруктозо-6-фосфат	Ткани животных, дрожжи	[349, 1984, 2429]
L-рамноза = L-рамнулоза	Бактерии	[2878]
D-глюкозо-6-фосфат = D-фруктозо-6-фосфат	Ткани животных, растения, дрожжи	[133, 1282, 1985, 2167, 2679]
2-амино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат + H_2O = D-фруктозо-6-фосфат + NH_3	Ткани животных, бактерии 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат, который не расщепляется этим ферментом, активирует его	[484, 2057, 2897]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература 160 79
1	2	3	4	5	6	7
5.3.1.11	2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат — кетол-изомераза (деламинирующая)	Ацетилглюкозаминфосфат-изомераза		2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат + $2H_2O$ = D-фруктозо-6-фосфат + + NH_3 + Ацетат	Ткани животных	[483, 1540]
5.3.1.12	D-глюкуронат — кетол-изомераза	Глюкуронат-изомераза		D-глюкуронат = D-фруктуронат	Бактерии Превращает также D-галактуронат в D-тагатуронат	[91, 1379]
	5.3.2 Катализируют взаимопревращения кетонных и енольных групп					
5.3.2.1	Фенилпируват — кетоенол-изомераза	Фенилпируват-таутомераза		Кетофенилпируват = Енолфенилпируват	Ткани животных Действует и на другие арилпируваты	[1408, 1411]
	5.3.3 Перемещают C—C-связи					
5.3.3.1 К	3-кетостероид — Δ^4-Δ^5-изомераза	Стероид-Δ-изомераза		Δ^5-3-кетостероид = Δ^4-3-кетостероид	Ткани животных, бактерии	[1323, 2609]
5.3.3.2	Изопентенилпирофосфат — Δ^3-Δ^2-изомераза	Изопентенилпирофосфат-изомераза	[Mg^{2+}, S]	Диметилаллилпирофосфат = Изопентенилпирофосфат	Ткани животных, дрожжи	[25]
5.3.3.3	Винилацетил-КоА — Δ^3-Δ^2-изомераза	Винилацетил-КоА — изомераза		Винилацетил-КоА = Кротоноил-КоА	Ткани животных, бактерии Действует также на 3-метилвинилацетил-КоА	[1638, 2222]
	5.4 Внутримолекулярные трансферазы					
	5.4.1 Переносят ацильные группы					
5.4.1.1	Лизолецитин — 2,3-ацилмутаза	Лизолецитин-ацилмутаза (ранее известная как лизолецитинмиграта́за)		2-лизолецитин = 3-лизолецитин	Поджелудочная железа, плесневые грибы	[2703]

5.4.2 Переносят фосфорильные группы

5.4.2.1	D-фосфоглицерат — 2,3-фосфомутаза	Фосфоглицерат-фосфомутаза	

5.4.99 Переносят другие группы

5.4.99.1	L-*трео*-3-метиласпартат — карбоксиаминометилмутаза	Метиласпартат-мутаза	[B_{12}]
5.4.99.2	Метилмалонил-КоА — КоА-карбонилмутаза	Метилмалонил-КоА — мутаза	[B_{12}]

5.5 Внутримолекулярные лиазы

5.5.1.1	4-карбоксиметил-4-оксиизокротонолактон — лиаза (дециклизующая)	Муконат-циклоизомераза	[Mn^{2+}]

6. ЛИГАЗЫ

6.1 Образуют C — O-связи

6.1.1 Лигазы, образующие аминоацил-РНК

6.1.1.1	L-тирозин:*s*-РНК — лигаза (АМФ)	Тирозил-*s*-РНК — синтетаза	[Mg^{2+}, K^+]
6.1.1.2	L-триптофан: *s*-РНК — лигаза (АМФ)	Триптофанил-*s*-РНК — синтетаза	[Mg^{2+}]

2-фосфо-D-глицерат = 3-фосфо-D-глицерат	Зародыши злаков	[724, 1222]
L-*treo*-3-метиласпартат = L-глутамат	Бактерии	[2835]
Метилмалонил-КоА = Сукцинил-КоА	Ткани животных, бактерии	[190, 191, 678, 2038, 2536]
(+)-4-карбоксиметил-4-оксиизокротонолактон = *цис-цис*-Муконат	Бактерии Действует (очень медленно) на *цис-транс*-муконат (в обратной реакции)	[2419]
АТФ + L-тирозин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-тирозил-*s*-РНК	Ткани животных	[51, 1134, 2349]
АТФ + L-триптофан + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + + L-триптофанил-*s*-РНК	Ткани животных	[477, 552, 2906]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
6.1.1.3	L-треонин:*s*-РНК — лигаза (АМФ)	Треонил-*s*-РНК — синтетаза	
6.1.1.4	L-лейцин:*s*-РНК — лигаза (АМФ)	Лейцил-*s*-РНК — синтетаза	
6.1.1.5	L-изолейцин: *s*-РНК — лигаза (АМФ)	Изолейцил-*s*-РНК — синтетаза	
6.1.1.6	L-лизин:*s*-РНК — лигаза (АМФ)	Лизил-*s*-РНК — синтетаза	
6.1.1.7	L-аланин:*s*-РНК — лигаза (АМФ)	Аланил-*s*-РНК — синтетаза	$[M^{2+}]$
6.1.1.8	*D-аланинполифосфорибитол — лигаза (АМФ)*	D-аланилполифосфорибитол — синтетаза	
6.1.1.9	L-валин:*s*-РНК — лигаза (АМФ)	Валил-*s*-РНК — синтетаза	
6.1.1.10	L-метионин:*s*-РНК — лигаза (АМФ)	Метионил-*s*-РНК — синтетаза	

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
АТФ + L-треонин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-треонил-*s*-РНК	Печень	[51, 1134]
АТФ + L-лейцин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-лейцил-*s*-РНК	Печень, бактерии	[51, 215, 220]
АТФ + L-изолейцин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-изолейцил-*s*-РНК	Печень, бактерии	[51, 215, 220]
АТФ + L-лизин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-лизил-*s*-РНК	Печень	[51]
АТФ + L-аланин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-аланил-*s*-РНК	Печень	[1135, 2811]
АТФ + D-аланин + Полирибитолфосфат = АМФ + Пирофосфат + O-D-аланилполирибитолфосфат	Бактерии Участвует в синтезе тейхоевых кислот	[132]
АТФ + L-валин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-валил-*s*-РНК	Бактерии	[215, 220]
АТФ + L-метионин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-метионил-*s*-РНК	Дрожжи, бактерии	[214, 215, 217, 220]

6.1.1.11	L-серин:*s*-РНК — лигаза (АМФ)	Серил-*s*-РНК — синтетаза	

6.2 Образуют C — S-связи

6.2.1 Кислото-тиоловые лигазы

6.2.1.1	Ацетат:КоА — лигаза (АМФ)	Ацетил-КоА — синтетаза	[Mg^{2+}, K^+]
6.2.1.2	Кислота:КоА — лигаза (АМФ)	Ацил-КоА — синтетаза	[Mg^{2+}]
6.2.1.3	Кислота:КоА — лигаза (АМФ)	Ацил-КоА — синтетаза	
6.2.1.4	Сукцинат:КоА — лигаза (ГДФ)	Сукцинил-КоА — синтетаза	[Mg^{2+}]
6.2.1.5	Сукцинат:КоА — лигаза (АДФ)	Сукцинил-КоА — синтетаза	[Mg^{2+}]
6.2.1.6	Глутарат:КоА — лигаза (АДФ)	Глутарил-КоА — синтетаза	
6.2.1.7	Холат:КоА — лигаза (АМФ)	Холоил-КоА — синтетаза	[Mg^{2+}]

АТФ + L-серин + *s*-РНК = АМФ + Пирофосфат + L-серил-*s*-РНК	Поджелудочная железа	[2815]
АТФ + Ацетат + КоА = АМФ + Пирофосфат + Ацетил-КоА	Ткани животных, растения, дрожжи, бактерии Действует также на пропионат и акрилат	[451, 683, 1055, 1264, 1604, 1825]
АТФ + Кислота + КоА = АМФ + Пирофосфат + Ацил-КоА	Печень Действует на кислоты от C_4 до C_{11} и на соответствующие 3-окси- и 2,3- или 3,4-ненасыщенные кислоты	[1356, 1535, 1690, 2069]
АТФ + Кислота + КоА = АМФ + Пирофосфат + Ацил-КоА	Печень Действует на кислоты от C_6 до C_{20}	[291, 1439]
ГТФ + Сукцинат + КоА = ГДФ + Ортофосфат + Сукцинил-КоА	Ткани животных Использует также итаконат вместо сукцината и ИТФ вместо ГТФ	[1319, 1772, 2294]
АТФ + Сукцинат + КоА = АМФ + Ортофосфат + Сукцинил-КоА	Растения, бактерии	[1316, 1318]
АТФ + Глутарат + КоА = АДФ + Ортофосфат + Глутарил-КоА	Ткани животных Использует также ГТФ или ИТФ вместо АТФ	[1798]
АТФ + Холат + КоА = АМФ + Пирофосфат + Холоил-КоА	Печень	[689, 690]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы	Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
1	2	3	4	5	6	7
6.3 Образуют C—N-связи						
6.3.1 Кислото аммиачные лигазы (амид-синтетазы)						
6.3.1.1	L-аспартат:аммиак—лигаза (АМФ)	Аспарагинсинтетаза		АТФ + L-аспартат + NH_3 = АМФ + Пирофосфат + L-аспарагин	Растения, дрожжи	[2993, 2813]
6.3.1.2	L-глутамат:аммиак—лигаза (АДФ)	Глутаминсинтетаза	[M^{2+}]	АТФ + L-глутамат + NH_3 = АДФ + Ортофосфат + L-глутамин	Ткани животных, растения, плесневые грибы, бактерии	[688, 796, 1506, 1563]
6.3.1.3	Рибозиламин-5-фосфат: глицин—лигаза (АДФ)	Фосфорибозилглицинамид-синтетаза		АТФ + Глицин + Рибозиламин-5′-фосфат = АДФ + Ортофосфат + Рибозилглицинамид-5′-фосфат	Печень	[866, 1016]
6.3.2 Кислото-аминокислотные лигазы (пептид-синтетазы)						
6.3.2.1	L-пантоат:β-аланин—лигаза (АМФ)	Пантотенатсинтетаза	[Mg^{2+}, K^+]	АТФ + L-пантоат + β-Аланин = АМФ + Пирофосфат + L-пантотенат	Плесневые грибы	[837, 1644, 1645]
6.3.2.a	*L-гистидин:β-аланин—лигаза (АМФ)*	Карнозинсинтетаза		АТФ + L-гистидин + β-Аланин = АМФ + Пирофосфат + Карнозин	Ткани животных	[1297, 2513]
6.3.2.2	L-глутамат:L-цистеин—γ-лигаза (АДФ)	γ-Глутамилцистеинсинтетаза	[Mg^{2+}]	АТФ + L-глутамат + L-цистеин = АДФ + Ортофосфат + γ-L-глутамил-L-цистеин	Печень, растения	[1701, 2464]
6.3.2.3	γ-L-глутамил-L-цистеин:глицин—лигаза (АДФ)	Глутатионсинтетаза	[Mg^{2+}]	АТФ + γ-L-глутамил-L-цистеин + Глицин = АДФ + Ортофосфат + Восстановленный глутатион	Печень, дрожжи	[1221, 1250]

6.3.2.4	D-аланин:D-аланин — лигаза (АДФ)	D-аланилаланин-синтетаза	
6.3.2.5		Фосфопантотеноилцистеин-синтетаза	
6.3.2.6	5′-фосфорибозил-4-карбокси-5-аминоимидазол:L-аспартат — лигаза (АДФ)	Фосфорибозил-аминоимидазолсукцинокарбоксамид — синтетаза	[Mg^{2+}]
6.3.2.b	*УДФ-N-ацетилмурамат:L-аланин — лигаза (АДФ)*	УДФ-N-ацетилмурамоил-аланин — синтетаза	[Mg^{2+}]
6.3.2.c	*УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланин:D-глутамат — лигаза (АДФ)*	УДФ-N-ацетилмурамоил-аланил-D-глутамат — синтетаза	[Mg^{2+}]
6.3.2.7	УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамат:L-лизин — лигаза (АДФ)	УДФ-N-ацетилмурамоил-аланил-D-глутамил-лизин — синтетаза	[Mg^{2+}]

АТФ + D-аланин + D-аланин = АДФ + Ортофосфат + D-аланилаланин	Бактерии	[339]
ЦТФ + 4′-фосфо-L-пантотенат + L-цистеин = Неидентифицированные продукты распада ЦТФ + 4′-фосфо-L-пантотеноил-L-цистеин	Ткани животных, бактерии Использует вместо цистеина некоторые его производные	[339]
АТФ + 5′-фосфорибозил-4-карбокси-5-аминоимидазол + L-аспартат = АДФ + + Ортофосфат + 5′-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазол	Печень	[1629]
АТФ + УДФ-N-ацетилмурамат + L-аланин = АДФ + + Ортофосфат + УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланин	Бактерии	[1220]
АТФ + УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланин + D-глутамат = АДФ + Ортофосфат + + УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамат	Бактерии	[1220]
АТФ + УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамат + L-лизин = АДФ + Ортофосфат + УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамил-L-лизин	Бактерии	[1220]

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное название	Активные группы и кофакторы
1	2	3	4
6.3.2.d	*УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамил-L-лизин: D-аланил-D-аланин — лигаза (АДФ)*	УДФ-N-ацетилмурамоил-аланил-D-глутамил-лизил-D-аланил-D-аланин — синтетаза	$[Mg^{2+}]$
	6.3.3 Цикло-лигазы		
6.3.3.1	5′-фосфорибозилформилглицинамидин — цикло-лигаза (АДФ)	Фосфорибозиламиноимидазол-синтетаза	$[Mg^{2+}, K^{+}]$
	6.3.4 Прочие C — N-лигазы		
6.3.4.1	Ксантозин-5′-фосфат:аммиак — лигаза (АМФ)	ГМФ-синтетаза	
6.3.4.2	УТФ:аммиак — лигаза (АДФ)	ЦТФ-синтетаза	
6.3.4.3 К	Формиат:тетрагидрофолат — лигаза (АДФ)	Формилтетрагидрофолат-синтетаза	$[Mg^{2+}]$
6.3.4.4	ИМФ:L-аспартат — лигаза (ГДФ)	Аденилосукцинат-синтетаза	
6.3.4.5	L-цитруллин:L-аспартат — лигаза (АМФ)	Аргининосукцинат-синтетаза	$[Mg^{2+}]$

Реакция	Источники, сведения о специфичности и другие замечания	Литература
5	6	7
АТФ + УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамил-L-лизин + D-аланил-D-аланин = АДФ + Ортофосфат + УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамил-L-лизил-D-аланил-D-аланин	Бактерии Участвует вместе с ферментами 6.3.2.4, b, c и 7 в синтезе пептидов клеточной оболочки	[1221]
АТФ + 5′-фосфорибозилформилглицинамидин = АДФ + Ортофосфат + 5′-фосфорибозил-5-аминоимидазол	Печень	[1556]
АТФ + Ксантозин-5′-фосфат + NH_3 = АМФ + Пирофосфат + ЦМФ	Бактерии	[1889]
АТФ + УТФ + NH_3 = АДФ + Ортофосфат + ЦТФ	Бактерии	[1584]
АТФ + Формиат + Тетрагидрофолат = АДФ + Ортофосфат + 10-формилтетрагидрофолат	Печень, бактерии	[914, 1229, 2144, 2855]
ГТФ + ИМФ + L-аспартат = ГДФ + Ортофосфат + Аденилосукцинат	Ткани животных, бактерии	[546, 1585, 2947]
АТФ + L-цитруллин + L-аспартат = АМФ + Пирофосфат + L-аргининосукцинат	Печень, почки, дрожжи	[2177, 2178, 2180, 2344]

6.3.5 C—N-лигазы с глутамином в роли N-донора

6.3.5.1	Дезамидо-НАД:L-глутамин—амидо-лигаза (АМФ)	НАД-синтетаза	[Mg^{2+}, K^+]
6.3.5.2	Ксантозин-5′-фосфат:L-глутамин—амидо-лигаза (АМФ)	ГМФ-синтетаза	[Mg^{2+}]
6.3.5.3	5′-фосфорибозилформилглицинамид:L-глутамин—амидо-лигаза (АДФ)	Фосфорибозилформилглицинамидин-синтетаза	[Mg^{2+}, K^+]

6.4 Образуют C—C-связи

6.4.1.1	Пируват:CO_2—лигаза (АДФ)	Пируваткарбоксилаза	Бт [Mg^{2+}]
6.4.1.2	Ацетил-КоА:CO_2—лигаза (АДФ)	Ацетил-КоА—карбоксилаза	Бт
6.4.1.3 К	Пропионил-КоА:CO_2—лигаза (АДФ)	Пропионил-КоА—карбоксилаза	Бт
6.4.1.4	3-метилкротоноил-КоА:CO_2—лигаза (АДФ)	Метилкротоноил-КоА—карбоксилаза	Бт

АТФ + Дезамидо-НАД + L-глутамин + H_2O = АМФ + Пирофосфат + НАД + L-глутамат	Ткани животных, дрожжи, бактерии Использует и NH_3 вместо глутамина	[1208, 1209]
АТФ + Ксантозин-5′-фосфат + L-глутамин + H_2O = АМФ + Пирофосфат + ГМФ + L-глутамат	Ткани животных	[4, 1502]
АТФ + 5′-фосфорибозилформилглицинамид + L-глутамин + H_2O = АДФ + Ортофосфат + 5′-фосфорибозилформилглицинамидин + L-глутамат	Печень	[1792]
АТФ + Пируват + CO_2 + H_2O = АДФ + Ортофосфат + Оксалоацетат	Ткани животных, бактерии Фермент из тканей животных требует ацетил-КоА	[2375, 2701]
АТФ + Ацетил-КоА + CO_2 + H_2O = АДФ + Ортофосфат + Малонил-КоА	Ткани животных, растения Катализирует также реакции транскарбоксилирования. Растительный фермент карбоксилирует также пропионил-КоА и бутирил-КоА	[761, 1024, 2753]
АТФ + Пропионил-КоА + CO_2 + H_2O = АДФ + Ортофосфат + Метилмалонил-КоА	Ткани животных Катализирует также карбоксилирование бутирил-КоА и реакции транскарбоксилирования	[1326, 1509]
АТФ + 3-метилкротонил-КоА + CO_2 + H_2O = АДФ + Ортофосфат + 3-метилглутаконил-КоА	Бактерии	[1404, 1639, 2222]

УКАЗАТЕЛЬ К СПИСКУ ФЕРМЕНТОВ

Аденаза 3.5.4.2
Аденилаткиназа 2.7.4.3
Аденилилсульфаткиназа 2.7.1.25
Аденилосукциназа 4.3.2.
Аденилосукцинат — АМФ-лиаза 4.3.2.2
Аденилосукцинат-лиаза 4.3.2.2
Аденилосукцинат-синтетаза 6.3.4.4
Аденин — аминогидролаза 3.5.4.2
Адениндезаминаза 3.5.4.2
Аденин-фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.7
Аденозилгомоцистеиназа 3.3.1.1
S-аденозил-L-гомоцистеин — гидролаза 3.3.1.1
S-аденозилметионин — алкилтрансфераза (циклизующая) 2.5.1.b
S-аденозилметионин:N-ацетилсеротонин — О-метилтрансфераза 2.1.1.4
S-аденозилметионин:гистамин — N-метилтрансфераза 2.1.1.c
S-аденозилметионин:L-гомоцистеин — S-метилтрансфераза 2.1.1.e
S-аденозилметионин:гуанидинацетат — N-метилтрансфераза 2.1.1.2
S-аденозилметионин:катехол — О-метилтрансфераза 2.1.1.a
S-аденозилметионин:никотинамид—N-метилтрансфераза 2.1.1.1
S-аденозилметионин:никотинат — N-метилтрансфераза 2.1.1.b
S-аденозилметионин:тиол — S-метилтрансфераза 2.1.1.d
Аденозилметионин-циклотрансфераза 2.5.1.b
Аденозин — аминогидролаза 3.5.4.4
Аденозиндезаминаза 3.5.4.4
Аденозин-3′,5′-дифосфат — 3′-фосфогидролаза 3.1.3.7
Аденозинкиназа 2.7.1.20
АДФ — аминогидролаза 3.5.4.7
АДФ-дезаминаза 3.5.4.7
АДФ:сульфат — аденилилтрансфераза 2.7.7.5
Азобензолредуктаза 1.6.6.7
Азот:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.7.99.2
Аконитаза 4.2.1.3
Аконитатгидратаза 4.2.1.3
Аконитатдекарбоксилаза 4.1.1.6
D-аланилаланин-синтетаза 6.3.2.4
β-Аланил-КоА — аммиак-лиаза 4.3.1.b
β-Аланил-КоА — аммиак-лиаза 4.3.1.b
D-аланилполифосфорибитол — синтетаза 6.1.1.8
Аланил-*s*-РНК — синтетаза 6.1.1.7
D-аланин:D-аланин — лигаза (АДФ) 6.3.2.4
Аланин-аминотрансфераза 2.6.1.2
β-Аланин-аминотрансфераза 2.6.1.b
Аланиндегидрогеназа 1.4.1.1
Аланин-кетокислотная аминотрансфераза 2.6.1.12
L-аланин:НАД — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.4.1.1
L-аланин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.2
L-аланин:2-оксокислота — аминотрансфераза 2.6.1.12
D-аланин:полифосфорибитол — лигаза (АМФ) 6.1.1.8
L-аланин:полуальдегид малоновой кислоты — аминотрансфераза 2.6.1.b
Аланинрацемаза 5.1.1.1
L-аланин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.7
Алиэстераза 3.1.1.1
Алкилгалоидаза 3.8.1.1
Алкогольдегидрогеназа 1.1.1.1
Алкоголь:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.1
Алкоголь:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.2
Алкоксиарил-гидроксилаза 1.99.1.12
Аллантоат — уреогидролаза 3.5.3.4
Аллантоиказа 3.5.3.4

Аллантоиназа	3.5.2.5
Аллантоин — амидогидролаза	3.5.2.5
Аллиин — аллилсульфенат-лиаза	4.4.1.4
Аллиин-лиаза	4.4.1.4
Аллилалкогольдегидрогеназа	1.1.1.a
Аллил-алкоголь:НАДФ — оксидоредуктаза	1.1.1.a
Аллотреонинальдолаза	4.1.2.6
L-аллотреонин — ацетальдегид-лиаза	4.1.2.6
Альгиназа	3.2.1.16
Альгинат — гликаногидролаза	3.2.1.16
Альдегиддегидрогеназа	1.2.1.3
	1.2.1.4
	1.2.1.5
	1.2.1.10
Альдегид:НАД — оксидоредуктаза	1.2.1.3
Альдегид:НАД — оксидоредуктаза (ацилирующая КоА)	1.2.1.10
Альдегид:НАДФ — оксидоредуктаза	1.2.1.4
Альдегид:НАД(Ф) — оксидоредуктаза	1.2.1.5
Альдегидоксидаза	1.2.3.1
Альдегид:O_2 — оксидоредуктаза	1.2.3.1
Альдозо-мутаротаза	5.1.3.3
Альдозоредуктаза	1.1.1.21
Альдозо — 1-эпимераза	5.1.3.3
Альдозо-1-эпимераза	5.1.3.3
Альдолаза	4.1.2.c
	4.1.2.7
Альдонолактоназа	3.1.1.18
D-альтронат — гидро-лиаза	4.2.1.7
Альтронат-дегидратаза	4.2.1.7
D-альтронат:НАД — оксидоредуктаза	1.1.1.e
Амидаза	3.5.1.4
ω-Амидаза	3.5.1.3
Амидогидролаза N-ациламинокислот	3.5.1.b
ω-Амидодикарбоксилат — амидогидролаза	3.5.1.3
Амидофосфорибозилтрансфераза	2.4.2.14
α-Амилаза	3.2.1.1
β-Амилаза	3.2.1.2
Амило-1,6-глюкозидаза	3.2.1.b
Амиломальтаза	2.4.1.3
Амилопектин — 6-глюканогидролаза	3.2.1.9
Амилопектин-1,6-глюкозидаза	3.2.1.9
Амилосахараза	2.4.1.4
Аминоацилаза I	3.5.1.b
Аминоацилаза II	3.5.1.c
Аминоацил-L-гистидин — гидролаза	3.4.3.3
Аминоацилгистидин-дипептидаза	3.4.3.3
Аминоацил-1-метил-L-гистидин — гидролаза	3.4.3.4
Аминоацил-метилгистидин-дипептидаза	3.4.3.4
Аминобензоатдекарбоксилаза	4.1.1.24
Аминобензоат — карбоксилиаза	4.1.1.24
Аминобутиральдегиддегидрогеназа	1.2.1.e
4-аминобутиральдегид:НАД — оксидоредуктаза	1.2.1.e
Аминобутират-аминотрансфераза	2.6.1.c
4-аминобутират:2-оксоглутарат — аминотрансфераза	2.6.1.c
5-аминовалерат:НАД — оксидоредуктаза (циклизующая)	1.4.1.6
Аминодезоксиглюконат-дегидратаза	4.2.1.b
2-амино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат — кетол-изомераза (дезаминирующая)	5.3.1.10
2-амино-2-дезокси-D-глюконат — гидро-лиаза (дезаминирующая)	4.2.1.b
Аминоимидазолаза	3.5.4.8
4-аминоимидазол — аминогидролаза	3.5.4.8
L-аминокислота:НАД — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	1.4.1.5
D-аминокислота:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	1.4.3.3
L-аминокислота:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая)	1.4.3.2
5-аминолевулинат — гидролиаза (присоединяющая 5-аминолевулинат и циклизующая)	4.2.1.24
Аминолевулинатдегидратаза	4.2.1.24
Аминомалонатдекарбоксилаза	4.1.1.10
Аминомалонат — карбоксилиаза	4.1.1.10
Аминопептидаза	3.4.1.2
Аминотрансфераза диаминокислот	2.6.1.8
Аминотрипептидаза	3.4.1.3
Аммиак:(акцептор) — оксидоредуктаза	1.7.99.1

АМФ — аминогидролаза 3.5.4.6
АМФ-дезаминаза 3.5.4.6
АМФ-нуклеозидаза 3.2.2.4
АМФ:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.7
АМФ-пирофосфорилаза 2.4.2.7
АМФ — фосфорибогидролаза 3.2.2.4
Ансериназа 3.4.3.4
Апираза 3.6.1.5
L-арабиноза:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.46
D-арабиноза-5-фосфат — кетол-изомераза 5.3.1.a
L-арабинозодегидрогеназа 1.1.1.46
Арабинозоизомераза 5.3.1.3
L-арабинозоизомераза 5.3.1.4
D-арабинозо — кетол-изомераза 5.3.1.3
L-арабинозо — кетол-изомераза 5.3.1.4
Арабинозофосфат-изомераза 5.3.1.a
Арабинокиназа 2.7.1.d
D-арабитолдегидрогеназа 1.1.1.11
L-арабитолдегидрогеназа 1.1.1.12
1.1.1.13
D-арабитол:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.11
L-арабитол:НАД — оксидоредуктаза (образующая L-ксилулозу) 1.1.1.12
L-арабитол:НАД — оксидоредуктаза (образующая L-рибулозу) 1.1.1.13
D-арабонат — гидро-лиаза 4.2.1.5
L-арабонат — гидро-лиаза 4.2.1.a
Арабонат-дегидратаза 4.2.1.5
L-арабонат-дегидратаза 4.2.1.a
Арабонолактоназа 3.1.1.15
L-арабоно-γ-лактон — гидролаза 3.1.1.15
Аргиназа 3.5.3.1
L-аргинин:глицин — амидинотрансфераза 2.6.2.1
Аргининдезаминаза 3.5.3.6
Аргининдекарбоксилаза 4.1.1.19
L-аргинин — иминогидролаза 3.5.3.6
L-аргинин — карбокси-лиаза 4.1.1.19
Аргининкиназа 2.7.3.3
Аргininосукциназа 4.3.2.1
L-аргininосукцинат — аргинин-лиаза 4.3.2.1
Аргininосукцинат-лиаза 4.3.2.1
Аргininосукцинат-синтетаза 6.3.4.5
L-аргинин — уреогидролаза 3.5.3.1
Арилалкогольоксидаза 1.1.3.a
Арил-алкоголь:O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.a
Ариламин-ацетилтрансфераза 2.3.1.5
Ариламинсульфотрансфераза 2.8.2.a
Арилациламидаза 3.5.1.a
Арилациламин — амидогидролаза 3.5.1.a
Арил-4-гидроксилаза 1.99.1.1
Арилсульфатаза 3.1.6.1
Арилсульфат — сульфогидролаза 3.1.6.1
Арилсульфотрансфераза 2.8.2.1
Арилформиламин — амидогидролаза 3.5.1.9
Ариластераза 3.1.1.2
Аскорбатоксидаза 1.10.3.3
L-аскорбат:O_2 — оксидоредуктаза 1.10.3.3
Аспарагиназа 3.5.1.1
L-аспарагин — амидогидролаза 3.5.1.1
Аспарагин-кетокислотная аминотрансфераза 2.6.1.14
L-аспарагин:2-оксокислота — аминотрансфераза 2.6.1.14
Аспарагинсинтетаза 6.3.1.1
Аспартаза 4.3.1.1
Аспартат-аминотрансфераза 2.6.1.1
D-аспартат-аминотрансфераза 2.6.1.10
Аспартат — аммиак-лиаза 4.3.1.1
L-аспартат — аммиак-лиаза 4.3.1.1
L-аспартат:аммиак — лигаза (АМФ) 6.3.1.1
Аспартат-ацетилтрансфераза 2.3.1.a
Аспартат — 1-декарбоксилаза 4.1.1.11
Аспартат — 4-декарбоксилаза 4.1.1.12
Аспартат-карбамоилтрансфераза 2.1.3.2
L-аспартат — 1-карбоксилиаза 4.1.1.11
L-аспартат — 4-карбоксилиаза 4.1.1.12
Аспартаткиназа 2.7.2.4
D-аспартат-оксидаза 1.4.3.1
D-аспартат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.10
L-аспартат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.1
D-аспартат:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.4.3.1
L-аспартат-β-полуальдегид:НАДФ — оксидоредуктаза (фосфорилирующая) 1.2.1.11
Аспартоацилаза 3.5.1.c
Аспергиллопептидаза А 3.4.4.17
Атропин — ацилгидролаза 3.1.1.10
АТФ:аденилилсульфат — 3′-фосфотрансфераза 2.7.1.25

АТФ:аденозин — 5′-фосфотрансфераза 2.7.1.20
АТФ-аза 3.6.1.3
3.6.1.4
3.6.1.8
АТФ:2-амино-2-дезокси-D-глюкоза — фосфотрансфераза 2.7.1.8
АТФ:АМФ — фосфотрансфераза 2.7.4.3
АТФ:L-арабиноза — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.d
АТФ:L-аргинин — фосфотрансфераза 2.7.3.3
АТФ:L-аспартат — 4-фосфотрансфераза 2.7.2.4
АТФ:ацетат — фосфотрансфераза 2.7.2.1
АТФ:D-галактоза — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.6
АТФ:D-галактуронат — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.b
АТФ:D-гексоза — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.1
АТФ:D-глицеральдегид — 3-фосфотрансфераза 2.7.1.28
АТФ:D-глицерат — 3-фосфотрансфераза 2.7.1.31
АТФ:глицерол — фосфотрансфераза 2.7.1.30
АТФ:D-глюкоза — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.2
АТФ:D-глюкозо-1-фосфат — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.10
АТФ:D-глюконат — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.12
АТФ:D-глюкуронат — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.a
АТФ:ГМФ — фосфотрансфераза 2.7.4.b
АТФ:L-гомосерин — О-фосфотрансфераза 2.7.1.39
АТФ:гуанидинацетат — фосфотрансфераза 2.7.3.1
АТФ:дезокси-ЦМФ — фосфотрансфераза 2.7.4.5
АТФ:дефосфо-КоА — 3′-фосфотрансфераза 2.7.1.24
АТФ — дифосфогидролаза 3.6.1.5
АТФ:карбамат — фосфотрансфераза 2.7.2.2
АТФ:карбамат — фосфотрансфераза (дефосфорилирующая) 2.7.2.a
АТФ:креатин — фосфотрансфераза 2.7.3.2
АТФ:D-ксилулоза — 5-фосфотрансфераза 2.7.1.17
АТФ:ломбрицин — фосфотрансфераза 2.7.3.b
АТФ:D-манноза — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.7
АТФ:мевалонат — 5-фосфотрансфераза 2.7.1.36
АТФ:2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидин — 5-фосфотрансфераза 2.7.1.g
АТФ:2-метил-4-амино-5-фосфометилпиримидин — фосфотрансфераза 2.7.4.a
АТФ:4-метил-5-(2′-оксиэтил)-тиазол — 2′-фосфотрансфераза 2.7.1.h
АТФ:L-метионин — S-аденозилтрансфераза 2.4.2.13
АТФ:НАД — 2′-фосфотрансфераза 2.7.1.23
АТФ:никотинатмононуклеотид — аденилилтрансфераза 2.7.7.a
АТФ:НМН — аденилилтрансфераза 2.7.7.1
АТФ:нуклеозиддифосфат — фосфотрансфераза 2.7.4.6
АТФ:нуклеозидмонофосфат — фосфотрансфераза 2.7.4.4
АТФ:оксиацетон — фосфотрансфераза 2.7.1.29
АТФ:2-оксо-D-глюконат — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.13
АТФ:2-оксо-3-дезокси-D-глюконат — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.c
АТФ:пантетеин-4′-фосфат — аденилилтрансфераза 2.7.7.3
АТФ:пантетеин — 4′-фосфотрансфераза 2.7.1.34
АТФ:пантотенат — 4′-фосфотрансфераза 2.7.1.33
АТФ:пиридоксаль — 5-фосфотрансфераза 2.7.1.35
АТФ — пирофосфогидролаза 3.6.1.8
АТФ:5-пирофосфомевалонат — карбокси-лиаза (дегидратирующая) 4.1.1.33
АТФ:пируват — фосфотрансфераза 2.7.1.40
АТФ:полинуклеотид — аденилилтрансфераза 2.7.7.b
АТФ:полифосфат — фосфотрансфераза 2.7.4.1
АТФ:протеин — фосфотрансфераза 2.7.1.37
АТФ:L-рамнулоза — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.5

АТФ:D-рибоза — 5-фосфотрансфераза 2.7.1.15
АТФ:N-рибозилникотинамид — 5′-фосфотрансфераза 2.7.1.22
АТФ:D-рибозо-5-фосфат — пирофосфотрансфераза 2.7.6.1
АТФ:D-рибозо-5-фосфат — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.18
АТФ:рибофлавин — 5′-фосфотрансфераза 2.7.1.26
АТФ:D-рибулоза — 5-фосфотрансфераза 2.7.1.e
АТФ:L-(или D)-рибулоза — 5-фосфотрансфераза 2.7.1.16
АТФ:D-рибулозо-5-фосфат — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.19
АТФ:РНК — аденилилтрансфераза 2.7.7.c
АТФ:D-седогептулоза — 7-фосфотрансфераза 2.7.1.14
АТФ:сульфат — аденилилтрансфераза 2.7.7.4
АТФ:тауроциамин — фосфотрансфераза 2.7.3.a
АТФ:тиамин — пирофосфотрап:фераза 2.7.6.2
АТФ:тимидинмонофосфат — трансфераза 2.7.4.c
АТФ:тимидин — 5′-фосфотрансфераза 2.7.1.21
АТФ:уридин — 5′-фосфотрансфераза 2.7.1.f
АТФ:ФМН — аденилилтрансфераза 2.7.7.2
АТФ — фосфогидролаза 3.6.1.3
3.6.1.4
АТФ-3-фосфо-D-глицерат — 1-фосфотрансфераза 2.7.2.3
АТФ:5-фосфомевалонат — фосфотрансфераза 2.7.4.2
АТФ:фосфорилаза — фосфотрансфераза 2.7.1.38
АТФ:D-фруктоза — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.3
АТФ:D-фруктоза — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.4
АТФ:D-фруктозо-6-фосфат — 1-фосфотрансфераза 2.7.1.11
АТФ:холин — фосфотрансфераза 2.7.1.32
АТФ-цитрат-лиаза 4.1.3.a
АТФ:цитрат — оксалоацетатлиаза (ацетилирующая КоА и дефосфорилирующая АТФ) 4.1.3.a
АТФ:эритритол — фосфотрансфераза 2.7.1.27
АФС-киназа 2.7.1.25
β-Ацетамидодезоксиглюкозидаза 3.2.1.30
β-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозид — ацетамидодезоксиглюкогидролаза 3.2.1.30
2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-1,6-дифосфат:2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-1-фосфат — фосфотрансфераза 2.7.5.2
2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат — кетол-изомераза (дезаминирующая) 5.3.1.11
Ацетаткиназа 2.7.2.1
Ацетат:КоА — лигаза (АМФ) 6.2.1.1
Ацетилглюкозаминфосфат-изомераза 5.3.1.11
Ацетилглюкозаминфосфомутаза 2.7.5.2
Ацетилиндоксилоксидаза 1.7.3.2
N-ацетилиндоксил:O_2 — оксидоредуктаза 1.7.3.2
Ацетил-КоА:2-амино-2-дезокси-D-глюкоза — N-ацетилтрансфераза 2.3.1.3
Ацетил-КоА:2-амино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат — N-ацетилтрансфераза 2.3.1.4
Ацетил-КоА:ариламин — N-ацетилтрансфераза 2.3.1.5
Ацетил-КоА:L-аспартат — N-ацетилтрансфераза 2.3.1.a
Ацетил-КоА:ацетил-КоА — C-ацетилтрансфераза 2.3.1.9
Ацетил-КоА — ацетилтрансфераза 2.3.1.9
Ацетил-КоА — ацилтрансфераза 2.3.1.16
Ацетил-КоА:H_2S — S-ацетилтрансфераза 2.3.1.10
Ацетил-КоА:галактозид — 6-O-ацетилтрансфераза 2.3.1.b
Ацетил-КоА — гидролаза 3.1.2.1
Ацетил-КоА:L-глутамат — N-ацетилтрансфераза 2.3.1.1
Ацетил-КоА:дигидролипоат — S-ацетилтрансфераза 2.3.1.12
Ацетил-КоА:имидазол — N-ацетилтрансфераза 2.3.1.2
Ацетил-КоА — карбоксилаза 6.4.1.2
Ацетил-КоА:карнитин — O-ацетилтрансфераза 2.3.1.7
Ацетил-КоА:CO_2 — лигаза (АДФ) 6.4.1.2
Ацетил-КоА:малонат — КоА-трансфераза 2.8.3.3
Ацетил-КоА:ортофосфат — ацетилтрансфераза 2.3.1.8

Ацетил-КоА:пропионат — КоА-трансфераза 2.8.3.1
Ацетил-КоА — синтетаза 6.2.1.1
Ацетил-КоА:тиоэтаноламин — S-ацетилтрансфераза 2.3.1.11
Ацетил-КоА:холин — О-ацетилтрансфераза 2.3.1.6
N-ацетилмурамид — гликаногидролаза 3.2.1.17
N-ацетилнейраминат — гликогидролаза 3.2.1.18
N-ацетилнейраминат-лиаза 4.1.3.3
N-ацетилнейраминат — пируват-лиаза 4.1.3.3
Ацетилорнитин-аминотрансфераза 2.6.1.11
Ацетилорнитин-деацетилаза 3.5.1.d
α-N-ацетил-L-орнитин — амидогидролаза 3.5.1.d
α-N-ацетил-L-орнитин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.11
Ацетилсеротонин-метилтрансфераза 2.1.1.4
Ацетилтрансфераза аминокислот 2.3.1.1
Ацетилхолин — ацетилгидролаза 3.1.1.7
Ацилхолин — ацилгидролаза 3.1.1.8
Ацетилхолинэстераза 3.1.1.7
Ацетилэстераза 3.1.1.6
Ацетоацетат-декарбоксилаза 4.1.1.4
Ацетоацетат — карбоксилиаза 4.1.1.4
Ацетоацетилглутатион-гидролаза 3.1.2.8
S-ацетоацетилглутатион — гидролаза 3.1.2.8
Ацетоацетил-КоА — редуктаза 1.1.1.36
Ацетоацетил-КоА-тиолаза 2.3.1.9
Ацетоиндегидрогеназа 1.1.1.5
Ацетоин:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.5
2-ацетолактат — карбоксилиаза 4.1.1.5
Ацетолактатдекарбоксилаза 4.1.1.5
Ацетолкиназа 2.7.1.29
Ациламид — амидогидролаза 3.5.1.4
N-ациласпартат — амидогидролаза 3.5.1.c
S-ацилглутатион — гидролаза 3.1.2.7
Ацил-КоА:ацетил-КоА — С-ацилтрансфераза 2.3.1.16
Ацил-КоА-ацилтрансфераза 2.3.1.16
Ацил-КоА:L-глицерол-3-фосфат — О-ацил-трансфераза 2.3.1.15
Ацил-КоА:глицин — N-ацилтрансфераза 2.3.1.13
Ацил-КоА — дегидрогеназа 1.3.2.2
Ацил-КоА:1,2-диглицерид — О-ацилтрансфераза 2.3.1.d
ε-N-ацил-L-лизин — амидогидролаза 3.5.1.e
Ацил-КоА — синтетаза 6.2.1.2
6.2.1.3
Ацил-КоА:цитохром-*c* — оксидоредуктаза 1.3.2.2
Ацил-лизин-деацилаза 3.5.1.e
Ацилфосфатаза 3.6.1.7
Ацилфосфат — фосфогидролаза 3.6.1.7
Ацилхолин — ацилгидролаза 3.1.1.8
Барбитураза 3.5.2.1
Барбитурат — амидогидролаза 3.5.2.1
Бензальдегиддегидрогеназа 1.2.1.6
1.2.1.7
Бензальдегид:НАД — оксидоредуктаза 1.2.1.6
Бензальдегид:НАДФ — оксидоредуктаза 1.2.1.7
Бензилпенициллин — амидогидролаза 3.5.1.11
Бензоилформиатдекарбоксилаза 4.1.1.7
Бензоилформиат — карбоксилиаза 4.1.1.7
Бензоилхолин — гидролаза 3.1.1.9
Бензоилхолинэстераза 3.1.1.9
Бетаинальдегиддегидрогеназа 1.2.1.8
Бетаинальдегид:НАД — оксидоредуктаза 1.2.1.8
Бетаин-гомоцистеин-метилтрансфераза 2.1.1.5
Бетаин:L-гомоцистеин — S-метилтрансфераза 2.1.1.5
Биотинидаза 3.5.1.12
n-Биотиниламинобензоат — амидогидролаза 3.5.1.12
Бромелаин 3.4.4.c
Бутиленгликольдегидрогеназа 1.1.1.4
2,3-бутиленгликоль:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.4
Бутирил-КоА — дегидрогеназа 1.3.2.1
Бутирил-КоА:ортофосфат — бутирилтрансфераза 2.3.1.c
Бутирил-КоА:цитохром-*c* — оксиредуктаза 1.3.2.1
Валил-*s*-РНК — *синтетаза* 6.1.1.9
Валиндекарбоксилаза 4.1.1.14
L-валин — карбокси-лиаза 4.1.1.14
L-валин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.9
Винилацетил-КоА — изомераза 5.3.3.3
Винилацетил-КоА — Δ^3-Δ^2-изомераза 5.3.3.3
Витамин-А-ацетат — гидролаза 3.1.1.12
Витамин-А-эстераза 3.1.1.12

Все-*транс*-ретинен — 11-*цис*-*транс*-изомераза 5.2.1.3
Галактитолдегидрогеназа 1.1.1.16
Галактитол:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.16
D-галактоза:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.48
D-галактоза:O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.c
α-Галактозидаза 3.2.1.22
β-Галактозидаза 3.2.1.23
Галактозид-ацетилтрансфераза 2.3.1.b
α-D-галактозид — галактогидролаза 3.2.1.22
β-D-галактозид — галактогидролаза 3.2.1.23
Галактозодегидрогеназа 1.1.1.48
Галактозооксидаза 1.1.3.c
Галактозо-6-сульфатаза 2.5.1.c
Галактозо-6-сульфат — алкилтрансфераза (циклизующая) 2.5.1.c
Галактозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.10
Галактокиназа 2.7.1.6
D-галактонат — гидро-лиаза 4.2.1.6
Галактонат-дегидратаза 4.2.1.6
Галактонолактондегидрогеназа 1.3.2.3
L-галактоно-γ-лактон:цитохром *c* — оксидоредуктаза 1.3.2.3
Галактуронокиназа 2.7.1.b
Галоидалкил — галоидгидролаза 3.8.1.1
Гастрицин 3.4.4.a
ГДФ:D-маннозо-1-фосфат — гуанилилтрансфераза 2.7.7.e
ГДФ-маннозофосфорилаза 2.7.7.e
D-гексоза: O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.5
Гексозодифосфатаза 3.1.3.11
Гексозооксидаза 1.1.3.5
Гексозофосфат-аминотрансфераза 2.6.1.16
Гексозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.12
Гексокиназа 2.7.1.1
Гентизат-оксигеназа 1.99.2.4
Гепариназа 3.2.1.19
Гепарин — гликаногидролаза 3.2.1.19
Гиалуронат — гликаногидролаза 3.2.1.d и e
Гиалуронат — лиаза 4.2.99.1
Гиалуронат-лиаза 4.2.99.1
Гиалуронидаза 3.2.1.d и e
Гидантоиназа 3.5.2.2
Гидрогеназа 1.98.1.1
Гидроксиламинредуктаза 1.7.99.1
Гидролаза арилэфиров 3.1.1.2
Гидролаза стероловых эфиров 3.1.1.13
Гидролаза уксусных эфиров 3.1.1.6
Гидролаза эфиров глицерина 3.1.1.3
Гидролаза эфиров карбоновых кислот 3.1.1.1
Гидро-лиаза 2,3-диоксикислот 4.2.1.9
Гидро-лиаза полуальдегида малоновой кислоты 4.2.1.c
Гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.8
Гипонитритредуктаза 1.6.6.6
Гиппуриказа 3.5.1.b
Гистаминаза 1.4.3.6
Гистамин-метилтрансфераза 2.1.1.c
L-гистидин:β-аланин — лигаза (АМФ) 6.3.2.a
Гистидин — аммиак-лиаза 4.3.1.3
L-гистидин — аммиак-лиаза 4.3.1.3
Гистидин-α-дезаминаза 4.3.1.3
Гистидиндекарбоксилаза 4.1.1.22
L-гистидин — карбокси-лиаза 4.1.1.22
Гистидинолдегидрогеназа 1.1.1.23
L-гистидинол:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.23
Гистидинолфосфатаза 3.1.3.15
Гистидинолфосфат-аминотрансфераза 2.6.1.9
L-гистидинолфосфат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.9
L-гистидинолфосфат — фосфогидролаза 3.1.3.15
Гликоген-УДФ — глюкозилтрансфераза 2.4.1.11
Гликолат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.26
Гликолатоксидаза 1.1.3.1
Гликолат:O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.1
Гликольальдегидтрансфераза 2.2.1.1
Гликосульфатаза 3.1.6.3
Гликоциаминаза 3.5.3.2
Глиоксилаза I 4.4.1.5
Глиоксилатдегидрогеназа 1.2.1.c
Глиоксилат:НАДФ — оксидоредуктаза (ацилирующая КоА) 1.2.1.c
Глиоксилатредуктаза 1.1.1.26
Глиоксилаттрансацетаза 4.1.3.2
Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа 1.2.1.9
1.2.1.12
1.2.1.13
D-глицеральдегид-3-фосфат — кетол-изомераза 5.3.1.1
D-глицеральдегид-3-фосфат: НАД — оксидоредуктаза (фосфорилирующая) 1.2.1.12

D-глицеральдегид-3-фосфат: НАДФ — оксидоредуктаза 1.2.1.9
D-глицеральдегид-3-фосфат: НАДФ — оксидоредуктаза (фосфорилирующая) 1.2.1.13
Глицератдегидрогеназа 1.1.1.29
Глицераткиназа 2.7.1.31
D-глицерат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.29
D-глицерат:НАД(Ф) — оксидоредуктаза 1.1.1.g
Глицератфосфомутаза 2.7.5.3
L-3-глицерилфосфорилхолин — глицерофосфогидролаза 3.1.4.2
Глицеролдегидрогеназа 1.1.1.6
Глицеролкиназа 2.7.1.30
Глицерол:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.6
Глицеролфосфатаза 3.1.3.b
L-глицерол-3-фосфат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.8
L-глицерол-3-фосфат:цитохром-*c* — оксидоредуктаза 1.1.2.1
Глицерофосфат-ацилтрансфераза 2.3.1.15
Глицерофосфатдегидрогеназа 1.1.1.8
1.1.2.1
Глицерофосфорилхолин-диэстераза 3.1.4.2
Глицилглицин — гидролаза 3.4.3.1
Глицилглицин-дипептидаза 3.4.3.1
Глицил-L-лейцин — гидролаза 3.4.3.2
Глициллейцин-дипептидаза 3.4.3.2
Глицин-амидинотрансфераза 2.6.2.1
Глицин-аминотрансфераза 2.6.1.4
Глицин-ацилтрансфераза 2.3.1.13
Глицин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.4
Глицин-формиминотрансфераза 2.1.2.4
L-глутамат:аммиак — лигаза (АДФ) 6.3.1.2
Глутаматдегидрогеназа 1.4.1.2
1.4.1.3
1.4.1.4
Глутаматдекарбоксилаза 4.1.1.15
L-глутамат — 1-карбоксилиаза 4.1.1.15
L-глутамат:НАД — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.4.1.2
L-глутамат:НАД(Ф) — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.4.1.3
L-глутамат:НАДФ — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.4.1.4
Глутаматрацемаза 5.1.1.3
Глутамат-формиминотрансфераза 2.1.2.5
L-глутамат:L-цистеин — γ-лигаза (АДФ) 6.3.2.2
D-глутамилтрансфераза 2.3.2.1
γ-L-глутамил-L-цистеин:глицин — лигаза (АДФ) 6.3.2.3
γ-Глутамилцистеин-синтетаза 6.3.2.2
Глутаминаза 3.5.1.2
L-глутамин — амидогидролаза 3.5.1.2
Глутамин:D-глутамил — глутамилтрансфераза 2.3.2.1
Глутамин-кетокислотная аминотрансфераза 2.6.1.15
L-глутамин:2-оксокислота — аминотрансфераза 2.6.1.15
Глутаминсинтетаза 6.3.1.2
Глутамин-фенилацетилтрансфераза 2.3.1.14
Глутамин-фруктозо-6-фосфат — аминотрансфераза 2.6.1.16
L-глутамин:D-фруктозо-6-фосфат — аминотрансфераза 2.6.1.16
Глутарат:КоА — лигаза (АДФ) 6.2.1.6
Глутарил-КоА — синтетаза 6.2.1.6
Глутатион: гомоцистин — оксидоредуктаза 1.8.4.1
Глутатион-гомоцистин-трансгидрогеназа 1.8.4.1
Глутатион:дегидроаскорбат — оксидоредуктаза 1.8.5.1
Глутатиондегидрогеназа 1.8.5.1
Глутатионпероксидаза 1.11.1.a
Глутатион:полиолнитрат — оксидоредуктаза 1.8.6.1
Глутатионредуктаза 1.6.4.2
Глутатионсинтетаза 6.3.2.3
Глутатион-тиоластераза 3.1.2.7
Глутатион:H_2O_2 — оксидоредуктоза 1.11.1.a
α-Глюкан-ветвящая гликозилтрансфераза 2.4.1.18
α-1,4-глюкан — 4-гликозилтрансфераза (циклизующая) 2.4.1.19
α-1,4-глюкан:α-1,4-глюкан — 4-гликозилтрансфераза 2.4.1.f
α-1,4-глюкан:α-1,4-глюкан — 6-гликозилтрансфераза 2.4.1.18
α-1,4-глюкан — 4-глюканогидролаза 3.2.1.1
α-1,6-глюкан — 6-глюканогидролаза 3.2.1.11
β-1,3(4)-глюкан — глюканогидролаза 3.2.1.6
β-1,4-глюкан — 4-глюканогидролаза 3.2.1.4
α-1,4-глюкан — глюкогидролаза 3.2.1.3

α-1,4-глюкан:D-глюкоза — 4-глюкозилтрансфераза 2.4.1.3
α-1,4-глюкан — мальтогидролаза 3.2.1.2
α-1,4-глюкан:α-1,4-олигоглюкан — 6-гликозилтрансфераза 2.4.1.e
α-1,4-глюкан:ортофосфат — глюкозилтрансфераза 2.4.1.1
β-Глюкан-УДФ — глюкозилтрансфераза 2.4.1.12
α-Глюканфосфорилаза 2.4.1.1
α-1,4-глюкан:D-фруктоза — 2-глюкозилтрансфераза 2.4.1.4
α-1,6-глюкан:D-фруктоза — 2-глюкозилтрансфераза 2.4.1.5
Глюкоамилаза 3.2.1.3
Глюкозамин-ацетилтрансфераза 2.3.1.3
Глюкозаминкиназа 2.7.1.8
Глюкозаминфосфат-ацетилтрансфераза 2.3.1.4
Глюкозаминфосфат-изомераза 5.3.1.10
β-D-глюкоза:НАД(Ф) — оксидоредуктаза 1.1.1.47
β-D-глюкоза:O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.4
α-Глюкозидаза 3.2.1.20
α-1,3-глюкозидаза 3.2.1.27
β-Глюкозидаза 3.2.1.21
α-D-глюкозид — глюкогидролаза 3.2.1.20
β-D-глюкозид — глюкогидролаза 3.2.1.21
Глюкозодегидрогеназа 1.1.1.47
Глюкозооксидаза 1.1.3.4
Глюкозо-1-фосфатаза 3.1.3.10
Глюкозо-6-фосфатаза 3.1.3.9
Глюкозофосфат-изомераза 5.3.1.9
D-глюкозо-1-фосфат:D-глюкозо-1-фосфат — 6-фосфотрансфераза 2.7.1.41
α-D-глюкозо-1,6-дифосфат:α-D-глюкозо-1-фосфат — фосфотрансфераза 2.7.5.1
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа 1.1.1.49
D-глюкозо-6-фосфат — кетол-изомераза 5.3.1.9
D-глюкозо-6-фосфат:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.49
D-глюкозо-1-фосфат:рибофлавин — 5′-фосфотрансфераза 2.7.1.42
Глюкозо-1-фосфат — тимидилилтрансфераза 2.7.7.g
Глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.9
D-глюкозо-6-фосфат — фосфогидролаза 3.1.3.9
D-глюкозо-1-фосфат — фосфогидролаза 3.1.3.10
Глюкозо-1-фосфат-фосфодисмутаза 2.7.1.41
Глюкозофосфомутаза 2.7.5.1
Глюкокиназа 2.7.1.2
D-глюконат:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.1.99.3
Глюконатдегидрогеназа 1.1.99.3
Глюконокиназа 2.7.1.12
Глюконолактоназа 3.1.1.17
D-глюконо-δ-лактон — гидролаза 3.1.1.17
Глюкуронат-изомераза 5.3.1.12
D-глюкуронат — кетол-изомераза 5.3.1.12
Глюкуронатредуктаза 1.1.1.19
β-Глюкуронидаза 3.2.1.31
β-D-глюкуронид — глюкуроногидролаза 3.2.1.31
Глюкуронокиназа 2.7.1.a
D-глюкуроно-δ-лактон — гидролаза 3.1.1.19
Глюкуронолактонредуктаза 1.1.1.20
ГМФ-редуктаза 1.6.6.a
ГМФ-синтетаза 6.3.4.1; 6.3.5.2
Гомогентизат-оксигеназа 1.99.2.5
L-гомосерин — гидро-лиаза (дезаминирующая) 4.2.1.15
Гомосериндегидратаза 4.2.1.15
Гомосериндегидрогеназа 1.1.1.3
Гомосеринкиназа 2.7.1.39
L-гомосерин:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.3
Гомоцистеин-десульфгидраза 4.4.1.2
Гомоцистеин-метилтрансфераза 2.1.1.e
L-гомоцистеин — сероводород-лиаза (дезаминирующая) 4.4.1.2
ГТФ-аденилаткиназа 2.7.4.d
ГТФ:АМФ — фосфотрансфераза 2.7.4.d
ГТФ:α-D-маннозо-1-фосфат — гуанилилтрансфераза 2.7.7.13
ГТФ:оксалоацетат — карбоксилиаза (трансфосфорилирующая) 4.1.1.32
Гуаназа 3.5.4.3
Гуанидинацетаткиназа 2.7.3.1
Гуанидинацетат-метилтрансфераза 2.1.1.2
Гуанидинацетат — уреогидролаза 3.5.3.2
Гуанилаткиназа 2.7.4.b
Гуанин — аминогидролаза 3.5.4.3

Гуаниндезаминаза 3.5.4.3
Гуанозин:ортофосфат — рибозилтрансфераза 2.4.2.a
Гуанозинфосфорилаза 2.4.2.a
L-гулонатдегидрогеназа 1.1.1.45
L-гулонат:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.19
D-(или L-)гулоно-γ-лактон — гидролаза 3.1.1.18
L-гулоно-γ-лактон:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.20
L-гулонолактоноксидаза 1.1.3.b
L-гулоно-γ-лактон:O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.b
ДДТ-дехлоргидраза 4.5.1.1
Дегидратаза диоксикислот 4.2.1.9
Дегидратаза полуальдегида малоновой кислоты 4.2.1.c
Дегидрогеназа L-аминокислот 1.4.1.5
Дегидрогеназа D-2-оксикислот 1.1.99.a
Дегидрогеназа 3-оксикислот 1.1.1.45
Дегидрогеназа полуальдегида аспарагиновой кислоты 1.2.1.11
Дегидрогеназа полуальдегида глутаровой кислоты 1.2.1.f
Дегидрогеназа полуальдегида малоновой кислоты 1.2.1.a
1.2.1.d
Дегидрогеназа полуальдегида янтарной кислоты 1.2.1.b
5-дегидрохинат — гидро-лиаза 4.2.1.10
5-дегидрохинат-дегидратаза 4.2.1.10
Дезамидо-НАД:L-глутамин — амидо-лигаза (АМФ) 6.3.5.1
Дезамидо-НАД-пирофосфорилаза 2.7.7.a
Дезокси-ГТФ-аза 3.1.5.1
Дезокси-ГТФ — трифосфогидролаза 3.1.5.1
Дезоксинуклеозидтрифосфат: ДНК — дезоксинуклеотидилтрансфераза 2.7.7.7
Дезоксирибоальдолаза 4.1.2.4
2-дезокси-D-рибозо-5-фосфат — ацетальдегид-лиаза 4.1.2.4
Дезоксирибонуклеаза 3.1.4.5
Дезоксирибонуклеаза II 3.1.4.6
Дезокси-ТТФ:α-D-глюкозо-1-фосфат — тимидилилтрансфераза 2.7.7.g
Дезоксирибонуклеат — олигонуклеотидогидролаза 3.1.4.5
Дезоксирибонуклеат — 3'-нуклеотидогидролаза 3.1.4.6
Дезоксицитидилаткиназа 2.7.4.5
Дезокси-ЦМФ — аминогидролаза 3.5.4.b
Дезокси-ЦМФ-дезаминаза 3.5.4.b
Дезокси-ЦТФ — нуклеотидогидролаза 3.6.1.b
Дезокси-ЦТФ-аза 3.6.1.b
Декстраназа 3.2.1.11
Декстрансахараза 2.4.1.5
Декстрин:α-1,6-глюкан — 6-глюкозилтрансфераза 2.4.1.2
Декстрин — 6-глюканогидролаза 3.2.1.b
Декстрин-1,6-глюкозидаза 3.2.1.b
Декстрин-гликоазилтрансфераза 2.4.1.f
Декстрин — 6-глюкозилтрансфераза 2.4.1.2
Дефосфо-КоА-киназа 2.7.1.24
Дефосфо-КоА-пирофосфорилаза 2.7.7.3
2,5-диаминовалерат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.8
Диаминоксидаза 1.4.3.6
Диамин:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.4.3.6
Диаминопимелатдекарбоксилаза 4.1.1.20
Диаминопимелат-эпимераза 5.1.1.7
2,6-LL-диаминопимелат — 2-эпимераза 5.1.1.7
Диафораза 1.6.4.3
4,5-α-дигидрокортизон:НАДФ — Δ^4-оксидоредуктаза 1.3.1.a
4,5-β-дигидрокортизон: НАДФ — Δ^4-оксидоредуктаза 1.3.1.3
20-дигидрокортизон:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.53
Дигидрооротаза 3.5.2.3
L-4,5-дигидрооротат — амидогидролаза 3.5.2.3
Дигидрооротатдегидрогеназа 1.3.3.1
L-4,5-дигидрооротат:O_2 — оксидоредуктаза 1.3.3.1
Дигидропиримидиназа 3.5.2.2
4,5-дигидропиримидин — амидогидролаза 3.5.2.2
Дигидроурацилдегидрогеназа 1.3.1.1
1.3.1.2
4,5-дигидроурацил:НАД — оксидоредуктаза 1.3.1.1
4,5-дигидроурацил:НАДФ — оксидоредуктаза 1.3.1.2
Дигидрофолатдегидрогеназа 1.5.1.4
7,8-дигидрофолат:НАДФ — оксидоредуктаза 1.5.1.4
Диглицерид-ацилтрансфераза 2.3.1.d
Диизопропилфторфосфат — фторгидролаза 3.8.2.1
Диметилаллилпирофосфат: изопентенилпирофосфат — диметилаллилтрансфераза 2.5.1.1

Диметилаллилтрансфераза 2.5.1.1
Диметилпропиотетин-детиометилаза 4.4.1.3
S-диметил-β-пропиотетин — диметилсульфид-лиаза 4.4.1.3
Диметилтетин-гомоцистеинметилтрансфераза 2.1.1.3
Диметилтетин:L-гомоцистеин — S-метилтрансфераза 2.1.1.3
Динуклеотид — нуклеотидогидролаза 3.6.1.9
Диоксиацетонтрансфераза 2.2.1.2
3,4-диокси-L-фенилаланин — карбокси-лиаза 4.1.1.26
Дисахарид — глюкозилтрансфераза (неспецифическая) 2.4.1.7
Диспропорционирующий фермент 2.4.1.f
n-Дифенолоксидаза 1.10.3.2
o-Дифенол:O_2 — оксидоредуктаза 1.10.3.1
n-Дифенол:O_2 — оксидоредуктаза 1.10.3.2
Дифосфоглицератфосфатаза 3.1.3.13
2,3-дифосфо-D-глицерат — 2-фосфогидролаза 3.1.3.13
2,3-дифосфо-D-глицерат:2-фосфо-D-глицерат — фосфотрансфераза 2.7.5.3
1,3-дифосфо-D-глицериновая кислота:3-фосфо-D-глицерат — фосфотрансфераза 2.7.5.4
Дифосфоглицеромутаза 2.7.5.4
ДНК-нуклеотидилтрансфераза 2.7.7.7
Донор:H_2O_2 — оксидоредуктаза 1.11.1.7
ДОПА-декарбоксилаза 4.1.1.26
Дрожжевая карбоксипептидаза 3.4.2.3
ДФФ-аза 3.8.2.1
Еноил-КоА — гидратаза 4.2.1.17
Енолаза 4.2.1.11
L-идитолдегидрогеназа 1.1.1.14
D-идитолдегидрогеназа 1.1.1.15
D-идитол:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.15
L-идитол:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.14
Изолейцил-*s*-РНК — синтетаза 6.1.1.5
L-изолейцин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.5
Изопентенилпирофосфат-изомераза 5.3.3.2
Изопентенилпирофосфат — Δ^3-Δ^2-изомераза 5.3.3.2
Изоцитратдегидрогеназа 1.1.1.41
Изоцитратдегидрогеназа 1.1.1.42
L_s-изоцитрат — глиоксилат-лиаза 4.1.3.1
Изоцитрат-лиаза 4.1.3.1
L_s-изоцитрат:НАД — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая) 1.1.1.41
L_s-изоцитрат:НАДФ — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая) 1.1.1.42
Имидазол-ацетилтрансфераза 2.3.1.2
Имидазолглицерофосфат-дегидратаза 4.2.1.19
Имидазолонпропионаза 3.5.2.a
4-имидазолон-5-пропионат — амидогидролаза 3.5.2.a
Имидодипептидаза 3.4.3.7
Иминодипептидаза 3.4.3.6
ИМФ:L-аспартат — лигаза (ГДФ) 6.3.4.4
ИМФ — 1,2-гидролаза (дециклизующая) 3.5.4.10
ИМФ-дегидрогеназа 1.2.1.14
ИМФ:НАД — оксидоредуктаза 1.2.1.14
ИМФ:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.8
ИМФ-пирофосфорилаза 2.4.2.8
ИМФ-циклогидролаза 3.5.4.10
Инвертаза 3.2.1.26
Индолглицерофосфат-альдолаза 4.1.2.8
Индол-3-глицерофосфат — D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза 4.1.2.8
Иназиназа 3.2.2.2
Инозин — рибогидролаза 3.2.2.2
Инозитолдегидрогеназа 1.1.1.18
Инулаза 3.2.1.7
Инулин — 1-фруктаногидролаза 3.2.1.7
Инулосахараза 2.4.1.9
Иодид:H_2O_2 — оксидоредуктаза 1.11.1.8
Иодиназа 1.11.1.8
Истинная холинэстераза 3.1.1.7
Карбаматкиназа 2.7.2.a
2.7.2.2
Карбамид — амидогидролаза 3.5.1.5
N-карбамоил-β-аланин — амидогидролаза 3.5.1.6
N-карбамоил-L-аспартат — амидогидролаза 3.5.1.7
Карбамоиласпартат-декарбоксилаза 4.1.1.13
N-карбамоил-L-аспартат — 1-карбокси-лиаза 4.1.1.13
Карбамоилфосфат:L-аспартат — карбамоилтрансфераза 2.1.3.2
Карбамоилфосфат:L-орнитин — карбамоилтрансфераза 2.1.3.3

Карбоангидраза 4.2.1.1
α-Карбокиназа
Карбокси-лиаза 2-оксокислот 4.1.1.1
Карбоксилэстераза 3.1.1.1
Карбоксиметилгидантоиназа 3.5.2.4
L-5-карбоксиметилгидантоин — амидогидролаза 3.5.2.4
4-карбоксиметил-4-оксизокротонолактоназа 3.1.1.16
4-карбоксиметил-4-оксизокротонолактон — гидролаза 3.1.1.16
4-карбоксиметил-4-оксизокротонолактон — лиаза (дециклизующая) 5.5.1.1
Карбоксипептидаза A 3.4.2.1
Карбоксипептидаза B 3.4.2.2
Карбонат — гидро-лиаза 4.2.1.1
Карбонатдегидратаза 4.2.1.1
Карнитин-ацетилтрансфераза 2.3.1.7
Карнозиназа 3.4.3.3
Карнозинсинтетаза 6.3.2.a
Каталаза 1.11.1.6
Катепсин C 3.4.4.9
Катепсин D 3.4.4.b
Катехол-метилтрансфераза 2.1.1.a
Катехол-1,2-оксигеназа 1.99.2.2
Катехол-2,3-оксигеназа 1.99.2.a
Катехолоксидаза 1.10.3.1
3-кетоацил-КоА-тиолаза 2.3.1.16
Кетогексокиназа 2.7.1.3
Кетозо-1-фосфат — альдегидлиаза 4.1.2.7
Кетопантоальдолаза 4.1.2.a
3-Кетостероид:(акцептор)-Δ^1 — оксидоредуктаза 1.3.99.a
3-Кетостероид:(акцептор)-Δ^4 — оксидоредуктаза 1.3.99.b
3-Кетостероид-Δ^1-дегидрогеназа 1.3.99.a
3-Кетостероид-Δ^4-дегидрогеназа 1.3.99.b
3-Кетостероид — Δ^4-Δ^5-изомераза 5.3.3.1
Кетотетрозоальдолаза 4.1.2.2
Киназа фосфорилазы 2.7.1.38
Кинуренин-аминотрансфераза 2.6.1.7
Кинуренин-3-гидроксилаза 1.99.1.5
L-кинуренин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.7
Кислая фосфатаза 3.1.3.2
Кислота:КоА — лигаза (АМФ) 6.2.1.2
6.2.1.3
Клостридиопептидаза A 3.4.4.19
Клостридиопептидаза B 3.4.4.20
КоА-трансфераза 3-кетокислот 2.8.3.5
Коллагеназа 3.4.4.19
Кортизон-β-редуктаза 1.3.1.3
Кортизон-α-редуктаза 1.3.1.4
Кортизонредуктаза 1.1.1.53
Креатиназа 3.5.3.3
Креатинин — уреогидролаза 3.5.3.3
Креатинкиназа 2.7.3.2
Кротоназа 4.2.1.17
Ксантиноксидаза 1.2.3.2
Ксантин:O_2 — оксидоредуктаза 1.2.3.2
Ксантозин-5′-фосфат:аммиак — лигаза (АМФ) 6.3.4.1
Ксантозин-5′-фосфат:L-глутамин — амидо-лигаза (АМФ) 6.3.5.2
Ксиланаза 3.2.1.8
1,3-Ксиланаза 3.2.1.a
Ксилан — 3-ксиланогидролаза 3.2.1.a
Ксилан—4-ксиланогидролаза 3.2.1.8
Ксилитол:НАД — оксидоредуктаза (образующая D-ксилулозу) 1.1.1.9
Ксилитол:НАДФ — оксидоредуктаза (образующая L-ксилулозу) 1.1.1.10
Ксилобиаза 3.2.1.f
β-Ксилозидаза 3.2.1.f
β-D-Ксилозид — ксилогидролаза 3.2.1.f
Ксилозоизомераза 5.3.1.5
D-ксилозо — кетол-изомераза 5.3.1.5
Ксилозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.11
D-ксилулозоредуктаза 1.1.1.9
L-ксилулозоредуктаза 1.1.1.10
D-ксилулозо-5-фосфат — D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза (ацетилирующая фосфат) 4.1.2.9
Ксилулокиназа 2.7.1.17
Лактальдегидредуктаза 1.1.1.b
Лактатдегидрогеназа 1.1.2.3
1.1.1.27
D-лактатдегидрогеназа 1.1.2.4
1.1.1.28
D-лактат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.28
L-лактат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.27
Лактатоксидаза 1.1.3.2
L-лактат:O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.2
Лактатрацемаза 5.1.2.1
D-Лактат:цитохром-*c* — оксидоредуктаза 1.1.2.4
L-лактат:цитохром-*c* — оксидоредуктаза 1.1.2.3

Лактоилглутатион-лиаза 4.4.1.5
S-лактоилглутатион — метилглиоксаль-лиаза (изомеризующая) 4.4.1.5
Ламинариназа 3.2.1.6
Левансахараза 2.4.1.10
Лейцил-*s*-РНК — синтетаза 6.1.1.4
Лейцинаминопептидаза 3.4.1.1
Лейцин-аминотрансфераза 2.6.1.6
L-лейцин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.6
L-лейцин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.4
Лизил-*s*-РНК — синтетаза 6.1.1.6
Лизиндекарбоксилаза 4.1.1.18
L-лизин — карбокси-лиаза 4.1.1.18
Лизинрацемаза 5.1.1.5
L-лизин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.6
Лизолецитин — ацилгидролаза 3.1.1.5
Лизолецитин-ацилмутаза 5.4.1.1
Лизолецитин — 2,3-ацилмутаза 5.4.1.1
Лизолецитин-миграта за 5.4.1.1
Лизофосфолипаза 3.1.1.5
Лизоцим 3.2.1.17
Липаза 3.1.1.3
Липоамиддегидрогеназа 1.6.4.3
Липоат-ацетилтрансфераза 2.3.1.12
Липоксигеназа 1.99.2.1
Липоксидаза 1.99.2.1
Ломбрицинкиназа 2.7.3.b
Малатдегидрогеназа 1.1.1.37
Малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) 1.1.1.38; 1.1.1.39
Малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) 1.1.1.40
L-малат — гидро-лиаза 4.2.1.2
L-малат — глиоксилат-лиаза (ацетилирующая КоА) 4.1.3.2
L-малат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.37
L-малат:НАД — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая) 1.1.1.38; 1.1.1.39
L-малат:НАДФ — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая) 1.1.1.40
Малатоксидаза 1.1.3.3
L-малат:O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.3
Малат-синтаза 4.1.3.2
Малеилацетоацетат-изомераза 5.2.1.2
4-малеилацетоацетат — *цис-транс*-изомераза 5.2.1.2
Малеилпируват-изомераза 5.2.1.a
3-Малеилпируват — цис-транс-изомераза 5.2.1.a
Малеинат-изомераза 5.2.1.1
Малеинат — *цис-транс*-изомераза 5.2.1.1
«Малик-фермент» 1.1.1.38
Малонат — КоА-трансфераза 2.8.3.3
Малонил-КоА — декарбоксилаза 4.1.1.9
Малонил-КоА — карбокси-лиаза 4.1.1.9
Мальтоза:D-глюкоза — 3-глюкозилтрансфераза 2.4.1.6
Мальтоза:ортофосфат — глюкозилтрансфераза 2.4.1.8
Мальтозо — 3-глюкозилтрансфераза 2.4.1.6
Мальтозо — 4-глюкозилтрансфераза 2.4.1.3
Мальтозофосфорилаза 2.4.1.8
Манделатрацемаза 5.1.2.2
Манделонитрил — бензальдегид-лиаза 4.1.2.10
Маннитолдегидрогеназа 1.1.2.2
Маннитол-1-фосфат-дегидрогеназа 1.1.1.17
D-маннитол-1-фосфат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.17
D-маннитол:цитохром — оксидоредуктаза 1.1.2.2
α-Маннозидаза 3.2.1.24
β-Маннозидаза 3.2.1.25
α-D-маннозид — манногидролаза 3.2.1.24
β-D-маннозид — манногидролаза 3.2.1.25
Маннозоизомераза 5.3.1.7
D-маннозо — кетол-изомераза 5.3.1.7
Маннозо-1-фосфат — гуанилилтрансфераза 2.7.7.e 2.7.7.13
Маннозофосфат-изомераза 5.3.1.8
D-маннозо-6-фосфат — кетол-изомераза 5.3.1.8
Маннокиназа 2.7.1.7
D-маннонат — гидро-лиаза 4.2.1.8
Маннонат-дегидратаза 4.2.1.8
D-маннонат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.d
Мевалонаткиназа 2.7.1.36
Мевалонат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.32
Мевалонат:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.33

Мевалонат:НАДФ — оксидоредуктаза (ацилирующая КоА) 1.1.1.34
Мевальдатредуктаза 1.1.1.32
1.1.1.33
Мезо-2,6-диаминопимелат — карбокси-лиаза 4.1.1.20
Менадионредуктаза 1.6.5.2
3-меркаптопируват-сульфидтрансфераза 2.8.1.2
3-меркаптопируват:цианид — сульфидтрансфераза 2.8.1.2
5,10-метенилтетрагидрофолат — 5-гидролаза (дециклизующая) 3.5.4.9
Метенилтетрагидрофолат-циклогидролаза 3.5.4.9
N-метил-L-аминокислота:O_2 — оксидоредуктаза (деметилирующая) 1.5.3.2
2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидинпирофосфат:4-метил-5-(2'-фосфоэтил)-тиазол — 2-метил-4-аминопиримидин-5-метенил-трансфераза 2.5.1.a
Метиласпартат — аммиак-лиаза 4.3.1.2
Метиласпартат-мутаза 5.4.99.1
Метилглутаконил-КоА — гидратаза 4.2.1.18
Метилентетрагидрофолатдегидрогеназа 1.5.1.5
5,10-Метилентетрагидрофолат:НАДФ — оксидоредуктаза 1.5.1.5
Метилкротоноил-КоА — карбоксилаза 6.4.1.4
3-метилкротоноил-КоА:CO_2 — лигаза (АДФ) 6.4.1.4
Метилмалонил-КоА — карбокситрансфераза 2.1.3.1
Метилмалонил-КоА — КоА-карбонилмутаза 5.4.99.2
Метилмалонил-КоА — мутаза 5.4.99.2
Метилмалонил-КоА:пируват — карбоксилтрансфераза 2.1.3.1
Метилмалонил-КоА — рацемаза 5.1.99.a
Метилмалонил-КоА — рацемаза 5.1.99.a
Метилтиофосфоглицератфосфатаза 3.1.3.14
Метилтио-3-фосфо-D-глицерат — фосфогидролаза 3.1.3.14
Метилцистеин-синтаза 4.2.1.23
Метионил-*s*-РНК — синтетаза 6.1.1.10
Метионин-аденозилтрансфераза 2.4.2.13
Метионинрацемаза 5.1.1.2
L-метионин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.10
Мио-инозитол-НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.18
Мио-инозитол-оксигеназа 1.99.2.6
Мио-инозитолгексафосфат — фосфогидролаза 3.1.3.8
Моноаминоксидаза 1.4.3.4
Моноамин:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.4.3.4
Муконат-циклоизомераза 5.5.1.1
Мурамидаза 3.2.1.17
НАД — гликогидролаза 3.2.2.5
НАД-киназа 2.7.1.23
НАД-нуклеозидаза 3.2.2.5
НАД-пероксидаза 1.11.1.1
НАД-пирофосфорилаза 2.7.7.1
НАД-синтетаза 6.3.5.1
НАД·H_2:гипонитрит — оксидоредуктаза 1.6.6.6
НАД·H_2:липоамид — оксидоредуктаза 1.6.4.3
НАД·H_2:нитрат — оксидоредуктаза 1.6.6.1
НАД·H_2-нитратредуктаза 1.6.6.1
НАД·H_2:L-цистин — оксидоредуктаза 1.6.4.1
НАД·H_2:цитохром-b_5 — оксидоредуктаза 1.6.2.2
НАД·H_2:цитохром-*c* — оксидоредуктаза 1.6.2.1
НАД·H_2-цитохром-b_5-редуктаза 1.6.2.2
НАД·H_2-цитохром-*c*-редуктаза 1.6.2.1
НАД·H_2:H_2O_2 — оксидоредуктаза 1.11.1.1
НАД(Ф) — гликогидролаза 3.2.2.6
НАД(Ф)-нуклеозидаза 3.2.2.6
НАДФ-пероксидаза 1.11.1.2
НАД(Ф)-трансгидрогеназа 1.6.1.1
НАДФ·H_2:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.6.99.1
НАДФ·H_2:ГМФ — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.6.6.a
НАД(Ф)·H_2:глутатион — оксидоредуктаза 1.6.4.2
НАДФ·H_2-диафораза 1.6.99.1
НАДФ·H_2:диметиламиноазобензол — оксидоредуктаза 1.6.6.7
НАД(Ф)·H_2:2-метил-1,4-нафтохинон — оксидоредуктаза 1.6.5.2
НАДФ·H_2:НАД — оксидоредуктаза 1.6.1.1

НАДФ·H_2:нитрат — оксидоредуктаза 1.6.6.3
НАД(Ф)·H_2:нитрат — оксидоредуктаза 1.6.6.2
НАДФ·H_2-нитратредуктаза 1.6.6.3
НАД(Ф)·H_2:нитрит — оксидоредуктаза 1.6.6.4
НАД(Ф)·H_2:окисленный аскорбат — оксидоредуктаза 1.6.5.4
НАД(Ф)·H_2:убихинон — оксидоредуктаза 1.6.5.3
НАД(Ф)·H_2:хинон — оксидоредуктаза 1.6.5.1
НАДФ·H_2:цитохром-*c* — оксидоредуктаза 1.6.2.3
НАДФ·H_2-цитохром-*c*-редуктаза 1.6.2.3
НАДФ·H_2:H_2O_2 — оксидоредуктаза 1.11.1.2
Нейраминидаза 3.2.1.18
Неорганическая пирофосфатаза 3.6.1.1
Нигероза — 3-глюкогидролаза 3.2.1.27
Никотинамид-метилтрансфераза 2.1.1.1
Никотинамиднуклеотид:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.12
Никотинамид-фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.12
Никотинат-6-гидроксилаза 1.99.1.3
Никотинат-метилтрансфераза 2.1.1.b
Никотинатмононуклеотид-аденилилтрансфераза 2.7.7.a
Никотинатнуклеотид:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.11
Никотинат-фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.11
Нитратредуктаза 1.6.6.2
1.9.6.1
Нитритредуктаза 1.1.99.a
1.6.6.4
Нитроэтаноксидаза 1.7.3.1
Нитроэтан:O_2 — оксидоредуктаза 1.7.3.1
НМН-аденилилтрансфераза 2.7.7.1
НМН-пирофосфорилаза 2.4.2.12
Нотатин 1.1.3.4
Нуклеаза *Azotobacter* 3.1.4.a
Нуклеаза микрококков 3.1.4.7
Нуклеозидаза 3.2.2.1
Нуклеозид-дезоксирибозилтрансфераза 2.4.2.6
Нуклеозиддифосфатаза 3.6.1.6
Нуклеозиддифосфат:полинуклеотид — нуклеотидилтрансфераза 2.7.7.8
Нуклеозиддифосфаткиназа 2.7.4.6
Нуклеозиддифосфат — фосфогидролаза 3.6.1.6
Нуклеозидмонофосфаткиназа 2.7.4.4
Нуклеозид:пурин (пиримидин) — дезоксирибозилтрансфераза 2.4.2.6
Нуклеозид:пурин(пиримидин) — рибозилтрансфераза 2.4.2.5
Нуклеозид-рибозилтрансфераза 2.4.2.5
Нуклеозидтрифосфат:РНК — нуклеотидилтрансфераза 2.7.7.6
3-нуклеотидаза 3.1.3.6
5-нуклеотидаза 3.1.3.5
Нуклеотид-пирофосфатаза 3.6.1.9
H_2O_2:H_2O_2 — оксидоредуктаза 1.11.1.6
H_2S-ацетилтрансфераза 2.3.1.10
H_2S:НАДФ — оксидоредуктаза 1.8.1.2
Окись азота:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.7.99.a
Оксалатдекарбоксилаза 4.1.1.2
Оксалат — карбокси-лиаза 4.1.1.2
Оксалат — КоА-трансфераза 2.8.3.2
Оксалатоксидаза 1.2.3.4
Оксалат:O_2 — оксидоредуктаза 1.2.3.4
Оксалил-КоА — декарбоксилаза 4.1.1.8
Оксалил-КоА — карбокси-лиаза 4.1.1.8
Оксалоацетаза 3.7.1.1
Оксалоацетат — ацетилгидролаза 3.7.1.1
Оксалоацетатдекарбоксилаза 4.1.1.3
Оксалоацетат — карбоксилиаза 4.1.1.3
Оксалоацетат-трансацетаза 4.1.3.7
3-оксиантранилат-оксигеназа 1.99.2.b
Оксиацилглутатион-гидролаза 3.1.2.6
S-2-оксиацилглутатион — гидролаза 3.1.2.6
L-3-оксиацил-КоА — гидролиаза 4.2.1.17
3-оксиацил-КоА — дегидрогеназа 1.1.1.35
L-3-оксиацил-КоА:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.35
D-3-оксиацил-КоА:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.36
3-оксибутиратдегидрогеназа 1.1.1.30
4-оксибутиратдегидрогеназа 1.1.1.h
D-3-оксибутират:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.30
4-оксибутират:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.h
3-оксибутирил-КоА — эпимераза 5.1.2.3
3-оксибутирил-КоА — 3-эпимераза 5.1.2.3
Оксиглутаматдекарбоксилаза 4.1.1.16

3-окси-L-глутамат — 1-карбоксилиаза 4.1.1.16
L-2-оксиглутарат:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.1.99.2
2-оксиглутаратдегидрогеназа 1.1.99.2
Оксидаза D-аминокислот 1.4.3.3
Оксидаза L-аминокислот 1.4.3.2
Оксидаза N-метиламинокислот 1.5.3.2
ω-Оксидеканоат-дегидрогеназа 1.1.1.m
10-оксидеканоат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.m
3-оксиизобутиратдегидрогеназа 1.1.1.31
10-оксидеканоат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.31
3-оксиизобутирил-КоА — гидролаза 3.1.2.4
D-2-оксикислота:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.1.99.a
L-3-оксикислота:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.45
n-Оксиманделонитрил — оксибензальдегид-лиаза 4.1.2.f
3-окси-3-метилглутарил-КоА — ацетоацетат-лиаза 4.1.3.4
3-окси-3-метилглутарил-КоА — ацетоацетил-КоА-лиаза (ацетилирующая КоА) 4.1.3.5
3-окси-3-метилглутарил-КоА— гидролаза 3.1.2.5
Оксиметилглутарил-КоА — гидролаза 3.1.2.5
3-окси-3-метилглутарил-КоА — гидро-лиаза 4.2.1.18
Оксиметилглутарил-КоА — лиаза 4.1.3.4
Оксиметилглутарил-КоА — редуктаза 1.1.1.34
Оксиметилглутарил-КоА — синтаза 4.1.3.5
Оксиметилпиримидинкиназа 2.7.1.g
Оксиминотрансферааа 2.6.3.1
Оксинитрил-лиаза 4.1.2.f
4.1.2.10
Оксипролинэпимераза 5.1.1.a
Оксипролин — 2-эпимераза 5.1.1.a
3-оксипропионатдегидрогеназа 1.1.1.f
3-оксипропионат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.f
3-α-оксистероид-дегидрогеназа 1.1.1.50
β-оксистероид-дегидрогеназа 1.1.1.51
17-β-оксистероид:НАД — 17-β-оксидоредуктаза 1.1.1.j
3-α-оксистероид:НАД(Ф) — оксидоредуктаза 1.1.1.50
3-(или 17)-β-оксистероид: НАД(Ф) — оксидоредуктаза 1.1.1.51
17-β-оксистероид:НАДФ — 17-β-оксидоредуктаза 1.1.1.k
3-β-оксистероид-сульфотрансфераза 2.8.2.2
Окситриптофандекарбоксилаза 4.1.1.28
5-окси-L-триптофан — карбокси-лиаза 4.1.1.28
n-Оксифенилпируват-гидроксилаза 1.99.2.2
α-оксихоланат-дегидрогеназа 1.1.1.52
3-α-оксихоланат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.52
Оксиэтилтиазолкиназа 2.7.1.h
3-оксоадипат — КоА-трансфераза 2.8.3.6
Оксоглутаратдегидрогеназа 1.2.4.2
2-оксоглутарат:липоат — оксидоредуктаза (ацилирующая акцептор) 1.2.4.2
2-оксо-D-глюконат:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.1.99.4
Оксоглюконатдегидрогеназа 1.1.99.4
Оксоглюконокиназа 2.7.7.13
Оксодезоксиглюконокиназа 2.7.1.c
Оксо-L-гулонат — декарбоксилаза 4.1.1.a
3-оксо-L-гулонат — карбоксилиаза 4.1.1.a
Оксооксибутират-альдолаза 4.1.2.1
2-оксо-4-оксибутират — формальдегид-лиаза 4.1.2.1
2-оксопантоат — формальдегид-лиаза 4.1.2.a
Олигоглюкан-ветвящая гликозилтрансфераза 2.4.1.e
Олигодекстрин — 6-глюканогидролаза 3.2.1.10
Олиго-1,6-глюкозидаза 3.2.1.10
Орнитиндекарбоксилаза 4.1.1.17
L-орнитин — карбоксилиаза 4.1.1.17
Орнитин-карбомоилтрансфераза 2.1.3.3
Орнитин-кетокислотная аминотрансферааа 2.6.1.13
L-орнитин:2-оксокислота — аминотрансфераза 2.6.1.13
Оротат-фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.10
Оротидин-5′-фосфат — декарбоксилаза 4.1.1.23
Оротидин-5′-фосфат — карбокси-лиаза 4.1.1.23
Оротидин-5′-фосфат:пирофосфат — *фосфорибозилтрансфераза* 2.4.2.10

Оротидин-5′-фосфат — пирофосфорилаза 2.4.2.10
Ортофосфат:оксалоацетат — карбокси-лиаза (фосфорилирующая) 4.1.1.31
Пальмитат:H_2O_2 — оксидоредуктаза 1.11.1.3
Пальмитоил-КоА — гидролаз 3.1.2.2
Панкреатопептидаза Е 3.4.4.7
Пантетеинкиназа 2.7.1.34
Пантетеинфосфат-аденилилтрансфераза 2.7.7.3
L-пантоат:β-аланин — лигаза (АМФ) 6.3.2.1
Пантотенаткиназа 2.7.1.33
Пантотенатсинтетаза 6.3.2.1
Пантотеноилцистеин-декарбоксилаза 4.1.1.30
N-(L-пантотеноил)-L-цистеин — карбокси-лиаза 4.1.1.30
Папаин 3.4.4.10
Параоксоназа 3.1.1.2
Парапепсин 3.4.4.2
Пектин — пектилгидролаза 3.1.1.11
Пектинэстераза 3.1.1.11
Пенициллиназа 3.5.2.6
Пенициллин-амидаза 3.5.1.11
Пенициллин — амидогидролаза 3.5.2.6
Пентозоальдолаза 4.1.2.3
Пепсин 3.4.4.1
Пепсин В 3.4.4.2
Пероксидаза 1.11.1.7
Пероксидаза жирных кислот 1.11.1.3
Пиридоксалькиназа 2.7.1.35
Пиридоксаминфосфат-оксидаза 1.4.3.5
Пиридоксаминфосфат:O_2 — оксидоредуктаза (дезаминирующая) 1.4.3.5
Пиридоксиндегидрогеназа 1.1.1.1
Пиридоксин:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.1
Пирофосфатаза 3.6.1.a
Пирофосфат:оксалоацетат — карбокси-лиаза (фосфорилирующая) 4.1.1.e
Пирофосфат — фосфогидролаза 3.6.1.a
Пирофосфат — фосфогидролаза 3.6.1.1
Пирофосфомевалонат-декарбоксилаза 4.1.1.33
Пирролин-2-карбоксилат-редуктаза 1.5.1.1
Пирролин-5-карбоксилат-редуктаза 1.5.1.2
Пируватдегидрогеназа 1.2.2.2
1.2.4.1
Пируватдекарбоксилаза 4.1.1.1
Пируваткарбоксилаза 6.4.1.1
Пируваткиназа 2.7.1.40
Пируват:CO_2 — лигаза (АДФ) 6.4.1.1
Пируват:липоат — оксидоредуктаза (ацетилирующая акцептор) 1.2.4.1
Пируватоксидаза 1.2.3.3
Пируват:O_2 — оксидоредуктаза 1.2.3.3
Пируватоксим:ацетон — оксиминотрансфераза 2.6.3.1
Пируват:цитохром-b_1 — оксидоредуктаза 1.2.2.2
Плазмин 3.4.4.14
Полиаденилат-нуклеотидилтрансфераза 2.7.7.b
Полигалактуроназа 3.2.1.15
Полигалактуронид — гликаногидролаза 3.2.1.15
Полинуклеотид-нуклеотидилтрансфераза 2.7.7.8
Полинуклеотидфосфорилаза 2.7.7.8
Полиол-НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.21
Полирибонуклеотид — 2-олигонуклеотидтрансфераза (циклизующая) 2.7.7.b
Полирибонуклеотид — 2-олигонуклеотидтрансфераза (циклизующая) 2.7.7.16
Полифосфатаза 3.6.1.10
Полифосфаткиназа 2.7.4.1
Полифосфат — полифосфогидролаза 3.6.1.10
Полуальдегид глутаровой кислоты: НАД — оксидоредуктаза 1.2.1.f
Полуальдегид малоновой кислоты:НАД(Ф) — оксидоредуктаза 1.2.1.a
Полуальдегид малоновой кислоты:НАД(Ф) — оксидоредуктаза (ацилирующая КоА) 1.2.1.d
Полуальдегид янтарной кислоты:НАД(Ф) — оксидоредуктаза 1.2.1.b
Порфирансульфатаза 2.5.1.c
Порфобилиноген-синтаза 4.2.1.24
Пренилтрансфераза 2.5.1.1
Пролидаза 3.4.3.7
Пролилиминопептидаза 3.4.1.a
L-пролин:НАД(Ф) — 2-оксидоредуктаза 1.5.1.1
L-пролин:НАД(Ф) — 5-оксидоредуктаза 1.5.1.2
Пролинрацемаза 5.1.1.4
D-пролин-редуктаза 1.4.1.6

Пропандиолфосфатдегидрогеназа 1.1.1.7
1,2-пропандиол:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.b
1,2-пропандиол-1-фосфат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.7
Пропионат — КоА-трансфераза 2.8.3.1
Пропионил — КоА-карбоксилаза 6.4.1.3
Пропионил-КоА:CO_2 — лигаза (АДФ) 6.4.1.3
Протаминаза 3.4.2.2
Протеинкиназа 2.7.1.37
Протокатехинат-оксигеназа 1.99.2.3
Псевдохолинэстераза 3.1.1.8
Психозин-УДФ—галактозилтрансфераза 2.4.1.d
Птерин — аминогидролаза 3.5.4.a
Птеридезаминаза 3.5.4.a
Пуриннуклеозид:ортофосфат — рибозилтрансфераза 2.4.2.1
Пуриннуклеозид-фосфорилаза 2.4.2.1
Рамнозоизомераза 5.3.1.b
L-рамноза — кетол-изомераза 5.3.1.b
Рамнулокиназа 2.7.1.5
Редуктаза окиси азота 1.7.99.2
Редуктаза окисленного аскорбата 1.6.5.4
Редуктаза полуальдегида тартроновой кислоты 1.1.1.g
Редуктаза эфиров азотной кислоты 1.8.6.1
Ренин 3.4.4.15
Реннин 3.4.4.3
Ретинен-изомераза 5.2.1.3
Рибитолдегидрогеназа 1.1.1.c
Рибитол:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.c
Рибозиламин-5-фосфат:глицин — лигаза (АДФ) 6.3.1.3
Рибозиламин-5-фосфат:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза (амидирующая глутамат) 2.4.2.14
Рибозилникотинамидкиназа 2.7.1.22
N-рибозилпурин — рибогидролаза 3.2.2.1
Рибозофосфат-изомераза 5.3.1.6
D-рибозо-5-фосфат — кетол-изомераза 5.3.1.6
Рибозофосфат-пирофосфокиназа 2.7.6.1
Рибозо-5-фосфат — формальдегид-лиаза 4.1.2.3
Рибокиназа 2.7.1.15
Рибонуклеаза 2.7.7.h
2.7.7.16
Рибонуклеаза *Aspergillus oryzae* 3.1.4.8
Рибонуклеат — 3′-гуанилогидролаза 3.1.4.8
3′-рибонуклеотид — фосфогидролаза 3.1.3.6
5′-рибонуклеотид — фосфогидролаза 3.1.3.5
Рибофлавиназа 3.5.99.1
Рибофлавин — гидролаза 3.5.99.1
Рибофлавинкиназа 2.7.1.26
Рибофлавинфосфотрансфераза 2.7.1.42
Рибулозодифосфат-карбоксилаза 4.1.1.f
Рибулозофосфат-4-эпимераза 5.1.3.a
D-рибулозо-5-фосфат — 3-эпимераза 5.1.3.1
L-Рибулозо-5-фосфат — 4-эпимераза 5.1.3.a
Рибулозофосфат-3-эпимераза 5.1.3.1
Рибулозофосфат-4-эпимераза 5.1.3.a
Рибулокиназа 2.7.1.16
D-Рибулокиназа 2.7.1.e
РНК-*аденилилтрансфераза* 2.7.7.c
РНК-нуклеотидилтрансфераза 2.7.7.6
РНК-цитидилилтрансфераза 2.7.7.d
Роданеза 2.8.1.1
Саркозиноксидаза 1.5.3.1
Саркозин:O_2 — оксидоредуктаза (деметилирующая) 1.5.3.1
Сахараза 3.2.1.26
Сахарозо-УДФ — глюкозилтрансфераза 2.4.1.13
Сахарозо-глюкозилтрансфераза 2.4.1.4
2.4.1.7
Сахарозо — 6-глюкозилтрансфераза 2.4.1.5
Сахарозофосфат-УДФ — глюкозилтрансфераза 2.4.1.14
Сахарозофосфорилаза 2.4.1.7
Сахарозо — 1-фруктозилтрансфераза 2.4.1.9
Сахарозо — 6-фруктозилтрансфераза 2.4.1.10
D-седогептулозо-7-фосфат:D-глицеральдегид-3-фосфат — гликольальдегидтрансфераза 2.2.1.1
D-седогептулозо-7-фосфат:D-глицеральдегид-3-фосфат — диоксиацетонтрансфераза 2.2.1.2
Седогептулокиназа 2.7.1.14
Серил-*s*-РНК — синтетаза 6.1.1.11
D-серин — гидро-лиаза (дезаминирующая) 4.2.1.14
L-серин — гидро-лиаза (дезаминирующая) 4.2.1.13
L-серин — гидро-лиаза (присоединяющая индол) 4.2.1.20

L-серин — гидро-лиаза (присоединяющая метантиол) 4.2.1.23
L-серин — гидро-лиаза (присоединяющая сероводород) 4.2.1.22
D-сериндегидратаза 4.2.1.14
L-сериндегидратаза 4.2.1.13
Сериндеааминаза 4.2.1.13
Серин-оксиметилтрансфераза 2.1.2.1
L-серин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.11
L-серин:тетрагидрофолат — 5,10-оксиметилтрансфераза 2.1.2.1
Сквален-циклогидроксилаза 1.99.1.13
Спермин:O_2 — оксидоредуктаза (расщепляющая донор) 1.5.3.3
Сперминоксидаза 1.5.3.3
Старый желтый фермент 1.6.99.1
Стероид-2-гидроксилаза 1.99.1.a
Стероид-6-β-гидроксилаза 1.99.1.8
Стероид-11-α-гидроксилаза 1.99.1.6
Стероид-11-β-гидроксилаза 1.99.1.7
Стероид-17-α-гидроксилаза 1.99.1.9
Стероид-19-гидроксилаза 1.99.1.10
Стероид-21-гидроксилаза 1.99.1.11
Стероид-Δ-изомераза 5.3.3.1
Стеролсульфатаза 3.1.6.2
Стеролсульфат — сульфогидролаза 3.1.6.2
Стрептококковая пептидаза А 3.4.4.18
Субтилизин 3.4.4.16
Субтилопептидаза А 3.4.4.16
Сукцинат:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.3.99.1
Сукцинатдегидрогеназа 1.3.99.1
Сукцинат:КоА — лигаза (АДФ) 6.2.1.5
Сукцинат:КоА — лигаза (ГДФ) 6.2.1.4
Сукцинилдиаминопимелат-аминотрансфераза 2.6.1.a
N-Сукцинил-L-2,6-диаминопимелат:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.a
N-Сукцинил-L-2,6-диаминопимелат — амидогидролаза 3.5.1.f
Сукцинилдиаминопимелат — десукцинилаза 3.5.1.f
Сукцинил-КоА — гидролаза 3.1.2.3
Сукцинил-КоА:оксалат — КоА-трансфераза 2.8.3.2
Сукцинил-КоА:3-оксоадипат — КоА-трансфераза 2.8.3.6
Сукцинил:КоА:3-оксокислота — КоА-трансфераза 2.8.3.5
Сукцинил-КоА — синтетаза 6.2.1.4
6.2.1.5
Сульфат-аденилилтрансфераза 2.7.7.4
2.7.7.5
Сульфит:O_2 —оксидоредуктаза 1.8.3.1
Сульфитоксидаза 1.8.3.1
Сульфитредуктаза 1.8.1.2
Сульфогидролаза гликосульфатов 3.1.6.3
Тагатуронатредуктаза 1.1.1.e
Танназа 3.1.1.20
Таннин — ацилгидролаза 3.1.1.20
Тауроциаминкиназа 2.7.3.a
Тестостерон-17-β-дегидрогеназа 1.1.1.j
1.1.1.k
Тетрагидрофолатдегидрогеназа 1.5.1.3
5,6,7,8-тетрагидрофолат: НАДФ — оксидоредуктаза 1.5.1.3
Тиаминаза I 2.5.1.2
Тиаминаза II 3.5.99.2
Тиамин — гидролаза 3.5.99.2
Тиамин:(основание) — 2-метил-4-аминопиримидин-5-метенилтрансфераза 2.5.1.2
Тиамин-пирофосфокиназа 2.7.6.2
Тиаминфосфат-пирофосфорилаза 2.5.1.a
Тимидинкиназа 2.7.1.21
Тимидинмонофосфаткиназа 2.7.4.c
Тимидин:ортофосфат — дезоксирибозилтрансфераза 2.4.2.4
Тимидинфосфорилаза 2.4.2.4
Тиоглюкозид — глюкогидролаза 2.3.3.1
Тиоглюкозидаза 3.2.3.1
Тиол-метилтрансфераза 2.1.1.d
Тиол:O_2 — оксидоредуктаза 1.8.3.2
Тиолоксидаза 1.8.3.2
Тиолтрансацетилаза А 2.3.1.12
Тиосульфат-сульфидтрансфераза 2.8.1.1
Тиосульфат:цианид — сульфидтрансфераза 2.8.1.1
Тиоэтаноламин-ацетилтрансфераза 2.3.1.11
Тираминаза 1.4.3.4
Тирозил-*s*-РНК — синтетаза 6.1.1.1
Тирозин-аминотрансфераза 2.6.1.5
Тирозиндекарбоксилаза 4.1.1.25
L-тирозин — карбокси-лиаза 4.1.1.25
L-тирозин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.5
L-тирозин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.1
β- и γ-Токсины *Clostridium oedematiens* 3.1.4.3
α-Токсин *Clostridium Welchii* 3.1.4.3
Трансальдолаза 2.2.1.2
Транскетолаза 2.2.1.1

Трегалаза 3.2.1.28
Трегалоза — 1-глюкогидролаза 3.2.1.28
Трегалозофосфатаза 3.1.3.12
Трегалозофосфат-УДФ — глюкозилтрансфераза 2.4.1.15
Трегалозо-6-фосфат — фосфогидролаза 3.1.3.12
L-*трео*-3-метиласпартат — аммиак-лиаза 4.3.1.2
L-*трео*-3-метиласпартат — карбокси-аминометилмутаза 5.4.99.1
Треонинальдолаза 4.1.2.5
L-треонин — ацетальдегид-лиаза 4.1.2.5
L-треонин — гидро-лиаза (дезаминирующая) 4.2.1.16
Треониндегидратаза 4.2.1.16
Треонинрацемаза 5.1.1.6
Треонил-*s*-РНК — *синтетаза* 6.1.1.3
L-треонин:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.3
Треонин-синтаза 4.2.99.2
Триметафосфатаза 3.6.1.2
Триметафосфат — фосфогидролаза 3.6.1.2
Триозофосфатдегидрогеназа 1.2.1.9
1.2.1.12
1.2.1.13
Триозофосфат-изомераза 5.3.1.1
Триокиназа 2.7.1.28
Трипсин 3.4.4.4
Триптофан-5-гидроксилаза 1.99.1.4
Триптофандекарбоксилаза 4.1.1.27
L-триптофан:*s*-РНК — лигаза (АМФ) 6.1.1.2
Триптофанил-*s*-РНК — синтетаза 6.1.1.2
L-триптофан — карбокси-лиаза 4.1.1.27
Триптофан-оксигеназа 1.99.2.c
Триптофан-синтаза 4.2.1.20
1,1,1-трихлор-2,2-*бис* — (*п*-хлорфенил)-этан — гидрохлорид-лиаза 4.5.1.1
Тромбин 3.4.4.13
Тропинэстераза 3.1.1.10
Убихинонредуктаза 1.6.5.3
УДФ-арабинозо — 4-эпимераза 5.1.3.b
УДФ-арабинозо-эпимераза 5.1.3.b
УДФ-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкоза:хитин — ацетиламинодезоксиглюкозилтрансфераза 2.4.1.16
УДФ-2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозо — 4-эпимераза 5.1.3.d
УДФ-ацетилглюкозамин-эпимераза 5.1.3.d
УДФ-N-ацетилмурамат:L-аланин — лигаза (АДФ) 6.3.2.b
УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамат:L-лизин — лигаза (АДФ) 6.3.2.7
УДФ-N-ацетилмурамоил-аланил-D-глутамат — синтетаза 6.3.2.c
УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамил-L-лизин:D-аланил-D-аланин — лигаза (АДФ) 6.3.2.d
УДФ-N-ацетилмурамоил-аланил-D-глутамил-лизин-D-аланил-D-аланин — синтетаза 6.3.2.d
УДФ-N-ацетилмурамоил-аланил-D-глутамил-лизин — синтетаза 6.3.2.7
УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланин:D-глутамат — лигаза (АДФ) 6.3.2.c
УДФ-N-ацетилмурамоил-аланин — синтетаза 6.3.2.b
УДФ-галактоза-глюкоза — галактозилтрансфераза 2.4.1.c
УДФ-галактоза:D-глюкоза — 1-галактозилтрансфераза 2.4.1.c
УДФ-галактоза:сфингозин — О-галактозилтрансфераза 2.4.1.d
УДФ-галактоза-сфингозин — галактозилтрансфераза 2.4.1.d
УДФ-глюкозамин-пирофосфорилаза 2.7.7.f
УДФ-глюкоза:α-D-галактозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.12
УДФ-глюкоза-гликоген — глюкозилтрансфераза 2.4.1.11
УДФ-глюкоза:гликоген-α-4-глюкозилтрансфераза 2.4.1.11
УДФ-глюкоза:α-1,4-глюкан — α-4-глюкозилтрансфераза 2.4.1.b
УДФ-глюкоза-β-глюкан — глюкозилтрансфераза 2.4.1.12
УДФ-глюкоза:β-1,4-глюкан — β-4-глюкозилтрансфераза 2.4.1.12
УДФ-глюкоза:ДНК — β-глюкозилтрансфераза 2.4.1.i
УДФ-глюкоза-глюкозофосфат — глюкозилтрансфераза 2.4.1.15
УДФ-глюкоза:D-глюкозо-6-фосфат — 1-глюкозилтрансфераза 2.4.1.15
УДФ-глюкоза:ДНК — α-глюкозилтрансфераза 2.4.1.g

УДФ-глюкоза-ДНК-α — глюкозилтрансфераза 2.4.1.g
УДФ-глюкоза:ДНК — β-глюкозилтрансфераза 2.4.1.h
УДФ-глюкоза-ДНК — β-глюкозилтрансфераза 2.4.1.h 2.4.1.i
УДФ-глюкоза-крахмал — глюкозилтрансфераза 2.4.1.b
УДФ-глюкоза:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.22
УДФ-глюкоза-фруктоза — глюкозилтрансфераза 2.4.1.13
УДФ-глюкоза:D-фруктоза — 2-глюкозилтрансфераза 2.4.1.13
УДФ-глюкоза-фруктозофосфат — глюкозилтрансфераза 2.4.1.14
УДФ-глюкоза:D-фруктозо-6-фосфат — 2-глюкозилтрансфераза 2.4.1.14
УДФ-глюкоза-целлюлоза — глюкозилтрансфераза 2.4.1.12
УДФ-глюкозо-эпимераза 5.1.3.2
УДФ-глюкозо — 4-эпимераза 5.1.3.2
УДФ-глюкуронат — глюкуронилтрансфераза (неспецифичная к акцептору) 2.4.1.17
УДФ-глюкуронат-декарбоксилаза 4.1.1.b
УДФ-глюкуронат — карбоксилиаза 4.1.1.b
УДФ-глюкуронат-эпимераза 5.1.3.c
УДФ-глюкуронат — 4-эпимераза 5.1.3.c
УДФ-глюкуронилтрансфераза 2.4.1.17
УДФГ-дегидрогеназа 1.1.1.22
УДФГ-пирофосфорилаза 2.7.7.9
УМФ:пирофосфат — фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.9
УМФ-пирофосфорилаза 2.4.2.9
Уратоксидаза 1.7.7.3
Урат:O_2 — оксидоредуктаза 1.7.3.3
Урацил:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.2.99.1
Урацилдегидрогеназа 1.2.99.1
Урацил-фосфорибозилтрансфераза 2.4.2.9
Уреаза 3.5.1.5
β-Уреидопропионаза 3.5.1.6
Уреидосукциназа 3.5.1.7
Уридинкиназа 2.7.1.f
Уридиннуклеозидаза 3.2.2.3
Уридин:ортофосфат — рибозилтрансфераза 2.4.2.3
Уридин — рибогидролаза 3.2.2.3
Уридинфосфорилаза 2.4.2.3
Уронолактоназа 3.1.1.19
Уропорфириноген-декарбоксилаза 4.1.1.d
Уропорфириноген-III — карбокси-лиаза 4.1.1.d
УТФ:аммиак — лигаза (АДФ) 6.3.4.2
УТФ:2-ацетамидо-2-дезокси-α-D-глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.f
УТФ:α-D-галактозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.10
УТФ:α-D-глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.9
УТФ:α-D-ксилозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 2.7.7.11
ФАД-пирофосфорилаза 2.7.7.2
Фактор разветвления 2.4.1.18
Фарнезилпирофосфатсинтетаза 2.5.1.1
Фенилаланин — аммиак-лиаза 4.3.1.a
L-фенилаланин — аммиак-лиаза 4.3.1.a
Фенилаланин-4-гидроксилаза 1.99.1.2
Фенилацетил-КоА:L-глутамин — α-N-фенилацетилтрансфераза 2.3.1.14
Фенилпируват — кетоснол-изомераза 5.3.2.1
Фенилпируват-таутомераза 5.3.2.1
PR-фермент 3.1.3.17
Q-фермент 2.4.1.18
T-фермент 2.4.1.e
Фибринолизин 3.4.4.14
Фитаза 3.1.3.8
Фицин 3.4.4.12
ФМН-аденилилтрансфераза 2.7.7.2
Формальдегиддегидрогеназа 1.2.1.1
Формальдегид:НАД — оксидоредуктаза 1.2.1.1
Формамидаза 3.5.1.9
Формиатдегидрогеназа 1.2.1.2 1.2.2.1
Формиат:НАД — оксидоредуктаза 1.2.1.2
Формиат:тетрагидрофолат — лигаза (АДФ) 6.3.4.3
Формиат:цитохром-b_1 — оксидоредуктаза 1.2.2.1
N-формиласпартат — амидогидролаза 3.5.1.8
Формиласпартат-деформилаза 3.5.1.8
N-формил-L-глутамат:тетрагидрофолат — 5-формилтрансфераза 2.1.2.a
Формилглутамат-формилтрансфераза 2.1.2.a
10-формилтетрагидрофолат — амидогидролаза 3.5.1.10
Формилтетрагидрофолат-деформилаза 3.5.1.10

Формилтетрагидрофолат-синтетаза 6.3.4.3
Формиминоаспартат-дезиминаза 3.5.3.5
N-формимино-L-аспартат — иминогидролаза 3.5.3.5
N-формиминоглицин:тетрагидрофолат — 5-формимино-трансфераза 2.1.2.4
N-формимино-L-глутамат:тетрагидрофолат — 5-формимино-трансфераза 2.1.2.5
5-формиминотетрагидрофолат — аммиак-лиаза (циклизующая) 4.3.1.4
Формиминотетрагидрофолат-циклодезаминаза 4.3.1.4
Фосфатаза фосфорилазы 3.1.3.17
Фосфат-ацетилтрансфераза 2.3.1.8
Фосфат-бутирилтрансфераза 2.3.1.c
Фосфатидатфосфатаза 3.1.3.4
L-α-фосфатидат — фосфогидролаза 3.1.3.4
Фосфатид — ацилгидролаза 3.1.1.4
Фосфатидилхолин — фосфатидогидролаза 3.1.4.4
Фосфатидилхолин — холинфосфогидролаза 3.1.4.3
Фосфоаденилат-3-нуклеотидаза 3.1.3.7
3'-фосфоаденилилсульфат:ариламин — сульфотрансфераза 2.8.2.a
3'-фосфоаденилилсульфат:3-β-оксистероид — сульфотрансфераза 2.8.2.2
3'-фосфоаденилилсульфат:фенол — сульфотрансфераза 2.8.2.1
3'-фосфоаденилилсульфат:хондроитин — сульфотрансфераза 2.8.2.c
3'-фосфоаденилилсульфат:эстрон — сульфотрансфераза 2.8.2.b
Фосфоамидаза 3.9.1.1
Фосфоамид — гидролаза 3.9.1.1
Фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты 3.1.3.1 3.1.3.2
Фосфогидролаза ортофосфорных диэфиров 3.1.4.1
Фосфогидролаза фосфорилазы 3.1.3.17
Фосфогликолат-фосфатаза 3.1.3.a
Фосфогликолат — фосфогидролаза 3.1.3.a
2-фосфо-D-глицерат — гидролиаза 4.2.1.11
3-фосфо-D-глицерат — карбоксилиаза (димеризующая) 4.1.1.f
Фосфоглицераткиназа 2.7.2.3
Фосфоглицерат-фосфомутаза 5.4.2.1
D-фосфоглицерат — 2,3-фосфомутаза 5.4.2.1
2-фосфоглицерол — фосфогидролаза 3.1.3.b
Фосфоглицеромутаза 2.7.5.3
Фосфоглюкокиназа 2.7.1.10
Фосфоглюкомутаза 2.7.5.1
6-фосфо-D-глюконат — гидролиаза 4.2.1.12
Фосфоглюконат-дегидратаза 4.2.1.12
Фосфоглюконатдегидрогеназа 1.1.1.43
Фосфоглюконатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) 1.1.1.44
6-фосфо-D-глюконат:НАД(Ф) — оксидоредуктаза 1.1.1.43
6-фосфо-D-глюконат:НАДФ — оксидоредуктаза (декарбоксилирующая) 1.1.1.44
О-фосфогомосерин — фосфолиаза (присоединяющая H_2O) 4.2.99.2
Фосфодиэстераза 3.1.4.1
Фосфокетолаза 4.1.2.9
Фосфолипаза А 3.1.1.4
Фосфолипаза В 3.1.1.5
Фосфолипаза С 3.1.4.3
Фосфолипаза D 3.1.4.4
Фосфомевалонаткиназа 2.7.4.2
Фосфометилпиримидинкиназа 2.7.4.a
7-фосфо-2-оксо-3-дезокси-D-арабиногептонат — D-эритрозо-4-фосфат-лиаза (фосфорилирующая пируват) 4.1.2.d
Фосфо-2-оксо-3-дезоксигептонатальдолаза 4.1.2.d
6-фосфо-2-оксо-3-дезокси-D-глюконат — D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза 4.1.2.c
Фосфо-2-оксо-3-дезоксиоктонат-альдолаза 4.1.2.e
8-фосфо-2-оксо-3-дезокси-D-октонат — D-арабинозо-5-фосфат-лиаза (фосфорилирующая пируват) 4.1.2.e
Фосфопантотеноилцистеин-декарбоксилаза 4.1.1.c
4'-фосфо-N-(L-пантотеноил)-L-цистеин — карбокси-лиаза 4.1.1.c
Фосфопантотеноилцистеинсинтетаза 6.3.2.5
Фосфопируват-гидратаза 4.2.1.11
Фосфопируваткарбоксилаза 4.1.1.e 4.1.1.31 4.1.1.32

Фосфопротеинфосфатаза 3.1.3.16
Фосфопротеин — фосфогидролаза 3.1.3.16
Фосфорибозил-аминоимидазолкарбоксамид-формилтрансфераза 2.1.2.3
Фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилаза 4.1.1.21
5′-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксилат — карбокси-лиаза 4.1.1.21
Фосфорибозиламиноимидазол-синтетаза 6.3.3.1
Фосфорибозил-аминоимидазолсукцинокарбоксамид — синтетаза 6.3.2.6
Фосфорибозилглицинамид-синтетаза 6.3.1.3
Фосфорибозилглицинамидформилтрансфераза 2.1.2.2
5′-фосфорибозил-4-карбокси-5-аминоимидазол: L-аспартат — лигаза (АДФ) 6.3.2.6
Фосфорибозилпирофосфатамидотрансфераза 2.4.2.14
5′-фосфорибозил-5-формамидо-4-имидазолкарбоксамид:тетрагидрофолат — 10-формилтрансфераза 2.1.2.3
5′-фосфорибозил-формилглицинамид: L-глутамин — амидолигаза (АДФ) 6.3.5.3
Фосфорибозилформилглицинамид-синтетаза 6.3.5.3
5′-фосфорибозил-N-формилглицинамид:тетрагидрофолат — 5,10-формилтрансфераза 2.1.2.2
5′-фосфорибозил-формилглицинамидин — цикло-лигаза (АДФ) 6.3.3.1
Фосфорибокиназа 2.7.1.18
Фосфорибулокиназа 2.7.1.19
Фосфосеринфосфатаза 3.1.3.3
Фосфосерин — фосфогидролаза 3.1.3.3
Фосфофруктокиназа 2.7.1.11
β-1,2-фруктан: D-глюкоза — 1-фруктозилтрансфераза 2.4.1.9
β-2,6-фруктан: D-глюкоза — 6-фруктозилтрансфераза 2.4.1.10
Фруктозодифосфат-альдолаза 4.1.2.b
Фруктозо-1,6-дифосфат — D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза 4.1.2.b
D-фруктозо-1,6-дифосфат — 1-фосфогидролаза 3.1.3.11
Фруктокиназа 2.7.1.4
β-Фруктофуранозидаза 3.2.1.26
Фруктуронатредуктаза 1.1.1.d
β-D-фруктофуранозид — фруктогидролаза 3.2.1.26
Фумараза 4.2.1.2
Фумаратгидратаза 4.2.1.2
Фумарилацетоацетаза 3.7.1.2
4-фумарилацетоацетат — фумарилгидролаза 3.7.1.2
Химопапаин 3.4.4.11
Химотрипсин 3.4.4.5
Химотрипсин B 3.4.4.6
Хинатдегидрогеназа 1.1.1.24
Хинат:НАД — оксидоредуктаза 1.1.1.24
Хинонредуктаза 1.6.5.1
Хитиназа 3.2.1.14
Хитин — гликаногидролаза 2.3.1.14
Хитин-УДФ — ацетилглюкозаминилтрансфераза 2.4.1.16
Хитобиаза 3.2.1.29
Хитобиоза — ацетамидодезоксиглюкогидролаза 3.2.1.29
Хлорофиллаза 3.1.1.14
Хлорофилл — хлорофиллидогидролаза 3.1.1.14
Холат:КоА — лигаза (АМФ) 6.2.1.7
Холестеролоксидаза 1.1.3.6
Холестерол:O_2 — оксидоредуктаза 1.1.3.6
Холестеролэстераза 3.1.1.13
Холин:(акцептор) — оксидоредуктаза 1.1.99.1
Холин-ацетилтрансфераза 2.3.1.6
Холиндегидрогеназа 1.1.99.1
Холинкиназа 2.7.1.32
Холинсульфатаза 3.1.6.a
Холинсульфат — сульфогидролаза 3.1.6.a
Холинфосфат-цитидилилтрансфераза 2.7.7.15
Холинфосфотрансфераза 2.7.8.2
Холинэстераза 3.1.1.8
Холоил-КоА — синтетаза 6.2.1.7
Хондроитиназа 3.2.1.c
Хондроитинсульфат — гликаногидролаза 3.2.1.c
Хондроитинсульфат — сульфогидролаза 3.1.6.4
Хондроитинсульфотрансфераза 2.8.2.c
Хондросульфатаза 3.1.6.4
ЦДФ-холин:1,2-диглицерид — холинфосфотрансфераза 2.7.8.2
ЦДФ-холин:церамид — холинфосфотрансфераза 2.7.8.a

ЦДФ-этаноламин:1,2-диглицерид — этаноламинфосфотрансфераза 2.7.8.1
Целлобиоза:ортофосфат — глюкозилтрансфераза 2.4.1.a
Целлобиозофосфорилаза 2.4.1.a
Целлюлаза 3.2.1.4
Целлюлозо-полисульфатаза 3.1.6.b
Целлюлозосульфат — сульфогидролаза 3.1.6.b
Церамид-холинфосфотрансфераза 2.7.8.a
Циклогексаглюканаза 3.2.1.13
Циклогексаглюкан — 4-глюканогидролаза 3.2.1.13
Циклогексадиендиолдегидрогеназа 1.3.1.b
3,5-циклогексадиен-1,2-диол-: НАДФ — оксидоредуктаза 1.3.1.b
Циклогептаглюканаза 3.2.1.12
Циклогептаглюкан — 4-глюканогидролаза 3.2.1.12
Циклодекстрин-глюкозилтрансфераза 2.4.1.19
Цис-аконитат — карбоксилиаза 4.1.1.6
Цистатионаза 4.2.1.15
Цистатионинсинтетаза 4.2.1.13
Цистеамин:НАД — оксидоредуктаза 1.8.1.1
Цистеаминдегидрогеназа 1.8.1.1
Цистеин-аминотрансфераза 2.6.1.3
Цистеиндесульфгидратаза 4.4.1.1
L-цистеинилглицин — гидролаза 3.4.3.5
Цистеинилглицин-дипептидаза 3.4.3.5
L-цистеин:2-оксоглутарат — аминотрансфераза 2.6.1.3
L-цистеин — сероводород-лиаза (дезаминирующая) 4.4.1.1
Цистеин-синтаза 4.2.1.22
Цистеинсульфинатдекарбоксилаза 4.1.1.29
L-цистеинсульфинат — карбокси-лиаза 4.1.1.29
Цистинредуктаза 1.6.4.1
Цитидин — аминогидролаза 3.5.4.5
Цитидиндезаминаза 3.5.4.5
Цитозин — аминогидролаза 3.5.4.1
Цитозиндезаминаза 3.5.4.1
Цитохром a_3 1.9.3.1
Цитохром CD 1.9.3.a
Цитохром c:H_2O_2 — оксидоредуктаза 1.11.1.5
Цитохром c:O_2 — *оксидоредуктаза* 1.9.3.1
Цитохром (c_4c_5):O_2 — *оксидоредуктаза* 1.9.3.a
Цитохром:нитрат — оксидоредуктаза 1.9.6.1
Цитохромоксидаза 1.9.3.1
Цитохромоксидаза *Pseudomonas* 1.9.3.a
Цитохромпероксидаза 1.11.1.5
Цитрат-дегидратаза 4.2.1.4
Цитрат — гидро-лиаза 4.2.1.4
Цитрат (изоцитрат) — гидролиаза 4.2.1.3
Цитрат-конденсирующий фермент 4.1.3.7
Цитрат-лиаза 4.1.3.6
Цитрат — оксалоацетат-лиаза 4.1.3.6
Цитрат — оксалоацетат-лиаза (ацетилирующая КоА) 4.1.3.7
Цитрат-синтаза 4.1.3.7
L-цитруллин:L-аспартат — лигаза (АМФ) 6.3.4.5
ЦТФ:РНК — цитидилилтрансфераза 2.7.7.d
ЦТФ-синтетаза 6.3.4.2
ЦТФ: холинфосфат — цитидилилтрансфераза 2.7.7.15
ЦТФ:этаноламинфосфат — цитидилилтрансфераза 2.7.7.14
Шикиматдегидрогеназа 1.1.1.25
Шикимат:НАДФ — оксидоредуктаза 1.1.1.25
Щелочная фосфатаза 3.1.3.1
Энолаза, см. Енолаза 3.4.4.8
Энтерокиназа 3.4.4.8
Энтеропептидаза 5.7.1.27
Эритритолкиназа 5.3.1.2
Эритрозоизомераза 5.3.1.2
D-эритрозо — кетол-изомераза 4.2.1.19
D-*эритро*-имидазолглицерофосфат — гидро-лиаза 4.1.2.2
Эритрулозо-1-фосфат — формальдегид-лиаза 3.1.1.6
С-эстераза (животных тканей) 1.1.1.i
Эстрадиол-17-β-дегидрогеназа 1.1.1.i
Эстрадиол:НАД — 17-β-оксидоредуктаза 2.8.2.b
Эстронсульфотрансфераза 2.7.7.14
Этаноламинфосфат-цитидилилтрансфераза 2.7.8.1
Этаноламинфосфотрансфераза

ЛИТЕРАТУРА

1. Abdullah M., Whelan W., Biochem. J., **75**, 12P (1960).
2. Ablondi F. B., Hagan J. J., in The Enzymes, 2nd end., ed. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 175), 1960.
3. Abraham E. P., Robinson R., Nature, Lond., **140**, 24 (1937).
4. Abrams R., Bentley M., Arch. Biochem. Biophys., **79**, 91 (1959).
5. Adams D. H., Biochim. biophys. Acta, **3**, 1 (1949).
6. Adams D. H., Whittaker V. P., Biochim. biophys. Acta, **3**, 358 (1949).
7. Adams D. H., Whittaker V. P., Biochim. biophys. Acta, **4**, 543 (1950).
8. Adams E., J. biol. Chem., **209**, 829 (1954).
9. Adams E., J. biol. Chem., **217**, 325 (1955).
10. Adams E., J. biol. Chem., **234**, 2073 (1959).
11. Adams E., Davis N. C., Smith E. L., J. biol. Chem., **199**, 845 (1952).
12. Adams E., Davis N. C., Smith E. L., J. biol. Chem., **208**, 573 (1954).
13. Adams E., Goldstone A., J. biol. Chem., **235**, 3499 (1960).
14. Adams E., Smith E. L., J. biol. Chem., **198**, 671 (1952).
15. Adams E. Q., J. Amer. chem. Soc., **38**, 1503 (1916).
16. Adams M., Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Amer. chem. Soc., **65**, 1369 (1943).
17. Adler A. J., Kistiakowsky G. B., J. biol. Chem., **236**, 3240 (1961).
18. Adler E., Günther G., Everett J. E., Z. physiol. Chem., **255**, 27 (1938).
19. Adler E., Hellström V., Günther G., von, Euler H., Z. physiol. Chem., **255**, 14 (1938).
20. Adrian E. D., Feldberg W., Kilby B. A., Brit. J. Pharmacol., **2**, 56 (1947).
21. Adrouny G. A., Bloom W. L., Wilhelm A. E., Fed. Proc., **16**, 143 (1957).
22. Agner K., Acta physiol. scand., **2**, Suppl. VIII (1941).
23. Agosin M., Weinbach E. C., Biochim. biophys. Acta, **21**, 117 (1956).
24. Agranoff B. W., Brady R. O., J. biol. Chem., **219**, 221 (1956).
25. Agranoff B. W., Eggerer H., Henning U., Lynen F., J. biol. Chem., **235**, 326 (1960).
26. Ågren G., Acta physiol. scand., **9**, 248, 255, 269 (1945).
27. Akabori S., Ikenaka T., Hagihara B., J. Biochem., Tokyo, **41**, 577 (1954).
28. Akamatsu S., Nishihori O., Enzymologia, **16**, 273 (1954).
29. Albers R. W., Koval G. J., Biochim. biophys. Acta, **52**, 29 (1961).
30. Albert A., Biochem. J., **47**, XXVii (1950).
31. Albert A., Biochem. J., **54**, 646 (1953).
32. Alberty R. A., J. Amer. chem. Soc., **76**, 2494 (1954).
33. Alberty R. A., Advanc. Enzymol., **17**, 1 (1956).
34. Alberty R. A., J. cell. comp. Physiol., **47**, Suppl. 1, 245 (1956).
35. Alberty R. A., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 531), 1961.
36. Alberty R. A., Marvin H. H., J. phys. Chem., **54**, 47 (1950).
37. Alberty R. A., Marvin H. H., J. Amer. chem. Soc., **73**, 3220 (1951).
38. Alberty R. A., Massey V., Biochim. biophys. Acta, **13**, 347 (1954).
39. Alberty R. A., Miller W. G., Fisher H. F., J. Amer. chem. Soc., **79**, 3973 (1957).
40. Alderton G., Ward W. H., Fevold H. L., J. biol. chem., **157**, 43 (1945).
41. Aldridge W. N., Biochem. J., **46**, 451 (1950).
42. Aldridge W. N., Biochem. J., **53**, 110 (1953).
43. Aldridge W. N., Biochem. J., **53**, 117 (1953).
44. Aldridge W. N., Biochem. J., **54**, 442 (1953).
45. Aldridge W. N., Davison A. N., Biochem. J., **52**, 663 (1952).
46. Aldridge W. N., Davison A. N., Biochem. J., **55**, 763 (1953).

47. Aldridge W. N., Johnson M. K., Biochem. J., **73**, 270 (1959).
48. Alexander M., Heppel L. A., Hurwitz J., J. biol. Chem., **236**, 3014 (1961).
49. Algranati I. D., Cabib E., Biochim. biophys. Acta, **43**, 141 (1960).
50. Alivasatos S. G. A., Woolley D. W., J. biol. Chem., **219**, 823 (1956).
51. Allen E. H., Glassman E., Schweet R. S., J. biol. Chem., **235**, 1061 (1960).
52. Allfrey V. G., in The Cell, ed. J. Brachet and A. E., Mirsky (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 193), 1959.
53. Allfrey V. G., Proceedings of the fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, Symp. № 2 (Oxford, Pergamon Press, 1963).
54. Allfrey V.G., Mirsky A. E., Osawa S., J. gen. Physiol., **40**, 451 (1957).
55. Altenbern R. A., Housewright R. D., J. biol. Chem., **204**, 159 (1953).
56. Altschul A.M., Abrams R., Hogness T. R., J. biol. Chem., **136**, 777 (1940).
57. Alvarez E. F., Lora-Tamayo M., Biochem. J., 69, 312 (1958).
58. Ambler R. P., Biochem. J., **82**, 30p (1962).
59. Ambrose J. F., Kistiakowsky G. B., Kridl A. G., J. Amer. chem. Soc., **73**, 1232 (1951).
60. Ames B. N., J. biol. Chem., **226**, 583 (1957).
61. Ames B. N., J. biol. Chem., **228**, 131 (1957).
62. Ames B. N., Garry B., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **45**, 1453 (1959).
63. Ames B. N., Horecker B. L., J. biol. Chem., **220**, 113 (1956).
64. Ammon R., Pflüg. Arch. ges. Physiol., **233**, 486 (1934).
65. Amos H., J. Amer. chem. Soc., **76**, 3858 (1954).
66. Anderson B. M., Ciotti C. J., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **234**, 1219 (1959).
67. Anderson B. M., Cordes E. H., Jencks W. P., J. biol. Chem., **236**, 455 (1961).
68. Anderson B. M., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **234**, 1226 (1959).
69. Anderson D. G., Vennesland B., J. biol. Chem., **207**, 613 (1954).
70. Ando T., Fujioka H., Kawanishi Y., Biochim. biophys. Acta, **34**, 296 (1959).
71. Anet F. A. L., J. Amer. chem. Soc., **82**, 994 (1960).
72. Anfinsen C. B., C. R. Lab. Carlsberg (Sér. Chim.), **30**, 13 (1956).
73. Anfinsen C. B., J. biol. Chem., **221**, 405 (1956).
74. Anfinsen C. B., Proceedings of the fifth International Congress of Biochemistry, Moscow (Oxford, Pergamon Press, 1963).
75. Anfinsen C. B., Aqvist S. E. Q., Cooke J. P., Jonsson B., J. biol. Chem., **234**, 1118 (1959).
76. Anson M. L., J. gen. Physiol., **20**, 663 (1937).
77. Anson M. L., J. Gen. Physiol., **20**, 777 (1937).
78. Anson M. L., J. gen. Physiol., **22**, 79 (1939).
79. Anson M. L., Mirsky A. E., J. gen. Physiol., **17**, 393 (1934).
80. Antia M., Hoare D. S., Work E., Biochem. J., **65**, 448 (1957).
81. Antoni F., Keleti T., Nature, Lond., **179**, 1020 (1957).
82. Appleby C. A., Morton R. K., Biochem. J., **71**, 492 (1959).
83. Appleby C. A., Morton R. K., Biochem. J., **73**, 539 (1959).
84. Appleby C. A., Morton R. K., Simmonds D. H., Biochem. J., **75**, 72 (1960).
85. Archibald R. M., J. biol. Chem., **154**, 657 (1944).
86. Arcus A. C., Edson N. L., Biochem. J., **64**, 385 (1956).
87. Arnon D. I., in Light and Life, ed. W.D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, 1961), p. 489.
88. Aronsson T., Scand. J. clin. lab. Invest., **9**, 95 (1957).
89. Ashby W., J. biol. Chem., **151**, 521 (1943).
90. Ashwell G., Hickman J., J. biol. Chem., **226**, 65 (1957).
91. Ashwell G., Wahba A. J., Hickman J., J. biol. Chem., **235**, 1559 (1960).
92. Askonas B. A., Biochem. J., **48**, 42 (1951).
93. Askonas B. A., Thesis for Ph. D. Degree, University of Cambridge (1952).
94. Asnis R. E., Brodie A. F., J. biol. Chem., **203**, 153 (1953).
95. Atkinson M. R., Jackson J. F., Morton R. K., Biochem. J., **80**, 318 (1961).
96. Auerbach V. H., Waisman H. A., Wyckoff L. B., Nature, Lond., **182**, 871 (1958).
97. Augustinsson K.-B., Acta physiol. scand., **15**, Suppl. 52 (1948).
98. Augustinsson K.-B., Gustafson T., J. cell. comp. Physiol., **34**, 311 (1949).
99. Augustinsson K.-B., Heimbürger G., Acta chem. scand., **8**, 753, 762, 1533 (1954).
100. Augustinsson K.-B., Olsson B., Biochem. J., **71**, 477 (1959).

101. Ault R. G., Baird D. K., Carrington H. C., Haworth W. N., Herbert R., Hirst E. L., Percival E. G. V., Smith F., Stacey M., J. chem. Soc., p. 1419 (1933).
102. Avigad G., J. biol. Chem., **229**, 121 (1957).
103. Avigad G., Amaral D., Asensio C., Horecker B. L., J. biol. Chem., **237**, 2736 (1962).
104. Avineri-Shapiro S., Hestrin S., Biochem. J., **39**, 167 (1945).
105. Avis P. G., Bergel F., Bray R. C., J. chem. Soc., p. 1100 (1955).
106. Avis P. G., Bergel F., Bray R. C., J. chem. Soc., p. 1219 (1956).
107. Avron M., Jagendorf A. T., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 475 (1956).
108. Awad E. S., Neurath H., Hartley B. S., J. biol. Chem., **235**, PC35 (1960).
109. Axelrod J., Biochem. J., **63**, 634 (1956).
110. Axelrod B., Bandurski R. S., J. biol. Chem., **204**, 939 (1953).
111. Axelrod A. E., Elvenjem C. A., J. biol. Chem., **140**, 725 (1941).
112. Axelrod J., Inscoe J. K., Tomkins G. M., J. biol. Chem., **232**, 835 (1958).
113. Axelrod B., Jang R., J. biol. Chem., **200**, 847 (1954).
114. Axelrod B., Saltman P., Bandurski R. S., Baker R. S., J. biol. Chem., **197**, 89 (1952).
115. Axelrod J., Tomchick R., J. biol. Chem., **233**, 702 (1958).
116. Axelrod J., Weissbach H., J. biol. Chem., **236**, 211 (1961).
117. Ayengar P., Hayaishi O., Nakajima M., Tomida I., Biochim. biophys. Acta, **33**, 111 (1959).
118. Ayers W. A., J. biol. Chem., **234**, 2819 (1959).
119. Bach S. J., Dixon M., Zerfas L. G., Biochem. J., **40**, 229 (1946).
120. Bach S. J., Killip J. D., Biochim. biophys. Acta, **29**, 273 (1958).
121. Bach S. J., Killip J. D., Biochim. biophys. Acta, **47**, 336 (1961).
122. Bach S. J., Whitehouse D. B., Biochem. J., **57**, XXXi (1954).
123. Bachhawat B. K., Robinson W. G., Coon M. J., J. biol. Chem., **216**, 727 (1955).
124. Bacon J. S. D., Biochem. J., **57**, 320 (1954).
125. Bacon J. S. D., Personal communication (1962).
126. Bacon J. S. D., Bell D. J., J. chem. Soc., p. 3581 (1957).
127. Bacq Z. M., Experientia, **2**, 349, 385 (1946).
128. Baddiley J., Advanc. Enzymol., **16**, 1 (1955).
129. Baddiley J., Gale E. F., Nature, Lond., **155**, 727 (1945).
130. Baddiley J., Hughes N. A., Advanc. Enzymol., **22**, 157 (1960).
131. Baddiley J., Mathias A. P., J. chem. Soc., p. 2583 (1952).
132. Baddiley J., Neuhaus F. C., Biochem. J., **75**, 579 (1960).
133. Baich A., Wolfe R. G., Reithel F. J., J. biol. Chem., **235**, 3130 (1960).
134. Bailey J. M., Whelan W. J., Peat S., J. chem. Soc., p. 3692 (1950).
135. Bailey K., Biochem. J., **36**, 121 (1942).
136. Bailey K., Biochem. J., **43**, 271 (1948).
137. Bailey K., Webb E. C., Biochem. J., **38**, 394 (1944).
138. Bailey K., Webb E. C., Biochem. J., **42**, 60 (1948).
139. Bailey R. W., Biochem. J., **72**, 42 (1959).
140. Bailey R. W., Clarke R. T., Biochem. J., **72**, 49 (1959).
141. Bain J. A., Rusch H. P., J. biol. Chem., **153**, 659 (1944).
142. Baker L. E., J. biol. Chem., **193**, 809 (1951).
143. Baldwin E., Needham D. M., Proc. roy. Soc. B, **122**, 197 (1937).
144. Balinsky D., Davies D. D., Biochem. J., **80**, 292 (1961).
145. Balinsky D., Davies D. D., Biochem. J., **80**, 300 (1961).
146. Balls A. K., Jansen E. F., Advanc. Enzymol., **13**, 321 (1952).
147. Balls A. K., Lineweaver H., J. biol. Chem., **130**, 669 (1939).
148. Balls A. K., Walden M. K., Thompson R. R., J. biol. Chem., **173**, 9 (1948).
149. Balls A. K., Wood H. N., J. biol. Chem., **219**, 245 (1956).
150. Bamann E., Schmeller M., Z. physiol. Chem., **183**, 149 (1929).
151. Bandurski R. S., J. biol. Chem., **217**, 137 (1955).
152. Bandurski R. S., Lipmann F., J. biol. Chem., **219**, 741 (1956).
153. Bandurski R. S., Wilson L. G., Squires C. L., J. Amer. chem. Soc., **78**, 6408 (1956).
154. Banga I., Acta physiol. hung., **3**, 317 (1952).
155. Bangham A. D., Dawson R. M. C., Biochem. J., **72**, 486 (1959).
156. Bangham A. D., Dawson R. M. C., Biochem. J., **75**, 133 (1960).
157. Banks B. E. C., Diamantis A. A., Vernon C. A., J. chem. Soc., p. 4235 (1961).
158. Banks B. E. C., Vernon C. A., J. chem. Soc., p. 1698 (1961).
159. Baranowski T., J. biol. Chem., **180**, 535 (1949).
160. Baranowski T., Illingsworth B., Brown D. H., Cori C. F., Biochim. biophys. Acta, **25**, 16 (1957).

161. Baranowski T., Niederland T. R., J. biol. Chem., **180**, 543 (1949).
162. Barban S., J. Bact., **68**, 493 (1954).
163. Barker H. A., Fed. Proc., **20**, 956 (1961).
164. Barker H. A., Smyth R. D., Wilson R. M., Weissbach H., J. biol. Chem., **234**, 320 (1959).
165. Barker S. A., Bourne E. J., J. chem. Soc., p. 209 (1952).
166. Barker S. A., Bourne E. J., Quart. Rev. chem. Soc., Lond., **7**, 56 (1953).
167. Barker S. A., Bourne E., Peat S., J. chem. Soc., p. 1705 (1949).
168. Barker S. A., Carrington T. R., J. chem. Soc., p. 3588 (1953).
169. Barnard E. A., Stein W. D., Advanc. Enzymol., **20**, 51 (1958).
170. Barnard E. A., Stein W. D., J. mol. Biol., **1**, 339 (1959).
171. Barnard M. L., Laidler K. J., J. Amer. chem. Soc., **74**, 6099 (1952).
172. Barrett J., Biochem. J., **64**, 626 (1956).
173. Barron E. S. G., Advanc. Enzymol., **11**, 201 (1951).
174. Barth L. G., Jaeger L., J. cell. comp. Physiol., **35**, 413 (1950).
175. Bartsch R. G., Kamen M. D., J. biol. Chem., **230**, 41 (1958).
176. Bartsch R. G., Kamen M. D., J. biol. Chem., **235**, 825 (1960).
177. Basu D. K., Bachhawat B. K., Biochim. biophys. Acta, **50**, 123 (1961).
178. Basu D. K., Burma D. P., J. biol. Chem., **235**, 509 (1960).
179. Baum H., Gilbert G. A., Nature, Lond., **171**, 983 (1953).
180. Bayliss B. J., Todrick A., Biochem. J., **62**, 62 (1956).
181. Beadle G. W., Chem. Rev., **37**, 15 (1945).
182. Bealing F. J., Biochem. J., **55**, 93 (1953).
183. Bealing F. J., Bacon J. S. D., Biochem. J., **53**, 277 (1953).
184. Bean R. C., Hassid W. Z., J. biol. Chem., **218**, 425 (1956).
185. Bean R. C., Porter G. G., Steinberg B. M., J. biol. Chem., **236**, 1235 (1961).
186. Beatty R. A., Int. Rev. Cytol., **3**, 177 (1954).
187. Beaufay H., Bendall D. S., Baudhuin P., Wattiaux R., de Duve C., Biochem. J., **73**, 628 (1959).
188. Beaufay H., de Duve C., Biochem. J., **73**, 604 (1959).
189. Beaufay H., van Campenhout E., de Duve C., Biochem. J., **73**, 617 (1959).
190. Beck W. S., Flavin M., Ochoa S., J. biol. Chem., **229**, 997 (1957).
191. Beck W. S., Ochoa S., J. biol. Chem., **232**, 931 (1958).
192. Beevers H., Nature, Lond., **191**, 433 (1961).
193. Beevers H., French R. C., Arch. Biochem. Biophys., **50**, 427 (1954).
194. Behrens M., Z. physiol. Chem., **209**, 59 (1932).
195. Behrman E. J., Stanier R. Y., J. biol. Chem., **228**, 923 (1957).
196. Beinert H., Biochim. biophys. Acta, **20**, 588 (1956).
197. Beinert H., J. Amer. chem. Soc., **78**, 5323 (1956).
198. Beinert H., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 339), 1960.
199. Beinert H., Bock R. M., Goldman D. S., Green D. E., Mahler H. R., Mii S., Stansly P. G., Wakil S. J., J. Amer. chem. Soc., **75**, 4111 (1953).
200. Beisenherz G., Boltze H. J., Bücher T., Czok R., Garbade K. H., Meyer-Arendt E., Pfleiderer G., Z. Naturf., **8b**, 555 (1953).
201. Bellamy W. D., Gunsalus I. C., J. Bact., **48**, 191 (1944).
202. Bendall D. S., Biochem. J., **70**, 381 (1958).
203. Bendall D. S., de Duve C., Biochem. J., **74**, 444 (1960).
204. Bendall D. S., Hill R., New Phytol., **55**, 206 (1956).
205. Benesch R. E., Benesch R., J. Amer. chem. Soc., **77**, 5877 (1955).
206. Ben-Gershom E., Nature, Lond., **175**, 593 (1955).
207. Bentley R., Bhate D. S., J. biol. Chem., **235**, 1219 and 1225 (1960).
208. Bentley R., Thiessen C. P., J. biol. Chem., **226**, 703 (1957).
209. Benzer S., Weisblum B., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **47**, 1149 (1961).
210. Benzinger T., Kitzinger C., Hems R., Burton K., Biochem. J., **71**, 400 (1959).
211. Berends F., Posthumus C. H., Sluys I. v. D., Deierkauf F. A., Biochim. biophys. Acta, **34**, 576 (1959).
212. Berg P., J. biol. Chem., **222**, 991 (1956).
213. Berg P., J. biol. Chem., **222**, 1015 (1956).
214. Berg P., J. biol. Chem., **222**, 1025 (1956).
215. Berg P., Bergmann F. H., Ofengand E. J., Dieckmann M., J. biol. Chem., **236**, 1726 (1961).
216. Berg P., Joklik W. K., J. biol. Chem., **210**, 657 (1954).
217. Berg P., Ofengand E., J. Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **44**, 78 (1958).
218. Berger L., Slein M. W., Colowick S. P., Cori C. F., J. gen. Physiol., **29**, 379 (1946).

219. Bergeret B., Chatagner F., Fromageot C., Biochim. biophys. Acta, 22, 329 (1956).
220. Bergmann F. H., Berg P., Dieckmann M., J. biol. Chem., 236, 1735 (1961).
221. Bergmann M., Fruton J. S., J. biol. Chem., 118, 405 (1937).
222. Bergmann M., Fruton J. S., J. biol. Chem., 124, 321 (1938).
223. Bergmann M., Fruton J. S., Advanc. Enzymol., 1, 63 (1941).
224. Bergmann F., Rimon S., Biochem. J., 77, 209 (1960).
225. Bergmann F., Rimon S., Segal R., Biochem. J., 68, 493 (1958).
226. Bergmann F., Segal R., Biochem. J., 58, 692 (1954).
227. Bergmann F., Segal R., Rimon S., Biochem. J., 67, 481 (1957).
228. Bergmann F., Segal R., Shimoni A., Wurzel M., Biochem. J., 63, 684 (1956).
229. Bergmann F., Wurzel M., Shimoni E., Biochem. J., 55, 888 (1953).
230. Bergmeyer H.-U., Holz G., Kauder E. M., Möllering H., Wieland O., Biochem. Z., 333, 471 (1961).
231. Berman R., Wilson I. B., Nachmansohn D., Biochim. biophys. Acta, 12, 315 (1953).
232. Bernal J. D., The Physical Basis of Life (London, Routledge and Kegan Paul), 1951.
233. Bernhard S. A., Biochem. J., 59, 506 (1955).
234. Bernhard S. A., Gutfreund H., Biochem. J., 63, 61 (1956).
235. Berridge N. J., Biochem. J., 39, 179 (1945).
236. Berridge N. J., Advanc. Enzymol., 15, 423 (1954).
237. Berry J. F., Whittaker V. P., Biochem. J., 73, 447 (1959).
238. Bersin T., Biochem. Z., 248, 3 (1932).
239. Bessman M. J., Lehman I. R., Simms E. S., Kornberg A., J. biol. Chem., 233, 171 (1958).
240. Bessman S. P., Lipmann F., Arch. Biochem. Biophys., 46, 252 (1953).
241. Bettelheim F. R., J. biol. Chem., 212, 235 (1955).
242. Bettelheim F. R., Neurath H., J. biol. Chem., 212, 241 (1955).
243. Bhatia I. S., Satyanarayana M. N., Srinivasan M., Biochem. J., 61, 171 (1955).
244. Bheemeswar B., Nature, Lond., 176, 555 (1955).
245. Bidwell E., Biochem. J., 55, 497 (1953).
246. Bidwell E., Van Heyningen W. E., Biochem. J., 42, 140 (1948).
247. Bier M., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 33), 1962.
248. Binkley F., Nature, Lond., 167, 888 (1951).
249. Birk Y., Silver W. S., Heim A. H., Biochim. biophys. Acta, 25, 227 (1957).
250. Birnbaum S. M., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 115), 1955.
251. Birnbaum S. M., Levingtow L., Kingsley R. B., Greenstein J. P., J. biol. Chem., 194, 455 (1952).
252. Bishop J., Leahy J., Schweet R., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 46, 1030 (1960).
253. Black S., Arch. Biochem. Biophys., 34, 86 (1951).
254. Black S., Wright N. G., J. biol. Chem., 213, 27 (1955).
255. Black S., Wright N. G., J. biol. Chem., 213, 39 (1955).
256. Black S., Wright N. G., J. biol. Chem., 213, 51 (1955).
257. Black S., Wright N. G., J. biol. Chem., 221, 171 (1956).
258. Blakley R. L., Biochem. J., 49, 257 (1951).
259. Blakley R. L., Biochem. J., 58, 448 (1954).
260. Blakley R. L., Biochem. J., 61, 315 (1955).
261. Blakley R. L., Biochem. J., 77, 459 (1960).
262. Blakley E. R., Boyer P. D., Biochim. biophys. Acta, 16, 576 (1955).
263. Blakley R. L., McDougall B. M., J. biol. Chem., 236, 1163 (1961).
264. Blanchard M., Green D. E., Nocito V., Ratner S., J. biol. Chem., 155, 421 (1944).
265. Blanchard M., Green D. E., Nocito V., Ratner S., J. biol. Chem., 161, 583 (1945).
266. Blanchard M., Green D. E., Nocito-Carroll V., Ratner S., J. biol. Chem., 163, 137 (1946).
267. Blaschko H., Biochem. J., 36, 517 (1942).
268. Blaschko H., Biochem. J., 44, 268 (1949).
269. Blaschko H., Duthie R., Biochem. J., 39, 347 (1945).
270. Blaschko H., Duthie R., Biochem. J., 39, 478 (1945).
271. Blaschko H., Fastier F. N., Wajda I., Biochem. J., 49, 250 (1951).
272. Blaschko H., Richter D., Schlossmann H., Biochem. J., 31, 2187 (1937).

273. Blauch M., Koch F. C., Hane M. E., J. biol. Chem., **130**, 471 (1939).
274. Bloch K., Chaykin S., Phillips A. H., de Waard A., J. biol. Chem., **234**, 2595 (1959).
275. Bloch-Frankenthal L., Biochem. J., **57**, 87 (1954).
276. Blum H. F., Time's Arrow and Evolution (Princeton University Press, 1951).
277. Boardman N. K., Partridge S. M., Biochem. J., **59**, 543 (1955).
278. Bock R. M., Ling N.-S., Anal. Chem., **26**, 1543 (1954).
279. Bodo G., Nature, Lond., **176**, 829 (1955).
280. Bodo G., Biochim. biophys. Acta, **25**, 428 (1957).
281. Boell E. J., Anat. Rec., **105**, 600 (1949).
282. Boeri E., Cremona T., Singer T. P., Biochem. biophys. res. Comm., **2**, 298 (1960).
283. Bollum F. J., J. biol. Chem., **235**, 2399 (1960).
284. Bomstein W., Goldberger R., Tisdale H., Biochim. biophys. Acta, **50**, 527 (1961).
285. Bonner W. D., Proceedings of the fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, Symp. № 2 (Oxford, Pergamon Press, 1963).
286. Bonnichsen R., Acta chem. scand., **1**, 114 (1947).
287. Bonnichsen R. K., Arch. Biochem., **12**, 83 (1947).
288. Bonnichsen R. K., Acta chem. scand., **4**, 715 (1950).
289. Bonnichsen R. K., Wassen A. M., Arch. Biochem., **18**, 361 (1948).
290. Booth J. Boyland E., Biochem. J., **66**, 73 (1957).
291. Borgstrøm B., Wheeldon L. W., Biochim. biophys. Acta, **50**, 171 (1961).
292. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **227**, 951 (1957).
293. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **234**, 849 (1959).
294. Borsook H., Advanc. Protein Chem., **8**, 127 (1953).
295. Borsook H., Dubnoff J. W., J. biol. Chem., **138**, 389 (1941).
296. Borst P., Slater E. C., Biochim. biophys. Acta, **48**, 362 (1961).
297. Botts J., Trans. Faraday Soc., **54**, 593 (1958).
298. Botts J., Morales M., Trans. Faraday Soc., **49**, 696 (1953).
299. Boulanger P., Osteux R., Biochim. biophys. Acta, **21**, 552 (1956).
300. Boursnell J. C., in Symposium on the biochemical Reactions of Chemical Warfare Agents, ed. R. T. Williams, Biochem. Soc. Symposium, № 2, p. 8 (Cambridge University Press, 1948).
301. Boursnell J. C., Webb E. C., Nature, Lond., **164**, 875 (1949).
302. Bové C., Conn E. E., J. biol. Chem., **236**, 207 (1961).
303. Bovey F. A., Yanari S. S., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 63), 1960.
304. Boxer G. E., Devlin T. M., Science, **134**, 1495 (1961).
305. Boyer P. D., Harrison W. H., in A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 658), 1954.
306. Boyer P. D., Koeppe O. J., Luchsinger W. W., J. Amer. chem. Soc., **78**, 356 (1956).
307. Bradfield J. R. G., in Symposium on Bacterial Anatomy (6th Symposium of the Society for General Microbiology), ed. E. T. C. Spooner and B. A. D. Stocker (Cambridge University Press, p. 296), 1956.
308. Brady R. O., Mamoon A., Stadtman E. R., J. biol. Chem., **222**, 795 (1956).
309. Brady R. O., Stadtman E. R., J. biol. Chem., **211**, 621 (1954).
310. Brand L., Mahler H. R., J. biol. Chem., **234**, 1615 (1959).
311. Branster M. V., Morton R. K., Biochem. J., **63**, 640 (1956).
312. Браунштейн А. Е., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 113), 1960.
313. Браунштейн А. Е., Азарк Р. М., ДАН СССР, **71**, 93 (1950).
314. Браунштейн А. Е., Азарк Р. М., ДАН СССР, **85**, 385 (1952).
315. Браунштейн А. Е., Критцман М. Г., Биохимия, **8**, 1 (1943).
316. Brawerman G., Chargaff E., Biochim. biophys. Acta, **16**, 524 (1955).
317. Bray R. C., Biochem. J., **81**, 196 (1961).
318. Bray H. G., James S. P., Raffan I. M., Ryman B. E., Thorpe W. V., Biochem. J., **44**, 618 (1949).
319. Bray H. G., Kames S. P., Thorpe W. V., Wasdell M. R., Biochem. J., **47**, 294 (1950).
320. Bray R. C., Pettersson R., Ehrenberg A., Biochem. J., **81**, 178 (1961).
321. Breard J. J. V., Elias V. E., Arch. Farm. Bioquim. Tucuman, **5**, 77, (1950)
322. Bredereck H., Geyer E., Z. physiol. Chem., **254**, 223 (1938).
323. Bremer J., Greenberg D. M., Biochim. biophys. Acta, **46**, 217 (1961).
324. Brenneman F. N., Volk W. A., J. biol. Chem., **234**, 2443 (1959).
325. Brenner M., Müller H. R., Pfister R. W., Helv. chim. Acta, **33**, 568 (1950).

326. Bressler R., Wakil S. J., J. biol. Chem., **236**, 1643 (1961).
327. Bressler R., Wakil S. J., J. biol. Chem., **237**, 1441 (1962).
328. Briggs G. E., Haldane J. B. S., Biochem. J., **19**, 338 (1925).
329. Brill A. S., Williams R. J. P., Biochem. J., **78**, 246, 253 (1961).
330. Brink N. G., Acta chem. scand., **7**, 1081 (1953).
331. Brodie A. F., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, 1955, Vol. 2, p. 693), 1955.
332. Brodie A. F., Lipmann F., J. biol. Chem., **212**, 677 (1955).
333. Brosemer R. W., Rutter W. J., J. biol. Chem., **236**, 1253 (1961).
334. Brown D. D., Tomchick R., Axelrod J., J. biol. Chem., **234**, 2948 (1959).
335. Brown D. H., J. biol. Chem., **204**, 877 (1953).
336. Brown D. H., Biochim. biophys. Acta, **16**, 429 (1955).
337. Brown F. C., Ward D. N., J. Amer. chem. Soc., **79**, 2647 (1957).
338. Brown G. M., J. biol. Chem., **226**, 651 (1957).
339. Brown G. M., J. biol. Chem., **234**, 370 (1959).
340. Brown G. W., Brown W. R., Cohen P. P., J. biol. Chem., **234**, 1775 (1959).
341. *Brown G. W., Cohen P. P., Biochem. J.*, **75**, 82 (1960).
342. Brown K. D., Shupe R. E., Laskowski M., J. biol. Chem., **173**, 99 (1948).
343. Brown M. S., Mosher H. S., J. biol. Chem., **235**, 2145 (1960).
344. Brown-Grant K., Forchielli E., Dorfman R. I., J. biol. Chem., **235**, 1317 (1960).
345. Brumfitt W., Wardlaw A. C., Park J. T., Nature, Lond., **181**, 1783 (1958).
346. Brunel A., Thesis, University of Paris (1936) quoted by M. Florkin and G. Duchateau-Bosson, Enzymologia, **9**, 5 (1940).
347. Brungraber E. G., J. biol. Chem., **233**, 472 (1958).
348. Bruns F. H., Proceedings of the fourth International Congress on Clinical Chemistry, Edinburgh (Edinburgh, E. and S. Livingstone, 1961), p. 76.
349. Bruns F. H., Noltmann E., Willemsen A., Biochem. Z., **330**, 411 (1958).
350. Bublitz C., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **211**, 951 (1955).
351. Bublitz C., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **211**, 963 (1955).
352. Bublitz C., Lehninger A. L., Biochim. biophys. Acta, **47**, 288 (1961).
353. Buchanan J. M., Hartman S. C., Advanc. Enzymol., **21**, 199 (1959).
354. Bücher T., Biochim. biophys. Acta, **1**, 292 (1947).
355. *Bucher N. L. R., Overath P., Lynen F., Biochim. biophys. Acta*, **40**, 491 (1960).
356. Bueding E., MacKinnon J. A., J. biol. Chem., **215**, 495 (1955).
357. Bulen W. A., Arch. Biochem. Biophys., **62**, 173 (1956).
358. Bull H. B., Currie B. T., J. Amer. chem. Soc., **71**, 2758 (1949).
359. Bundy H. F., Mebl J. W., J. Biol. Chem., **234**, 1124 (1959).
360. Burch J., Biochem. J., **58**, 415 (1954).
361. Burma D. P., Horecker B. L., J. biol. Chem., **231**, 1039 (1958).
362. Burma D. P., Horecker B. L., J. biol. Chem., **231**, 1053 (1958).
363. Burma D. P., Takagi Y., Smyrniotis P., Z. Fed. Proc., **16**, 161 (1957).
364. Burnett G. H., Cohen P. P., J. biol. Chem., **229**, 337 (1957).
365. Burnett G., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **211**, 969 (1955).
366. Burt J. R., Biochem. J., **77**, 16P (1960).
367. Burton K., Biochem. J., **48**, 458 (1951).
368. Burton K., Biochem., J., **50**, 258 (1951).
369. Burton K., Biochem. J., **59**, 44 (1955).
370. Burton R. M., Kaplan N. O., J. Amer. chem. Soc., **75**, 1005 (1953).
371. Burton R. M., Kaplan N. O., Arch. Biochem. Biophys., **70**, 107 (1957).
372. Burton R. M., Stadtman E. R., J. biol. Chem., **202**, 873 (1953).
373. Buttin G., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, **26**, 213 (1961).
374. Buzard J. A., Nytch P. D., J. biol. Chem., **227**, 225 (1957).
375. Byrde R. J. W., Fielding H. A., Biochem. J., **61**, 337 (1955).
376. Byron J. E., Wood W. A., Treadwell C. R., J. biol. Chem., **205**, 483 (1953).
377. Cabello J., Basilio C., Prajoux V., Biochim. biophys. Acta, **48**, 148 (1961).
378. Cahib E., Leloir L. F., J. biol. Chem., **231**, 259 (1958).
379. Caffrey R. W., Tremblay R., Gabrio B. W., Huennekens F. M., J. biol. Chem., **223**, 1 (1956).
380. Cahn R., Kaplan N. O., Levine L., Zwilling E., Science, **136**, 962 (1962).
381. Callaghan O. H., Weber G., Biochem. J., **73**, 473 (1959).
382. Calvin M., Fed. Proc., **13**, 697 (1954).
383. Calvin M., Bassham J. A., The Photosynthesis of Carbon Compounds (New York, W. A. Benjamin, 1962).

384. Calvin M., Quayle R., Fuller R. C., Mayaudon J., Renson A. A., Bassham J. A., Fed. Proc., 14, 188 (1955).
385. Camiener G. W., Brown G. M., J. biol. Chem., 235, 2411 (1960).
386. Campbell L. L., J. Amer. chem. Soc., 76, 5256 (1954).
387. Campbell L. L., J. biol. Chem., 227, 693 (1957).
388. Campbell L. L., J. biol. Chem., 235, 2375 (1960).
389. Campbell L. L., Manning G. B., J. biol. Chem., 236. 2962 (1961).
390. Candy D. J., Kilby B. A., Biochem. J., 78, 531 (1961).
391. Canellakis E. S., J. biol. Chem., 227, 329 (1957).
392. Canellakis Z. N., Cohen P. P., J. biol. Chem., 222, 53, 63 (1956).
393. Cantoni G. L., J. biol. Chem., 189, 203 (1951).
394. Cantoni G. L., J. biol. Chem., 204, 403 (1953).
395. Cantoni G. L., Anderson D. G., J. biol. Chem., 222, 171 (1956).
396. Cantoni G. L., Durell J., J. biol. Chem., 225, 1033 (1957).
397. Cantoni G. L., Scarano E., J. Amer. chem. Soc., 76, 4744 (1954).
398. Cantoni G. L., Vignos P. J., J. biol. Chem., 209, 647 (1954).
399. Caputto R., J. biol. Chem., 189, 801 (1951).
400. Caputto B., Dixon M., Nature, Lond., 156, 630 (1945).
401. Caputto B., Trucco B. E., Nature, Lond., 169, 1061 (1952).
402. Caravaca J., Grisolia S., J. biol. Chem., 231, 357 (1958).
403. Cardini C. E., Enzymologia, 14, 362 (1951).
404. Cardini C. E., *Enzymologia*, 15, 303 (1953).
405. Cardini C. E., Leloir L. F., Arch. Biochem. Biophys., 45, 55 (1953).
406. Cardini C. E., Leloir L. F., Chiriboga J., J. biol. Chem., 214, 149 (1955).
407. Carey N. H., Greville G. D., Biochem. J., 71, 166 (1959).
408. Carminatti H., Cabib E., Biochim. biophys. Acta, 53, 417 (1961).
409. Carpenter D. C., Lovelace F. E., J. Amer. chem. Soc., 65, 2364 (1943).
410. Carpenter W. D., Beevers H., Plant Physiol., 34, 403 (1959).
411. Carter C. E., J. Amer. chem. Soc., 73, 1508 (1951).
412. Carter C. E., Cohen L. H., J. biol. Chem., 222, 17 (1956).
413. Caspi E., Lindberg M. C., Hayano M., Cohen J. L., Matsuba M., Rosenkrantz H., Dorfman R. I., Arch. Biochem. Biophys., 61, 267 (1956).
414. Castor L. N., Chance B., J. biol. Chem., 217. 453 (1955).
415. Castor N. L., Chance B., J. biol. Chem., 234, 1587 (1959).
416. Catcheside D. G., The Genetics of Micro—organisms (London, Pitman, 1949).
417. Chamberlin M., Berg P., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 48, 81 (1962).
418. Chance B., J. biol. Chem., 151, 553 (1943).
419. Chance B., Acta chem. scand., 1, 236 (1947).
420. Chance B., in Enzymes and Enzyme Systems, ed. J. T. Edsall (Harvard University Press, p. 93, 1951).
421. Chance B., Arch. Biochem. Biophys., 41, 416 (1952).
422. Chance B., J. biol. Chem., 194, 483 (1952).
423. Chance B., J. biol. Chem., 202, 383 (1953).
424. Chance B., Pappenheimer A. M., J. biol. Chem., 209, 931 (1954).
425. Chance B., Redfearn E. R., Biochem. J., 80, 632 (1961).
426. Chance B., Sager R., Plant Physiol., 32, 548 (1957).
427. Chance B., Williams G. R., J. biol. Chem., 209, 945 (1954).
428. Chance B., Williams G. R., *J. biol. Chem.*, 217, 383 (1955).
429. Chapeville F., Lipmann F., von Ehrenstein G., Weisblum B., Ray W. J., Benzer S., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 48, 1086 (1962).
430. Chappell J. B., in Biological Structure and Function, ed. T. W. Goodwin and O. Lindberg (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 71, 1961).
431. Chappell J. B., Perry S. V., Biochem. J., 55, 586 (1953).
432. Chappell J. B., Perry S. V., Nature, Lond., 173, 1094 (1954).
433. Charalampous F. C., J. biol. Chem., 211, 249 (1954).
434. Charalampous F. C., J. Amer. chem. Soc., 77, 1391 (1955).
435. Charalampous F. C., J. biol. Chem., 234, 220 (1959).
436. Chargaff E., Kream J., J. biol. Chem., 175, 993 (1948).
437. Charlwood P. A., Palmer G., Bennett R., Biochim. biophys. Acta, 50, 17 (1961).
438. Chase A. M., Arch. Biochem., 23, 385 (1949).
439. Chatagner F., Sauret-Ignazi G., Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 38, 415 (1956).
440. Chatagner F., Tabechian H., Bergeret B., Biochim. biophys. Acta, 13, 313 (1954).
441. Chatterjee I. B., Chatterjee G. C., Ghosh N. C., Ghosh J. J., Guha B. C., Biochem. J., 74, 193 (1960).
442. Chatterjee I. B., Chatterjee G. C., Ghosh N. C., Ghosh J. J., Guha B. C., Biochem. J., 76, 279 (1960).

443. Chaykin S., Meinhart J. O., Krebs E. G., J. biol. Chem., **220**, 811 (1956).
444. Chiang C., Knight S. G., Biochem. biophys. res. Comm., **3**, 554 (1960).
445. Chiang C., Knight S. G., Biochim. biophys. Acta, **46**, 271 (1961).
446. Chibnall A. C., Rees M. W., Williams E. F., Biochem. J., **37**, 354 (1943).
447. Chiga M., Plaut G. W. E., J. biol. Chem., **235**, 3260 (1960).
448. Chiga M., Rogers A. E., Plaut G. W. E., J. biol. Chem., **236**, 1800 (1961).
449. Childs A. F., Davies D. R., Green A. L., Rutland J. P., Brit. J. Pharmacol., **10**, 462 (1955).
450. Chin C. H., Thesis for Ph. D. Degree, University of Cambridge (1952).
451. Chou T. C., Lipmann F., J. biol. Chem., **196**, 89 (1952).
452. Chou T. C., Soodak M., J. biol. Chem., **196**, 105 (1952).
453. Christie S. M. H., Kenner G. W., Todd A. R., J. chem. Soc., p. 46 (1954).
454. Chung C. W., Najjar V. A., J. biol. Chem., **218**, 617 (1956).
455. Chung C. W., Najjar V. A., J. biol. Chem., **218**, 627 (1956).
456. Claude A., Proc. roy. Soc., B, **142**, 177 (1954).
457. Cleland W. W., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **235**, 45 (1960).
458. Cleland K. W., Slater E. C., Biochem. J., **53**, 547 (1953).
459. Clezy P. S., Barrett J., Biochem. J., **78**, 798 (1961).
460. Cliffe E. E., Waley S. G., Biochem. J., **79**, 475 (1961).
461. Cohen J. A., Warringa M. G. P., J. Biochim. biophys. Acta, **11**, 52 (1953).
462. Cohen J. A., Warringa M. G. P., J. Biochim. biophys. Acta, **26**, 29 (1957).
463. Cohen P. P., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, 1951). Vol. 1, p. 1040.
464. Cohen P. P., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, 1955). Vol. 2, p. 178.
465. Cohen S. S., J. biol. Chem., **189**, 617 (1951).
466. Cohen S. S., J. biol. Chem., **201**, 71 (1953).
467. Cohen S. S., Barner H. D., J. biol. Chem., **226**, 631 (1957).
468. Cohn D. V., J. biol. Chem., **233**, 299 (1958).
469. Cohn E. J., Edsall J. T., Proteins, Amino Acids and Peptides (New York, Reinhold Publishing Corp., 1943).
470. Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenor D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Derovaux G., Gillespie J. M., Kahnt J. M., Lever W. F., Liu C. H., Mittelman D., Mouton R. F., Schmid K., Uroma E., J. Amer. chem. Soc., **72**, 465 (1950).
471. Cohn M., J. biol. Chem., **180**, 771 (1949).
472. Cohn M., J. biol. Chem., **201**, 735 (1953).
473. Cohn M., Biochim. biophys. Acta, **20**, 92 (1956).
474. Cohn M., J. biol. Chem., **230**, 369 (1958).
475. Cohn M., Cohen G. N., Monod J., C.R. Acad. Sci., Paris, **236**, 746 (1953).
476. Cohn M., Cori G. T., J. biol. Chem., **175**, 89 (1948).
477. Cole R. D., Coote J., Work T. S., Nature, Lond., **179**, 199 (1957).
478. Cole S. W., J. Physiol., **30**, 202 (1904).
479. Coleman J. E., Vallee B. L., J. biol. Chem., **236**, 2244 (1961).
480. Colowick S. P., Kalckar H. M., J. biol. Chem., **137**, 789 (1941).
481. Colowick S. P., Kaplan N. O., eds., Methods in Enzymology (New York, Academic Press, 1955—1963).
482. Colowick S. P., Kaplan N. O., Neufeld E. F., Ciotti M. M., J. biol. Chem., **195**, 951 (1952).
483. Comb D. G., Roseman S., Fed. Proc., **16**, 166 (1957).
484. Comb D. G., Roseman S., J. biol. Chem., **232**, 807 (1958).
485. Comb D. G., Roseman S., J. biol. Chem., **235**, 2529 (1960).
486. Conchie J., Biochem. J., **58**, 552 (1954).
487. Conchie J., Findlay J., Levvy G. A., Nature, Lond., **178**, 1469 (1956).
488. Conchie J., Findlay J., Levvy G. A., Biochem. J., **71**, 318 (1959).
489. Conn E. E., Kraemer L. M., Liu P.-N., Vennesland B., J. biol. Chem., **194**, 143 (1952).
490. Connors W. M., Pihl A., Dounce A. L., Stotz E., J. biol. Chem., **184**, 29 (1950).
491. Connors W. M., Stotz E., J. biol. Chem., **178**, 881 (1949).
492. Contardi A., Ercoli A., Biochem., Z., **261**, 275 (1933).
493. Conway E. J., Cooke R., Biochem. J., **33**, 457 (1939).
494. Conway E. J., Cooke R., Biochem. J., **33**, 479 (1939).
495. Conway E. J., MacDonnell E., Nature, Lond., **156**, 752 (1945).
496. Conway E. J., O'Malley E., Biochem. J., **54**, 154 (1953).
497. Coon M. J., Kupiecki F. P., Dekker E. E., Schlesinger M. J., del Campillo A., in CIBA Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, ed. G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor (London, Churchill, 1959), p. 62.
498. Cooper C., Lehninger A. L., J. biol. Chem., **219**, 489 (1956).
499. Cooper C., Wilson D. W., Fed. Proc., **13**, 194 (1954).

500. Cooper J. A. D., Smith W., Bacila M., Medina H., J. biol. Chem., **234**, 445 (1959).
501. Cori C. F., Cori G. T., J. biol. Chem., **158**, 341 (1945).
502. Cori G. T., Cori C. F., J. biol. Chem., **151**, 57 (1943).
503. Cori G. T., Larner J., J. biol. Chem., **188**, 17 (1951).
504. Cori G. T., Ochoa S., Slein M. W., Cori C. F., Biochim. biophys. Acta **7**, 304 (1951).
505. Cori G. T., Slein M. W., Cori C. F., J. biol. Chem., **173**, 605 (1948).
506. Corwin L. M., J. biol. Chem., **234**, 1338 (1959).
507. Costa O. A., Rev. Quim. Farm., Rio de J., **2**, 71 (1937).
508. Coulthard C. E., Michaelis R., Short W. F., Sykes G., Skrimshire G. E. H., Standfast A. F. B., Birkinshaw J. H., Raistrick H., Biochem. J., **39**, 24 (1945).
509. Cowgill R. W., J. biol. Chem., **234**, 3146 (1959).
510. Cowgill R. W., Pizer L. I., J. biol. Chem., **223**, 885 (1956).
511. Crandall D. I., Fed. Proc., **12**, 192 (1953).
512. Crandall D. I., Halikis D. N., J. biol. Chem., **208**, 629 (1954).
513. Crane F. L., Plant Physiol., **32**, 619 (1957).
514. Crane F. L., Mii S., Hauge J. G., Green D. E., Beinert H., J. biol. Chem., **218**, 701 (1956).
515. Crawford I., Kornberg A., Simme E. S., J. biol. Chem., **226**, 1093 (1957).
516. Crawford I. P., Yanofsky C., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **44**, 1161 (1958).
517. Creasey W. A., Handschumacher R. E., J. biol. Chem., **236**, 2058 (1961).
518. Crewther W. G., Lennox F. G., Nature, Lond., **165**, 680 (1950).
519. Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J., Nature, Lond., **192**, 1227 (1961).
520. Crook E. M., Biochem. J., **35**, 226 (1941).
521. Crook E. M., Law K., Biochem. J., **52**, 492 (1952).
522. Crook E. M., Stone B. A., Biochem. J., **65**, 1 (1956).
523. Cunningham B. A., Kirkwood S., J. biol. Chem., **236**, 485 (1961).
524. Cunningham L., Catlin B. W., de Garilhe M. P., J. Amer. chem. Soc., **78**, 4642 (1956).
525. Cunningham W. L., Brown C. S., J. biol. Chem., **221**, 287 (1956).
526. Cunningham W. L., Manners D. J., Biochem. J., **80**, 42P (1961).
527. Cutolo E., Arch. Biochem. Biophys., **64**, 242 (1956).
528. Cynkin M. A., Ashwell G., J. biol. Chem., **235**, 1576 (1960).
529. Czok R., Bücher T., Advanc. Protein Chem., **15**, 315 (1960).
530. Dagley S., Dawes E. A., Biochim. biophys. Acta, **17**, 177 (1955).
531. Dahlqvist A., Biochem. J., **78**, 282 (1961).
532. Dahlqvist A., Biochim. biophys. Acta, **50**, 55 (1961).
533. Dalton H. R., Nelson J. M., J. Amer. chem. Soc., **61**, 2946 (1939).
534. Dalziel K., Acta chem. scand., **11**, 1706 (1957).
535. Dalziel K., Acta chem. scand., **12**, 459 (1958).
536. Dalziel K., Biochem. J., **80**, 440 (1961).
537. Dalziel K., Biochem. J., **84**, 240 (1962).
538. Danielli J. F., Brown R., eds., Symposium on Nucleic Acids (1st Symposium of the Society of Experimental Biology) (Cambridge University Press, 1947).
539. Datta A. G., Katznelson H., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 576 (1956).
540. Datta P. K., Meeuse B. J. D., Engstrom-Heg V., Hilal S. H., Biochim. biophys. Acta, **17**, 602 (1955).
541. Dauterman W. C., Talens A., van Asperen K., J. Ins. Physiol., **8**, 1 (1962).
542. Davenport H. E., Nature, Lond., **170**, 1112 (1952).
543. Davenport H. E., Hill R., Proc. roy. Soc., B, **139**, 327 (1952).
544. Davenport H. E., Hill R., Biochem. J., **74**, 493 (1960).
545. Davenport H. W., Wilhelmi A. E., Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **48**, 53 (1941).
546. Davey C. L., Nature, Lond., **183**, 995 (1959).
547. David W. E., Lichstein H. C., Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **73**, 216 (1950).
548. Davidson E. A., J. biol. Chem., **235**, 23 (1960).
549. Davidson E. A., Blumenthal H. J., Roseman F., J. biol. Chem., **226**, 125 (1957).
550. Davidson E. A., Riley J. G., J. biol. Chem., **235**, 3367 (1960).
551. Davidson J. N., The Biochemistry of the Nucleic Acids, 4th edn. (London, Methuen, 1960).
552. Davie E. W., Koningsberger V. V., Lipmann F., Arch. Biochem. Biophys., **65** 21 (1956).
553. Davie E. W., Neurath H., J. biol. Chem., **212**, 515 (1955).
554. Davies D. D., Biochem. J., **80**, 93 (1961).

555. Davies D. D., Kun E., Biochem. J., 66, 307 (1957).
556. Davies D. R., J. Pharm., Lond., 6, 1 (1954).
557. Davies D. R., Personal communication.
558. Davies D. R., Green A. L., Advanc. Enzymol., 20, 283 (1958).
559. Davies D. R., Rutland J. P., Nature, Lond., 178, 697 (1956).
560. Davies R., Biochem. J., 37, 230 (1943).
561. Davis F. F., Allen F. W., Biochim. biophys. Acta, 21, 14 (1956).
562. Davis N. C., J. biol. Chem., 223, 935 (1956).
563. Davis N. C., Adams E., Arch. Biochem. Biophys., 57, 301 (1955).
564. Davis N. C., Smith E. L., J. biol. Chem., 200, 373 (1953).
565. Davis N. C., Smith E. L., J. biol. Chem., 224, 261 (1957).
566. Davison A. N., Biochim. biophys. Acta, 19, 66 (1956).
567. Davison D. C., Nature, Lond., 166, 265 (1950).
568. Davison D. C., Biochem. J., 49, 520 (1951).
569. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., J. chem. Soc., p. 833 (1946).
570. Dawson C. R., Tarpley W. B., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 454), 1951.
571. Dawson R. M. C., Biochem. J., 62, 689 (1956).
572. Dawson R. M. C., Biochem. J., 64, 192 (1956).
573. Dawson R. M. C., Biochem. J., 70, 559 (1958).
574. De S. S., Ann. Biochem. Exp. Med. (India), 4, 45 (1944).
575. DeBellis R., Mandl I., MacLennan J. D., Howes E. L., Nature, Lond., 174, 1191 (1954).
576. De Bernard B., Biochim. biophys. Acta, 23, 510 (1957).
577. De Castro F. T., Price J. M., Brown R. R., J. Amer. chem. Soc., 78, 2904 (1956).
578. Decker R. H., Kang H. H., Leach F. R., Henderson L. M., J. biol. Chem., 236, 3076 (1961).
579. Dedonder R., Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 34, 171 (1952).
580. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F., Biochem. J., 60, 604 (1955).
581. De Duve C., Wattiaux R., Baudhuin P., Advanc. Enzymol., 24, 291 (1962).
582. De Garilhe M. P., Laskowski M., Biochim. biophys. Acta, 18, 370 (1955).
583. De Garilhe M. P., Laskowski M., J. biol. Chem., 215, 269 (1955).
584. Dekker C. A., Taylor S. P., Fruton J. S., J. biol. Chem., 180, 155 (1949).
585. Dekker E. E., Schlesinger M. J., Coon M. J., J. biol. Chem., 233, 434 (1958).
586. De la Haba G., Cantoni G. L., J. biol. Chem., 234, 603 (1959).
587. De la Haba G., Leder I. G., Racker E., J. biol. Chem., 214, 409 (1955).
588. De Ley J., Doudoroff M., J. biol. Chem., 227, 745 (1957).
589. DeMars R., Biochim. biophys. Acta, 27, 435 (1958).
590. DeMoss R., Bact. Proc., p. 81 (1953).
591. Dempsey M. E., Boyer P. D., J. biol. Chem., 236, PC6 (1961).
592. Den H., Robinson W. G., Coon M. J., J. biol. Chem., 234, 1666 (1959).
593. Dennis D., Kaplan N. O., J. biol. Chem., 235, 810 (1960).
594. De Renzo E. C., Advanc. Enzymol., 17, 293 (1956).
595. De Renzo E. C., Kaleita E., Heytler P. G., Oleson J. J., Hutchings B. L., Williams J. H., Arch. Biochem. Biophys., 45, 247 (1953).
596. Desnuelle P., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 93), 1960.
597. Desnuelle P., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 119), 1960.
598. Desnuelle P., Rovery M., Bonjour G., Biochim. biophys. Acta, 5, 116 (1950).
599. Deuel H., Leuenberger R., Huber G., Helv. chim. Acta, 33, 942 (1950).
600. Deuel H., Stutz E., Advanc. Enzymol., 20, 341 (1958).
601. Deutsch A., Nilsson R., Acta chem. scand., 8, 1898 (1954).
602. Dewey D. L., Hoare D. S., Work E., Biochem. J., 58, 523 (1954).
603. Dewey V. C., Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., 46, 482 (1941).
604. Dewey V. C., Biol. Bull., 87, 107 (1944).
605. Di Carlo F. J., Schultz A. S., Kent A. M., Arch. Biochem. Biophys., 44, 468 (1953).
606. Dickens F., Biochem. J., 27, 1141 (1933).
607. Dickens F., Glock G. E., Biochem. J., 50, 81 (1951).
608. Dickens F., Williamson D. H., Biochem. J., 64, 567 (1956).
609. Dickman S. R., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 495), 1961.
610. Dikstein S., Bergmann F., Henis Y., J. biol. Chem., 224, 67 (1957).
611. Dintzis H. M., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 47, 247 (1961).

612. Dixon G. H., Kauffman D. L., Neurath H., J. biol. Chem., **233**, 1373 (1958).
613. Dixon G. H., Smithies O., *Biochim. biophys. Acta*, **23**, 198 (1957).
614. Dixon M., Nature, Lond., **140**, 806 (1937).
615. Dixon M., Enzymologia, **5**, 198 (1938).
616. Dixon M., Ergebn. Enzymforsch., **8**, 217 (1939).
617. Dixon M., in Symposium on the Biochemical Reactions of Chemical Warfare Agents (Biochem. Soc. Symposium № 2), ed. R. T. Williams (Cambridge University Press, 1948), p. 39.
618. Dixon M., Multi-enzyme Systems (Cambridge University Press, 1949).
619. Dixon M., Manometric Methods (Cambridge University Press, 1951).
620. Dixon M., Biochem. J., **54**, 457 (1953).
621. Dixon M., Biochem. J., **55**, 161 (1953).
622. Dixon M., Biochem. J., **55**, 170 (1953).
623. Dixon M., *Disc. Faraday Soc.*, № 20, «The Physical Chemistry of Enzymes», p. 9 (1955).
624. Dixon M., Disc. Faraday Soc., № 20, «The Physical Chemistry of Enzymes», p. 301 (1955).
625. Dixon M., Caputto R., Unpublished observations.
626. Dixon M., Keilin D., Proc. roy. Soc., B, **119**, 159 (1936).
627. Dixon M., Kodama K., *Biochem. J.*, **20**, 1104 (1926).
628. Dixon M., Lutwak-Mann C., Biochem. J., **31**, 1347 (1937).
629. Dixon M., Massey V., Webb E. C., Unpublished observations.
630. Dixon M., Thurlow S., Biochem. J., **18**, 976 (1924).
631. Dixon M., Webb E. C., Advanc. Protein Chem., **16**, 197 (1961).
632. Dixon M., Webb E. C., Enzymes, 1st edn. (1958). (М. Диксон, Э. Уэбб, «Ферменты», *1-е изд.*, *ИЛ*, М., *1961*).
633. Dixon M., Webb E. C., Nature, Lond., **184**, 1298 (1959).
634. Dodgson K. S., Enzymologia, **20**, 301 (1959).
635. Dodgson K. S., Biochem. J., **78**, 324 (1961).
636. Dodgson K. S., Lloyd A. G., Biochem. J., **68**, 88 (1958).
637. Dodgson K. S., Powell G. M., Biochem. J., **73**, 666, 672 (1959).
638. Dodgson K. S., Rose F. A., Spencer B., *Biochem. J.*, **66**, 357 (1957).
639. Dodgson K. S., Spencer B., Biochem. J., **57**, 310 (1954).
640. Dodgson K. S., Spencer B., Thomas J., Biochem. J., **59**, 29 (1955).
641. Dodgson K. S., Spencer B., Williams K., Biochem. J., **64**, 216 (1956).
642. Doery H. M., Pearson J. E., Biochem. J., **78**, 820 (1961).
643. Doherty D. G., J. Amer. chem. Soc., **77**, 4887 (1955).
644. Doherty D. G., Vaslow F., *J. Amer. chem. Soc.*, **74**, 931 (1952).
645. Doisy R. J., Richert D. A., Westerfeld W. W., J. biol. Chem., **217**, 307 (1955).
646. Dolin M. I., Arch. Biochem. Biophys., **46**, 483 (1953).
647. Dolin M. I., J. biol. Chem., **225**, 557 (1957).
648. Dolin M. I., Wood N. P., J. biol. Chem., **235**, 1809 (1960).
649. Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Haselkorn R., Litt M., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **45**, 482 (1959).
650. Doudoroff M., Barker H. A., Hassid W. Z., J. biol. Chem., **168**, 725 (1947).
651. Doudoroff M., Hassid W. Z., Putman E. W., Potter A. L., Lederberg J., J. biol. Chem., **179**, 921 (1949).
652. Doyle M. L., Katzman P. A., Doisy E. A., *J. biol. Chem.*, **217**, 921 (1955).
653. Drabkin D. L., J. biol. Chem., **182**, 317 (1950).
654. Dreyer W. J., Neurath H., J. biol. Chem., **217**, 527 (1955).
655. Дружинина К. В., Крицман М. Г., Биохимия, **17**, 77 (1952).
656. Drysdale G. R., Cohn M., Biochim. biophys. Acta, **21**, 397 (1956).
657. Drysdale G. R., Lardy H. A., J. biol. Chem., **202**, 119 (1953).
658. Drysdale G. R., Spiegel M. J., Strittmatter P., *J. biol. Chem.*, **236**, 2323 (1961).
659. Duncan W. A. M., Manners D. J., Ross A. G., Biochem. J., **63**, 44 (1956).
660. Durell J., Anderson D. G., Cantoni G. L., Biochim. biophys. Acta, **26**, 270 (1957).
661. Durr I. F., Rudney H., J. biol. Chem., **235**, 2572 (1960).
662. Dutton G. J., *Biochem. J.*, *64*, *693* (1956).
663. Dyckerhoff H., Armbruster R., Z. physiol. Chem., **219**, 38 (1933).
664. Eadie G. S., Bernheim F., Bernheim M. L. C., J. biol. Chem., **181**, 449 (1949).
665. Easson L. H., Stedman E., Proc. roy. Soc., B, **121**, 142 (1936).
666. Ebata M., Sato R., Bak T., J. Biochem., Tokyo, **42**, 715 (1955).
667. Ebersole E. R., Guttentag C., Wilson P. W., *Arch. Biochem.*, **3**, 399 (1943).

668. Ebisuzaki K., Williams J. N., Biochem. J., **60**, 644 (1955).
669. Edelhoch H., Rodwell V. W., Grisolia S., J. biol. Chem., **228**, 891 (1957).
670. Edelman J., Bacon J. S. D., Biochem. J., **49**, 529 (1951).
671. Edlbacher S., Röthler H., Z. Physiol. Chem., **148**, 273 (1925).
672. Edmonds M., Abrams R., J. biol. Chem., **235**, 1142 (1960).
673. Edson N. L., Aust. N. Z. Ass. Adv. Sci. (Rep. 29th meeting, Sydney) 29, 281 (1952).
674. Edwards S. W., Knox W. E., J. biol. Chem., **220**, 79 (1956).
675. Egami F., Itahashi M., Sato R., Mori T., J. Biochem., Tokyo, **40**, 527 (1953).
676. Egami F., Takahashi N., Bull. chem. Soc., Japan, **25**, 666 (1955).
677. Ege R., Lundsteen E., Biochem. Z., **268**, 164 (1934).
678. Eggerer H., Stadtman E. R., Overath P., Lynen F., Biochem. Z., **333**, 1 (1960).
679. Ehrenberg A., Theorell H., Acta chem. scand., **9**, 1193 (1955).
680. Eiger I. Z., Dawson C. R., Arch. Biochem. Biophys., **21**, 194 (1949).
681. Einset E., Clark W. L., J. biol. Chem., **231**, 703 (1958).
682. Eisenberg F., Field J. B., J. biol. Chem., **222**, 293 (1956).
683. Eisenberg M. A., Biochim. biophys. Acta, **16**, 58 (1955).
684. Eisenstadt J. M., Kameyama T., Novelli G. D., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **48**, 652 (1962).
685. Elkins-Kaufman E., Neurath H., J. biol. Chem., **175**, 893 (1948).
686. Ellfolk N., Acta chem. scand., **8**, 151 (1954).
687. Elliott S. D., J. exp. Med., **92**, 201 (1950).
688. Elliott W. H., J. biol. Chem., **201**, 661 (1953).
689. Elliott W. H., Biochem. J., **62**, 427 (1956).
690. Elliott W. H., Biochem. J., **65**, 315 (1957).
691. Ellis D., Fruton J. S., J. biol. Chem., **191**, 153 (1951).
692. Ellis R. J., Davies D. D., Biochem. J., **78**, 615 (1961).
693. Elödi P., Szorenyi E. T., Acta physiol. Acad. sci. Hung., **9**, 367 (1956).
694. Emery A. J., Dounce A. L., J. biophys. biochem. Cytol., **1**, 315, 331 (1956).
695. Endahl G. L., Kochakian C. D., Hamm D., J. biol. Chem., **235**, 2792 (1960).
696. Englard S., J. biol. Chem., **235**, 1510 (1960).
697. Englard S., Breiger H. H., Biochim. biophys. Acta, **56**, 571 (1962).
698. Engström L., Acta Soc. Med. Ups., **64**, 214 (1959).
699. Engström L., Biochim. biophys. Acta, **52**, 36 (1961).
700. Ennor A. H., Rosenberg H., Biochem. J., **51**, 606 (1952).
701. Ennor A. H., Rosenberg H., Armstrong M. D., Nature, Lond., **175**, 120 (1955).
702. Entner N., Gonzalez C., Biochim. biophys. Acta, **47**, 52 (1961).
703. Epps H. M. R., Biochem. J., **39**, 42 (1945).
704. Epps H. M. R., Gale E. F., Biochem. J., **36**, 619 (1942).
705. Erkama J., Virtanen A. I., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 1244), 1951.
706. Ernster L., Navazio F., Exp. Cell Res., **11**, 483 (1956).
707. Estabrook R. W., J. biol. Chem., **230**, 735 (1958).
708. Estabrook R. W., Sacktor B., Arch. Biochem. Biophys., **76**, 532 (1958).
709. Euler H. von, Adler E., Gunther G., Daş N. B., Z. physiol. Chem., **254**, 61 (1938).
710. Euler H. von, Albers H., Schlenk F., Z. physiol. Chem., **240**, 113 (1936).
711. Eyring H., J. chem. Phys., **3**, 107 (1935).
712. Eyster H. C., Plant Physiol., **25**, 630 (1950).
713. Fairbairn D., J. biol. Chem., **173**, 705 (1948).
714. Farmer V. C., Henderson M. E. K., Russell J. D., Biochem. J., **74**, 257 (1960).
715. Farrar T. C., Gutorowsky H. S., Alberty R. A., Miller W. G., J. Amer. chem. Soc., **79**, 3978 (1957).
716. Faulkner P., Biochem. J., **60**, 590 (1955).
717. Fawcett C. P., Ciotti M. M., Kaplan N. O., Biochem. biophys. Acta, **54**, 210 (1961).
718. Федорченко О. И., Укр. биохим. журн., **30**, 552 (1958).
719. Feingold D. S., Avigad G., Hestrin S., Biochem. J., **64**, 351 (1956).
720. Feingold D. S., Avigad G., Hestrin S., J. biol. Chem., **224**, 295 (1957).
721. Feingold D. S., Neufeld E. F., Hassid W. Z., J. biol. Chem., **235**, 910 (1960).
722. Félix F., Lahouesse-Mercouroff J., Biochim. biophys. Acta, **21**, 303 (1956).
723. Ferguson J. J., Rudney H., J. biol. Chem., **234**, 1072 (1959).
724. Fernandez M., Grisolia S., J. biol. Chem., **235**, 2188 (1960).

725. Fewson C. A., Nicholas D. J. D., Biochem. J., 78, 9P (1961).
726. Fewson C. A., Nicholas D. J. D., Biochim. biophys. Acta, 49, 335 (1961).
727. Fiedler H., Wood J. L., J. biol. Chem., 222, 387 (1956).
728. Fincham J. R. S., Biochem. J., 53, 313 (1953).
729. Fincham J. R. S., Biochem. J., 65, 721 (1957).
730. Fincham J. R. S., Advanc. Enzymol., 22, 1 (1960).
731. Fincham J. R. S., Bond P. A., Biochem. J., 77, 96 (1960).
732. Findlay J., Levvy G. A., Biochem. J., 77, 170 (1960).
733. Fischer E., Ber. dtsch. chem. Ges., 27, 2985 (1894).
734. Fischer E. H., Graves D. J., Crittenden E. R. S., Krebs E. G., J. biol. Chem., 234, 1698 (1959).
735. Fischer E. H., Krebs E. G., J. biol. Chem., 231, 65 (1958).
736. Fischer E. H., Montmollin R. de., Helv. chim. Acta, 34, 1987 (1951).
737. Fischer E. H., Stein E. A., Arch. Sci. Genève, 7, 131 (1954).
738. Fischer E. H., Stein E. A., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 301), 1960.
739. Fischer E. H., Stein E. A., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 313), 1960.
740. Fischer F. G., Roedig A., Rauch K., Liebigs Ann., 552, 203 (1942).
741. Fish J. C., Nature, Lond., 180, 345 (1957).
742. Fischer H. F., Conn E. E., Vennesland B., Westheimer F. H., J. biol. Chem., 202, 687 (1953).
743. Fishman W. H., Advanc. Enzymol., 16, 361 (1955).
744. Fishman W. H., Green S., J. biol. Chem., 225, 435 (1957).
745. Fiske C. H., Subba Row Y., J. biol. Chem., 66, 375 (1925).
746. Fitting C., Doudoroff M., J. biol. Chem., 199, 153 (1952).
747. Flaks J. G., Erwin M. J., Buchanan J. M., J. biol. Chem., 228, 201 (1957).
748. Flaks J. G., Erwin M. J., Buchanan J. M., J. biol. Chem., 229, 603 (1957).
749. Flavin M., Kono T., J. biol. Chem., 235, 1109 (1960).
750. Flavin M., Slaughter C., J. biol. Chem., 235, 1103 (1960).
751. Flavin M., Slaughter C. biol. Chem., 235, 1112 (1960).
752. Fleury P., Courtois J., Helv. chim. Acta, 29, 1297 (1946).
753. Florini J. R., Vestling C. S., Biochim. biohys. Acta, 25, 575 (1957).
754. Florkin M., Duchateau-Bosson G., Enzymologia, 9, 5 (1940).
755. Fluharty A. L., Ballou C. E., J. biol. Chem., 234, 2517 (1959).
756. Folk J. E., Braunberg R. C., Gladner J. A., Biochim. biophys. Acta, 47, 595 (1961).
757. Folk J. E., Gladner J. A., Biochim. biophys. Acta, 48, 139 (1961).
758. Folk J. E., Piez K. A., Carroll W. R., Gladner J. A., J biol. Chem., 235, 2272 (1960).
759. Fones W. S., Lee M., J. biol. Chem., 201, 847 (1953).
760. Ford-Moore A. H., Porton Report to the Ministry of Supply (1936) quoted in Symposium on the Biochemical Reactions of Chemical Warfare Agents (Biochem. Soc. Symposium № 2), ed. R. T. Williams (Cambridge University Press, p. 39, 1948).
761. Formica J. V., Brady R. O., J. Amer. chem. Soc., 81, 752 (1959).
762. Forsyth W. G. C., Webley D. M., J. gen. Microbiol., 4, 87 (1950).
763. Forti G., Biochim. biophys. Acta, 48, 200 (1961).
764. Foster R. J., Niemann C., J. Amer. chem. Soc., 77, 1886 (1955).
765. Fowden L., J. exp. Bot., 5, 28 (1954).
766. Fox J. B., Dandliker W. B., J. biol. Chem., 221, 1005 (1956).
767. Foye W. O., Lange W. E., J. Amer. chem. Soc., 76, 2199 (1954).
768. Frampton E. W., Wood W. A., J. biol. Chem., 236, 2571 (1961).
769. Frampton E. W., Wood W. A., J. biol. Chem., 236, 2578 (1961).
770. Fraenkel-Conrat H., Fraenkel-Conrat J., Biochim. biophys. Acta, 5, 98 (1950).
771. Fredericq E., Oth A., Biochem. J., 66, 33P (1957).
772. French D., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 345), 1960.
773. French D., Knapp D. W., J. biol. Chem., 187, 463 (1950).
774. French D., Levine M. L., Norberg E., Nordin P., Pazur J. H., Wild G. M., J. Amer. chem. Soc., 76, 2387 (1954).
775. French D., Wild G. M., J. Amer. chem. Soc., 75, 4490 (1953).
776. Freundlich M., Burns R. O., Umbarger H. E., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 48, 1804 (1962).
777. Friedberg F., Arch. Biochem. Biophys., 61, 263 (1956).
778. Frieden C., Biochim. biophys. Acta, 24, 241 (1957).
779. Frieden C., J. Amer. chem. Soc., 79, 1894 (1957).
780. Frieden C., J. biol. Chem., 234, 809 and 815 (1959).
781. Frieden C., J. biol. Chem., 234, 2891 (1959).
782. Frieden C., Velick S. F., Biochim. biophys. Acta, 23, 439 (1957).

783. Friedenwald J. S., Maengwyn-Davies G. D., in A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, 1954), p. 154.
784. Friedkin M., Roberts D., J. biol. Chem., **207**, 245 (1954).
785. Friedman S., Fraenkel G., Arch. Biochem. Biophys., **59**, 491 (1955).
786. Friedmann H. C., Vennesland B., J. biol. Chem., **235**, 1526 (1960).
787. Friess E. T., Morales M. F., Arch. Biochem. Biophys., **56**, 326 (1955).
788. Frigerio N. A., Harbury H. A., J. biol. Chem., **231**, 135 (1958).
789. Fritzson P., J. biol. Chem., **235**, 719 (1960).
790. Fromageot C., Ergebn. Enzymforsch., **7**, 50 (1938).
791. Fromageot C., Desnuelle P., C.R. Acad. Sci., Paris, **214**, 647 (1942)
792. Fromm H. J., J. biol. Chem., **234**, 3097 (1959).
793. Fruton J. S., Johnston R. B., Fried M., J. biol. Chem., **190**, 39 (1950).
794. Fruton J. S., Mycek M. J., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 11 (1956).
795. Fruton J. S., Smith V. A., Driscoll P. E., J. biol. Chem., **173**, 457 (1948).
796. Fry B. A., Biochem. J., **59**, 579 (1955).
797. Fujita A., Advanc. Enzymol., **15**, 389 (1954).
798. Fujita A., Nose Y., Kozuka S., Tashiro T., Ueda K., Sakamoto S., J. biol. Chem., **196**, 289 (1952).
799. Fujita A., Nose Y., Kuratani K., J. Vitaminol., **1**, 1 (1954).
800. Fujita A., Nose Y., Ueda K., Hasegawa E., J. biol. Chem., **196**, 297 (1952).
801. Fujita A., Nose Y., Uyeo S., Koizumi J., J. biol. Chem., **196**, 313 (1952).
802. Fukui S., Suzuki T., Kitahara K., Miwa T., J. gen. appl. Microbiol., **6**, 270 (1960).
803. Furth J. J., Hurwitz J., Krug R., Alexander M., J. biol. Chem., **236**, 3317 (1961).
804. Gale E. F., Biochem. J., **32**, 1583 (1938).
805. Gale E. F., Biochem. J., **33**, 1012 (1939).
806. Gale E. F., Brit. med. Bull., **9**, 135 (1953).
807. Gale E. F., Sci. Amer., **194**, 41 (1956).
808. Gale E. F., in The Bacteria, ed. I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier (London and New York, Academic Press, Vol. III, 1962).
809. Gale E. F., Epps H. M. R., Nature, Lond., **152**, 327 (1943).
810. Gale E. F., Epps H. M. R., Biochem. J., **38**, 232 (1944).
811. Gale E. F., Epps H. M. R., Biochem. J., **38**, 250 (1944).
812. Gale E. F., Folkes J. P., Biochem. J., **59**, 675 (1955).
813. Gamble J. L., Lehninger A. L., J. biol. Chem., **223**, 921 (1956).
814. Garen A., Echols H., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **48**, 1398 (1962).
815. Garen A., Levinthal C., Biochim. biophys. Acta, **38**, 470 (1960).
816. Garrod A. E., Inborn Errors of Metabolism (Oxford University Press, 1909).
817. Gavrilescu N., Peters R. A., Biochem. J., **25**, 2150 (1931).
818. Gawron O., Fondy T. P., J. Amer. chem. Soc., **81**, 6333 (1959).
819. Gehrmann G., Okada S., Biochim. biophys. Acta, **23**, 621 (1957).
820. Geiduschek E. P., Moohr J. W., Weiss S. B., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **48**, 1078 (1962).
821. George P., Biochem. J., **54**, 267 (1953).
822. George P., Biochem. J., **55**, 220 (1953).
823. Gergely J., Hele P., Ramakrishnan C. V., J. biol. Chem., **198**, 323 (1952).
824. Ghosh S., Blumenthal H. J., Davidson E., Roseman S., J. biol. Chem., **235**, 1265 (1960).
825. Gianetto R., de Duve C., Biochem. J., **59**, 433 (1955).
826. Gibbs M., in Methods in Enzymology, ed S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 411), 1955.
827. Gibson D. M., Ayengar P., Sanadi D. R., Biochim. biophys. Acta, **16**, 536 (1955).
828. Gibson D. M., Ayengar P., Sanadi D. R., Biochim. biophys. Acta, **21**, 86 (1956).
829. Gibson D. M., Davisson E. O., Bachhawat B. K., Ray B. R., Vestling C. S., J. biol. Chem., **203**, 397 (1953).
830. Gibson J., Biochem. J., **79**, 151 (1961).
831. Gibson K. D., Biochim. biophys. Acta, **10**, 221 (1953).
832. Gibson K. D., Neuberger A., Scott J. J., Biochem. J., **61**, 618 (1955).
833. Gibson Q. H., Greenwood C., Biochem. J., **86**, 541 (1963).
834. Gilbert G. A., Proc. roy. Soc., A, **250**, 377 (1959).
835. Gilbert G. A., Patrick A. P., Biochem. J., **51**, 181 (1952).
836. Gilbert J. B., Otey M. C., Price V. E., J. biol. Chem., **190**, 377 (1951).
837. Ginoza H. S., Altenbern R. A., Arch. Biochem. Biophys., **56**, 537 (1955).

838. Ginsburg A., J. biol. Chem., **234**, 481 (1959).
839. Ginsburg V., J. biol. Chem., **232**, 55 (1958).
840. Ginsburg V., Neufeld E. F., Hassid W. Z., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **42**, 333 (1956).
841. Giri K. V., Krishnaswamy P. R., Rao N. A., Biochem. J., **70**, 66 (1958).
842. Giri K. V., Rao N. A., Cama H. R., Kumar S. A., Biochem. J., **75**, 381 (1960).
843. Giuditta A., Strecker H. J., Biochim. biophys. Acta, **48**, 10 (1961).
844. Gjessing E. C., Emery R., Clements J. P., J. biol. Chem., **234**, 1098 (1959).
845. Gladner J. A., Laki K., J. Amer. chem. Soc., **80**, 1263 (1958).
846. Glaser L., J. biol. Chem., **232**, 627 (1958).
847. Glaser L., J. biol. Chem., **234**, 2801 (1959).
848. Glaser L., J. biol. Chem., **235**, 2095 (1960).
849. Glaser L., Brown D. H., J. biol. Chem., **216**, 67 (1955).
850. Glaser L., Brown D. H., J. biol. Chem., **228**, 729 (1957).
851. Glasstone S., Text-Book of Physical Chemistry (London, Macmillan, 1940).
852. Glasziou K. T., Aust. J. biol. Sci., **9**, 253 (1956).
853. Glenn J. L., Crane F. L., Biochim. biophys. Acta, **22**, 111 (1956).
854. Glick D., Glaubach S., J. gen. Physiol., **25**, 197 (1941).
855. Glick D., Glaubach S., Moore D. H., J. biol. Chem., **144**, 525 (1942).
856. Glock G., McLean P., Biochem. J., **388** (1955).
857. Goldberg M., Gilmour D., Arch. Biochem. Biophys., **51**, 411 (1954).
858. Goldberger R., Smith A. L., Tisdale H., Bomstein R., J. biol. Chem., **236**, 2788 (1961).
859. Goldenberg V., Goldenberg H., McLaren A. D., J. Amer. chem. Soc., **72**, 5317 (1950).
860. Goldman D. S., J. biol. Chem., **208**, 345 (1954).
861. Goldman P., Vagelos P. R., J. biol. Chem., **236**, 2620 (1961).
862. Goldstein A., J. gen. Physiol., **27**, 529 (1944).
863. Goldstein F. B., J. biol. Chem., **234**, 2702 (1959).
864. Goldstone A., Adams E., J. biol. Chem., **237**, 3476 (1962).
865. Goldstone J. M., Magasanik B., Fed. Proc., **13**, 218 (1954).
866. Goldthwait D. A., Peabody R. A., Greenberg G. R., J. biol. Chem., **221**, 569 (1956).
867. Gomori G., J. biol. Chem., **148**, 139 (1943).
868. Goodlad G. A. J., Mills G. T., Biochem. J., **66**, 346 (1957).
869. Goodman I., Fouts J. R., Bresnick E., Menegas R., Hitchings G. H., Science, **130**, 450 (1959).
870. Goodman A., Weil R. M., Stern K. G., J. biol. Chem., **217**, 977 (1955).
871. Gordon A. H., Green D. E., Subrahmanyan V., Biochem. J., **34**, 764 (1940).
872. Gorini L., Maas W. K., Biochim. biophys. Acta, **25**, 208 (1957).
873. Gorini L., Maas W. K., in Symposium on the chemical Basis of Development, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, 1958).
874. Горяченкова Е. В., ДАН СССР, **87**, 457 (1952).
875. Gotto A. M., Kornberg H. L., Biochem. J., **81**, 273 (1961).
876. Gottschalk A., Aust. J. exp. Biol. med. Sci., **21**, 133 (1943).
877. Gottschalk A., Aust. J. exp. Biol. med. Sci., **23**, 261 (1945).
878. Gottschalk A., Biochem. J., **41**, 276 (1947).
879. Gottschalk A., Advanc. Carbohyd. Chem., **5**, 49 (1950).
880. Gottschalk A., Biochim. biophys. Acta, **23**, 645 (1957).
881. Gottschalk A., Advanc. Enzymol., **20**, 135 (1958).
882. Gottschalk A., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 461), 1960.
883. Graae J., Acta chem. scand., **8**, 356 (1954).
884. Granick S., Mauzerall D., J. biol. Chem., **232**, 1119 (1958).
885. Grant J. K., Brownie A. C., Biochim. biophys. Acta, **18**, 433 (1955).
886. Grant N. H., Robbins K. C., J. Amer. chem. Soc., **78**, 5888 (1956).
887. Grassmann W., Hannig K., Naturwiss., **37**, 397 (1950).
888. Grassmann W., Mayr O., Z. physiol. Chem., **214**, 185 (1933).
889. Grassmann W., Stadler R., Bender R., Liebigs Ann., **503**, 167 (1933).
890. Graves D. J., Fischer E. H., Krebs E. G., J. biol. Chem., **235**, 805 (1960).
891. Graves J. L., Vennesland B., Utter M. F., Pennington R. J., J. biol. Chem., **223**, 551 (1956).
892. Grazi E., Rowley P. T., Cheng T., Tchola O., Horecker B. L., Biochem. biophys. res. Comm., **9**, 38 (1962).
893. Green A. A., Cori G. T., J. biol. Chem., **151**, 21 (1943).
894. Green A. A., McElroy W. D., Biochim. biophys. Acta, **20**, 170 (1956).
895. Green A. L., Nicholls J. D., Biochem. J., **72**, 70 (1959).

896. Green D. E., Biochem. J., 30, 629 (1936).
897. Green D. E., Biochem. J., 30, 2095 (1936).
898. Green D. E., Proceedings of the Second International Conference on Biochemical Problems of Lipids, Ghent (London, Butterworths Scientific Publications, 1955), p. 233.
899. Green D. E., Disc. Faraday Soc., 37, 206 (1959).
900. Green D. E., Brosteaux J., Biochem. J., 30, 1489 (1936).
901. Green D. E., Dewan J. G., Leloir L. F., Biochem. J., 31, 934 (1937).
902. Green D. E., Herbert D., Subrahmanyan V., J. biol. Chem., 138, 327 (1941).
903. Green D. E., Mii S., Mahler H. R., Bock R. M., J. biol. Chem., 206, 1 (1954).
904. Green D. E., Needham D. M., Dewan J. G., Biochem. J., 31, 2327 (1937).
905. Green D. E., Oda T., J. Biochem., Tokyo, 49, 742 (1961).
906. Green D. E., Tisdale H. D., Criddle R. S., Chen P. Y., Bock R. M. Biochem. biophys. res. Comm., 5, 109 (1961).
907. Green J. R., Westley J., J. biol. Chem., 236, 3047 (1961).
908. Green M., Cohen S. S., J. biol. Chem., 219, 557 (1956).
909. Green M. N., Tsou K.-C., Bressler R., Seligman A. M., Arch. Biochem. Biophys., 57, 458 (1955).
910. Greenberg D. M., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 54), 1955.
911. Greenberg D. M., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 257), 1960.
912. Greenberg D. M., Bagot A. E., Roholt O. A., Arch. Biochem. Biophys., 62, 446 (1956).
913. Greenberg D. M., Mohamed M. S., Arch. Biochem., 8, 365 (1945).
914. Greenberg G. R., Jaenicke L., Silverman M., Biochim. biophys. Acta, 17, 589 (1955).
915. Greenstein J. P., J. nat. Cancer Inst., 2, 511 (1942).
916. Greenstein J. P., J. nat. Cancer Inst., 4, 55 (1943).
917. Greenstein J. P., Biochemistry of Cancer, 2nd ed. (New York, Academic Press, 1954).
918. Greenstein J. P., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2 p. 109), 1955.
919. Greenstein J. P., Carter C. E., Chalkley H. W., Leuthardt F. M., J. nat. Cancer Inst., 7, 9 (1946).
920. Greenstein J. P., Jenrette W. V., Mider G. B., White J., J. nat. Cancer Inst., 1, 687 (1941).
921. Greenstein J. P., Klemperer F. W., Wyman J., J. biol. Chem., 129, 681 (1939).
922. Greenstein J. P., Leuthardt F. M., J. nat. Cancer Inst., 6, 197 (1946).
923. Greenstein J. P., Leuthardt F. M., J. nat. Cancer Inst., 6, 317 (1946).
924. Greenstein J. P., Thompson J. W., J. nat. Cancer Inst., 4, 275 (1943).
925. Greenstein J. P., Werne J., Eschenbrenner A. B., Leuthardt F. M., J. nat. Cancer Inst., 5, 55 (1944).
926. Gregg D. C., Miller W. H., J. Amer. chem. Soc., 62, 1374 (1940).
927. Gregolin C., Singer T. P., Biochim. biophys. Acta, 67, 201 (1963).
928. Gregolin C., Singer T. P., Biochim. biophys. Acta, 57, 410 (1962).
929. Gregolin C., Singer T. P., Kearney E. B., Boeri E., Ann. N. Y. Acad. Sci., 94, 780 (1961).
930. Greville G. D., Chappell J. B., Biochim. biophys. Acta, 33, 267 (1959).
931. Greville G. D., Reich E., Biochim. biophys. Acta, 20, 440 (1956).
932. Griffiths D. E., Morrison J. F., Ennor A. H., Biochem. J., 65, 153 (1957).
933. Griffiths D. E., Wharton D. C., J. biol. Chem., 236, 1850 and 1857 (1961).
934. Grisolia S., Cardoso S., Biochim. biophys. Acta, 25, 430 (1957).
935. Grisolia S., Wallach D. P., Biochim. biophys. Acta, 18, 449 (1955).
936. Gross S. R., Gafford R. D., Tatum E. L., J. biol. Chem., 219, 781 (1956).
937. Grossowicz N., Halpern Y. S., J. biol. Chem., 228, 643 (1957).
938. Grossowicz N., Halpern Y. S., Nature, Lond., 177, 623 (1956).
939. Grover C. E., Chibnall A. C., Biochem. J., 21, 857 (1927).
940. Grunberg-Manago M., Ortiz P. J., Ochoa S., Biochim. biophys. Acta, 20, 269 (1956).
941. Gryder R. M., Pogell B. M., J. biol. Chem., 235, 558 (1960).
942. Guest J. R., Friedman S., Woods D. D., Smith E. L., Nature, Lond., 195, 340 (1962).
943. Guiditta A., Singer T. P., J. biol. Chem., 234, 666 (1959).
944. Guirard B. M., Snell E. E., Williams R. J., Arch. Biochem., 9, 361 (1946).
945. Gulland J. M., Jackson E. M., Biochem. J., 32, 590 (1938).

946. Gulland J. M., Jackson E. M., Biochem. J., **32**, 597 (1938).
947. Gunsalus I. C., in A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 545, 1954).
948. Gunsalus I. C., Barton L. S., Gruber W., J. Amer. chem. Soc., **78**, 1763 (1956).
949. Gunsalus I. C., Bellamy W. D., J. biol. Chem., **155**, 357 (1944).
950. Gunsalus I. C., Bellamy W. D., Umbreit W. W., J. biol. Chem., **155**, 685 (1944).
951. Gunsalus C. F., Stanier R. Y., Gunsalus I. C., J. Bact., **66**, 548 (1953).
952. Güntelberg A. V., Ottesen M., Nature, Lond., **170**, 802 (1952).
953. Güntelberg A. V., Ottesen M., C. R. Lab. Carlsberg (Sér. chim.), **29**, 36 (1953).
954. Gupta N. K., Robinson W. G., J. biol. Chem., **235**, 1609 (1960).
955. Gustafson T., Int. Rev. Cytol., **3**, 277 (1954).
956. Gutfreund H., Disc. Faraday Soc., № 17, «The Study of Fast Reactions», p. 220 (1954).
957. Gutfreund H., Disc. Faraday Soc., № 20, «The Physical Chemistry of Enzymes», p. 167 (1955).
958. Gutfreund H., Trans. Faraday Soc., **51**, 441 (1955).
959. Gutfreund H., Hammond B. R., Biochem. J., **73**, 526 (1959).
960. Gutfreund H., Sturtevant J. M., Biochem. J., **73**, 1 (1959).
961. Haas E., Harrer C. J., Hogness T. R., J. biol. Chem., **143**, 341 (1942).
962. Haas E., Horecker B. L., Hogness T. R., J. biol. Chem., **136**, 747 (1940).
963. Haas E., Lamfrom H., Goldblatt H., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 368 (1953).
964. Haas E., Lamfrom H., Goldblatt H., Arch. Biochem. Biophys., **44**, 63 (1953).
965. Habermann E., Biochem. J., **329**, 405 (1957).
966. Hageman R. H., Arnon D. I., Arch. Biochem. Biophys., **55**, 162 (1955).
967. Hager L. P., Geller D. M., Lipmann F., Fed. Proc., **13**, 734 (1954).
968. Hager L. P., Gunsalus I. C., J. Amer. chem. Soc., **75**, 5767 (1953).
969. Hager S. E., Gregerman R. I., Knox W. E., J. biol. Chem., **225**, 935 (1957).
970. Hagihara B., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 193), 1960.
971. Hagihara B., Horio T., Yamashita J., Nozaki M., Okunuki K., Nature, Lond., **178**, 629 (1956).
972. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K., J. Biochem., Tokyo, **45**, 185, 251 (1958).
973. Hagihara B., Morikawa I., Sekuzu I., Horio T., Okunuki K., Nature, Lond., **178**, 630 (1956).
974. Hagihara B., Sekuzu I., Tagawa K., Yoneda M., Okunuki K., Nature, Lond., **181**, 1588 (1958).
975. Hagihara B., Tagawa K., Nozaki M., Morikawa I., Yamashita J., Okunuki K., Nature, Lond., **179**, 249 (1957).
976. Hagihara B., Tagawa K., Sekuzu I., Morikawa I., Okunuki K., J. Biochem., Tokyo, **46**, 11 (1959).
977. Haines W. J., Recent Progr. Hormone Res., **7**, 255 (1952).
978. Hakim A. A., Nature, Lond., **183**, 334 (1959).
979. Haldane J. B. S., Enzymes (London, Longmans, 1930).
980. Haldane J. B. S., The Biochemistry of Genetics (London, Allen and Unwin, 1954).
981. Hall D. A., Biochem. J., **51**, 499 (1952).
982. Hall D. A., Czerkawski J. W., Biochem. J., **73**, 356 (1959).
983. Halliwell G., Biochem. J., **79**, 185 (1961).
984. Halpern Y. S., Grossowicz N., Biochem. J., **65**, 716 (1957).
985. Halsey Y. D., J. biol. Chem., **214**, 589 (1955).
986. Halvorson H. O., Advanc. Enzymol., **22**, 99 (1960).
987. Halvorson H., Ellias L., Biochim. biophys. Acta, **30**, 28 (1958).
988. Hammett L. P., Physical Organic Chemistry (New York, McGraw-Hill, 1940).
989. Hammond B. R., Gutfreund H., Biochem. J., **61**, 187 (1955).
990. Hammond B. R., Gutfreund H., Biochem. J., **72**, 349 (1959).
991. Hanahan D. J. Brockerhoff H., Barron E. J., J. biol. Chem., **235**, 1917 (1960).
992. Hanahan D. J., Chaikoff I. L., J. biol. Chem., **169**, 699 (1947).
993. Hanahan D. J., Chaikoff I. L., J. biol. Chem., **172**, 191 (1948).
994. Hanahan D. J., Vercamer R., J. Amer. chem. Soc., **76**, 1804 (1954).
995. Handler P., Bernheim M. L. C., Klein J. R., J. biol. Chem., **138**, 211 (1941).
996. Hanes C. S., Biochem. J., **26**, 1406 (1932).

997. Hanes C. S., Proc. roy. Soc., B, **128**, 421 (1940).
998. Hanes C. S., Proc. roy. Soc., B, **129**, 174 (1940).
999. Hanson H. T., Smith E. L., J. biol. Chem., **179**, 789 (1949).
1000. Harary I., Korey S. R., Ochoa S., J. biol. Chem., **203**, 595 (1953).
1001. Harbury H. A., J. Amer. chem. Soc., **75**, 4625 (1953).
1002. Harden A., Young W. J., Proc. roy. Soc., B, **77**, 405 (1906).
1003. Harden A., Young W. J., Proc. roy. Soc., B, **78**, 369 (1906).
1004. Hare M. L. C., Biochem. J., **22**, 968 (1928).
1005. Hargreaves A. B., Deutsch H. F., Cancer Res., **12**, 720 (1952).
1006. Harington C. R., Mead T. H., Biochem. J., **29**, 1602 (1935).
1007. Harington C. R., Rivers R. V., Pitt, Biochem. J., **38**, 417 (1944).
1008. Harris H., Human Biochemical Genetics (Cambridge University Press, 1959).
1009. Harris J. I., Sanger F., Naughton M. A., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 427 (1956).
1010. Harris R. J. C., ed., Protein Biosynthesis (London and New York, Academic Press, 1961).
1011. Harting J., Velick S. F., J. biol. Chem., **207**, 867 (1954).
1012. Hartley B. S., Proceedings of the fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, Symp. № 4 (Oxford, Pergamon Press, 1963).
1013. Hartley B. S., Massey V., Biochim. biophys. Acta, **21**, 58 (1956).
1014. Hartman P. E., Loper J. C., Serman D., J. gen. Microbiol., **22**, 323 (1960).
1015. Hartman S. C., Buchanan J. M., J. biol. Chem., **233**, 451 (1958).
1016. Hartman S. C., Buchanan J. M., J. biol. Chem., **233**, 456 (1958).
1017. Hartman S. C., Buchanan J. M., J. biol. Chem., **234**, 1812 (1959).
1018. Hartman W. J., Pogrund R. S., Drell W., Clark W. G., J. Amer. chem. Soc., **77**, 816 (1955).
1019. Hase E., J. Biochem., Tokyo, **39**, 259 (1952).
1020. Hass L. F., Boyer P. D., Reynard A. M., J. biol. Chem., **236**, 2284 (1961).
1021. Hassid W. Z., Doudoroff M., Advanc. Carbohyd. Chem., **5**, 29 (1950).
1022. Hassid W. Z., Doudoroff M., Advanc. Enzymol., **10**, 123 (1950).
1023. Hassid W. Z., Doudoroff M., Barker H. A., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 1014), 1951.
1024. Hatch M. D., Stumpf P. K., J. biol. Chem., **236**, 2879 (1961).
1025. Hatefi Y., Biochim. biophys. Acta, **34**, 183 (1959).
1026. Hatefi Y., Haavik A. G., Griffiths D. E., Biochem. biophys. res. Comm., **4**, 441 (1961).
1027. Hatefi Y., Osborn M. J., Kay L. D., Huennekens F. M., J. biol. Chem., **227**, 637 (1957).
1028. Hauge J. G., Crane F. L., Beinert H., J. biol. Chem., **219**, 727 (1956).
1029. Haughton B. G., King H. K., Biochem. J., **80**, 268 (1961).
1030. Hawkins R. D., Gunter J. M., Biochem. J., **40**, 192 (1946).
1031. Hawkins R. D., Mendel B., Biochem. J., **44**, 260 (1949).
1032. Hayaishi O., J. biol. Chem., **215**, 125 (1955).
1033. Hayaishi O., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol., 1, p. 668), 1955.
1034. Hayaishi O., Katagiri M., Rothberg S., J. biol. Chem., **229**, 905 (1957).
1035. Hayaishi O., Kornberg A., J. biol. Chem., **197**, 717 (1952).
1036. Hayaishi O., Kornberg A., J. biol. Chem., **206**, 647 (1954).
1037. Hayaishi O., Nishizuka Y., Tatibana M., Takeshita M., Kuno S., J. biol. Chem., **236**, 781 (1961).
1038. Hayaishi O., Rothberg S., Mehler A. H., Saito Y., J. biol. Chem., **229**, 889 (1957).
1039. Hayaishi O., Saito J., Jakoby W. B., Stohlman E. F., Arch. Biochem. Biophys., **56**, 554 (1955).
1040. Hayaishi O., Shimazono H., Katagiri M., Saito Y., J. Amer. chem. Soc., **78**, 5126 (1956).
1041. Hayaishi O., Stanier R. Y., J. Bact., **62**, 691 (1951).
1042. Hayano M., Dorfman R. I., Arch. Biochem. Biophys., **36**, 237 (1952).
1043. Hayano M., Dorfman R. I., J. biol. Chem., **211**, 227 (1954).
1044. Hayes J. E., Velick S. F., J. biol. Chem., **207**, 225 (1954).
1045. Heald K., Long C., Biochem. J., **59**, 316 (1955).
1046. Heath E. C., Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., Takagi Y., J. biol. Chem., **231**, 1031 (1958).
1047. Heath E. C., Hurwitz J., Horecker B. L., Ginsburg A., J. biol. Chem., **231**, 1009 (1958).
1048. Hecht L. I., Stephenson M. L., Zamecnik P. C., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **45**, 505 (1959).
1049. Hebre E. J., Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **54**, 18 (1943).

1050. Hehre E. J., Advanc. Enzymol., **11**, 297 (1951).
1051. Hehre E. J., Hamilton D. M., Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **71**, 336 (1949).
1052. Hehre E. J., Hamilton D. M., J. biol. Chem., **192**, 161 (1953).
1053. Hehre E. J., Hamilton D. M., Carlson A. S., J. biol. Chem., **177**, 267 (1949).
1054. Heimberg M., Velick S. F., J. biol. Chem., **208**, 725 (1954).
1055. Hele P., J. biol. Chem., **206**, 671 (1954).
1056. Helferich B., Ergebn. Enzymforsch., **2**, 74 (1933).
1057. Hellerman L., Perkins M. E., J. biol. Chem., **112**, 175 (1935).
1058. Hellerman L., Stock C. C., J. biol. Chem., **125**, 771 (1938).
1059. Hellig H., Popják G., J. Lipid Research, **2**, 235 (1961).
1060. Hellström N., Z. physik. Chem., A, **157**, 242 (1931).
1061. Henderson R. W., Morton R. K., Rawlinson W. A., Biochem. J., **72**, 340 (1959).
1062. Henderson R. W., Rawlinson W. A., Biochem. J., **62**, 21 (1956).
1063. Henion W. F., Sutherland E. W., J. biol. Chem., **224**, 477 (1957).
1064. Henning U., Möslein E. M., Lynen F., Arch. Biochem. Biophys., **83**, 259 (1959)
1065. Henri V., C.R. Acad. Sci., Paris, **135**, 916 (1902).
1066. Heppel L. A., Hilmoe R. J., J. biol. Chem., **183**, 129 (1950).
1067. Heppel L. A., Hilmoe R. J., J. biol. Chem., **188**, 665 (1951).
1068. Heppel L. A., Hilmoe R. J., J. biol. Chem., **192**, 87 (1951).
1069. Heppel L. A., Hilmoe R. J., J. biol. Chem., **198**, 683 (1952).
1070. Heppel L. A., Hilmoe R. J., J. biol. Chem., **202**, 217 (1953).
1071. Heppel L. A., Hurwitz J., Horecker B. L., J. Amer. chem. Soc., **79**, 630 (1957).
1072. Heppel L. A., Strominger J. L., Maxwell E. S., Biochim. biophys. Acta, **32**, 422 (1959).
1073. Heppel L. A., Porterfield V. T., J. biol. Chem., **176**, 763 (1948).
1074. Heppel L. A., Whitfeld P. R., Markham R., Biochem. J., **60**, 8 (1955).
1075. Herbert D., in Methods in Enzymology, ed. S.P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 753), 1955.
1076. Herbert D., Gordon H., Subrahmanyan V., Green D. E., Biochem. J., **34**, 1108 (1940).
1077. Herbert D., Pinsent J., Biochem. J., **43**, 193 (1948).
1078. Herbert D., Pinsent J., Biochem. J., **43**, 203 (1948).
1079. Hernandez H. H., Chaikoff I. L., J. biol. Chem., **228**, 447 (1957).
1080. Herriott R. M., J. gen. Physiol., **21**, 501 (1938).
1081. Herriott R. M., J. gen. Physiol., **22**, 65 (1938).
1082. Herriott R. M., J. gen. Physiol., **24**, 325 (1941).
1083. Herriott R. M., Northrop J. H., J. gen. Physiol., **18**, 35 (1934).
1084. Hers H. G., Biochim. biophys. Acta, **8**, 424 (1952).
1085. Hers H. G., Biochim. biophys. Acta, **8**, 416 (1952).
1086. Hers H. G., Biochim. biophys. Acta, **37**, 120 (1960).
1087. Hers H. G., Le Métaholisme du Fructose (Brussels, Arscia, 1957).
1088. Hers H. G., Kusaka T., Biochim. biophys. Acta, **11**, 427 (1953).
1089. Hestrin S., J. biol. Chem., **179**, 943 (1949).
1090. Hestrin S., Feingold D. S., Avigad G., Biochem. J., **64**, 340 (1956).
1091. Heyworth R., Walker P. G., Biochem. J., **83**, 331 (1962).
1092. Hickman J., Ashwell G., J. biol. Chem., **232**, 737 (1958).
1093. Hickman J., Ashwell G., J. biol. Chem., **234**, 758 (1959).
1094. Hickman J., Ashwell G., J. biol. Chem., **235**, 1566 (1960).
1095. Hift H., Mahler H. R., J. biol. Chem., **198**, 901 (1952).
1096. Hill R., Nature, Lond., **174**, 501 (1954).
1097. Hill R., Proceedings of the third International Congress of Biochemistry, Brussels (New York, Academic Press, p. 225, 1955).
1098. Hill R., Bendall F., Nature, Lond., **186**, 136 (1960).
1099. Hill R., Scarisbrick R., New Phytol., **50**, 98 (1951).
1100. Hill R., Whittingham C. P., Photosynthesis (London, Methuen, 1955).
1101. Hill R. L., Smith E. L., J. biol. Chem., **228**, 577 (1957).
1102. Hill R. L., Smith E. L., J. biol. Chem., **235**, 2332 (1960).
1103. Hill R. L., Swenson R. T., Schwartz H. C., J. biol. Chem., **235**, 3182 (1960).
1104. Hilmoe R. J., J. biol. Chem., **235**, 2117 (1960).
1105. Hilz H., Kittler M., Knape G., Biochem. Z., **332**, 151 (1959).
1106. Hilz H., Knappe J., Ringelmann E., Lynen F., Biochem. Z., **329**, 476 (1958).
1107. Hilz H., Lipmann F., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **41**, 880 (1955).
1108. Hird F. J. R., Rowsell E. V., Nature, Lond., **166**, 517 (1950).

1109. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H., J. biol. Chem., **235**, 633 (1960).
1110. Hirs C. H. W., Stein W. H., Moore S., J. biol. Chem., **211**, 941 (1954).
1111. Hirschmann H., J. biol. Chem., **235**, 2762 (1960).
1112. Hitchings G. H., Falco E. A., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **30**, 294 (1944).
1113. Hjertén S., Mosbach R., Anal. Biochem., **3**, 109 (1962).
1114. Hobson G. E., Rees K. R., Biochem. J., **65**, 305 (1957).
1115. Hobson P. N., Whelan W. J., Peat S., J. chem. Soc., p. 1451 (1951).
1116. Hochster R. M., Watson R. W., Arch. Biochem. Biophys., **48**, 120 (1954).
1117. Hockenhull D. J. D., Ashton G. C., Fantes K. H., Whitehead B. K., Biochem. J., **57**, 93 (1954).
1118. Hoffmann-Ostenhof O., Advanc. Enzymol., **14**, 219 (1953).
1119. Hoffmann-Ostenhof O., Kenedy J., Keck K., Gabriel O., Schönfellinger H. W., Biochim. biophys. Acta, **14**, 285 (1954).
1120. Hoffsten P. E., Hunter F. E., Gebicki J. M., Weinstein J., Biochem. biophys. res. Comm., **7**, 276 (1962).
1121. Hofmann E. C. G., Rapoport S., Biochim. biophys. Acta, **18**, 296 (1955).
1122. Hofmann K., Bergmann M., J. biol. Chem., **130**, 81 (1939).
1123. Hofmann K., Bergmann M., J. biol. Chem., **134**, 225 (1940).
1124. Hofstee B. H. J., J. biol. Chem., **179**, 633 (1949).
1125. Hofstee B. H. J., Nature, Lond., **184**, 1296 (1959).
1126. Hogeboom G. H., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 16), 1955.
1127. Hogeboom G. H., Kuff E. L., Schneider W. C., Int. Rev. Cytol., **6**, 425 (1957).
1128. Hogness D. S., Battley E. H., Fed. Proc., **16**, 197 (1957).
1129. Hogness D. S., Cohn M., Monod J., Biochim. biophys. Acta, **16**, 99 (1955).
1130. Hokin L. E., Biochem. J., **48**, 320 (1951).
1131. Holden M., Biochem. J., **78**, 359 (1961).
1132. Holden M., Pirie N. W., Biochem. J., **60**, 39 (1955).
1133. Hollander V., Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **53**, 179 (1943).
1134. Holley R. W., Brunngraber E. F., Saad F., Williams H. H., J. biol. Chem., **236**, 197 (1961).
1135. Holley R. W., Goldstein J., J. biol. Chem., **234** 1765 (1959).
1136. Hollmann S., Touster O., J. biol. Chem., **225**, 87 (1957).
1137. Holt A., Wold F., J. biol. Chem., **236**, 3227 (1961).
1138. Holt S. J., Proc. roy. Soc., B, **142**, 160 (1954).
1139. Holten D., Fromm H. J., J. biol. Chem., **236**, 2581 (1961).
1140. Holter H., Advanc. Enzymol., **13**, 1 (1952).
1141. Holter H., Proc. roy. Soc., B, **142**, 140 (1954).
1142. Holter H., Li S.-O., Acta chem. scand., **4**, 1321 (1950).
1143. Holton F. A., Colpa-Boonstra J., Biochem. J., **76**, 179 (1960).
1144. Holtz P., Credner K., Z. physiol. Chem., **280**, 1 (1944).
1145. Holtz P., Credner K., Walter H., Z. physiol. Chem., **262**, 111 (1939).
1146. Holtz P., Heise R., Spreyer W., Arch. exp. Path. Pharmak., **188**, 580 (1938).
1147. Holzer H., Beaucamp K., Biochim. biophys. Acta, **46**, 225 (1961).
1148. Holzer H., Holldorf A., Biochem. Z., **329**, 292 (1957).
1149. Holzer H., Kattermann R., Busch D., Biochem. biophys. res. Comm., **7**, 167 (1962).
1150. Holzer H., Schneider S., Biochim. biophys. Acta, **48**, 71 (1961).
1151. Hope D. B., Biochem. J., **59**, 497 (1955).
1152. Hope D. B., Smith D. B., Biochem. J., **74**, 101 (1960).
1153. Hopkins F. G., Biochem. J., **15** 286 (1921).
1154. Hopkins F. G., J. biol. Chem., **84**, 269 (1929).
1155. Hopkins F. G, Presidential Address at the Anniversary Meeting of the Royal Society Proc. roy. Soc., B, **112**, 159 (1932).
1156. Hopkins F. G., Presidential Address to the British Association for the Advancement of Science (1933).
1157. Hopkins F. G., Morgan E. J., Biochem. J., **42**, 23 (1948).
1158. Hopkins F. C., Morgan E. J., Lutwak-Mann C., Biochem. J. **32**, 1829 (1938).
1159. Horecker B. L., J. biol. Chem. **183**, 593 (1950).
1160. Horecker B. L., Hurwitz J., Heppel L. A., J. Amer. chem. Soc., **79**, 701 (1957).
1161. Horecker B. L., Hurwitz J., Smyrniotis P. Z., J. Amer. chem. Soc., **78**, 692 (1956).
1162. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., J. Amer. chem. Soc., **75**, 1009 (1953).
1163. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., J. biol. Chem., **212**, 811 (1955).
1164. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., Hurwitz J., J. biol. Chem., **223**, 1009 (1956).

1165. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., Seegmiller J. E., J. biol. Chem., **193**, 383 (1951).
1166. Horio T., Higashi T., Sasagawa M., Kusai K., Nakai M., Okunuki K., Biochem. J., **77**, 194 (1960).
1167. Horio T., Higashi T., Yamanaka T., Matsubara H., Okunuki K., J. biol. Chem., **236**, 944 (1961).
1168. Horio T., Kamen M. D., Biochim. biophys. Acta, **48**, 266 (1961).
1169. Horio T., Yamashita J., Okunuki K., Biochim. biophys. Acta, **32**, 593 (1959).
1170. Hosoya T., J. Biochem., Tokyo, **47**, 369 (1960).
1171. Hosoya T., J. Biochem., Tokyo, **48**, 37 (1960).
1172. Hosoya T., J. Biochem., Tokyo, **48**, 178 (1960).
1173. Hosoya T., Kondo Y., Ui N., J. Biochem., Tokyo, **52**, 180 (1962).
1174. Hosoya T., Ui N., Nature, Lond., **192**, 4803 (1961).
1175. Howard B. H., Jones G., Purdom M. R., Biochem. J., **74**, 173 (1960).
1176. Huang H. T., U. S. Pat. 2944943, Chem. Abstracts, **54**, 20073 (1960).
1177. Huang H. T., Niemann C., J. Amer. chem. Soc., **74**, 4634 (1952).
1178. Hubbard R., J. gen. Physiol., **39**, 935 (1956).
1179. Hübener H. J., Sahrholz F. G., Biochem. Z., **333**, 95 (1960).
1180. Hübscher G., Baum H., Mahler H. R., Biochim. biophys. Acta, **23**, 43 (1957).
1181. Huennekens F. M., Fed. Proc., **16**, 199 (1957).
1182. Huennekens F. M., Hatefi Y., Kay L., J. biol. Chem., **224**, 435 (1957).
1183. Huennekens F. M., Mahler H. R., Nordmann J., Arch. Biochem., **30**, 77 (1951).
1184. Huennekens F. M., Nurk E., Gabrio B. W., J. biol. Chem., **221**, 971 (1956).
1185. Huennekens F. M., Osborn M. J., Advanc. Enzymol., **21**, 369 (1959).
1186. Hughes D. E., Williamson D. H., Biochem. J., **51**, 45 (1952).
1187. Hughes N. A., Kenner G. W., Todd A. R., J. chem. Soc., p. 3733 (1957).
1188. Hultin E., Nordström L., Acta chem. scand., **3**, 1405 (1949).
1189. Humphrey G. F., Biochem. J., **65**, 546 (1957).
1190. Hunt A. L., Biochem. J., **72**, 1 (1959).
1191. Hunter A., Downs C. E., J. biol. Chem., **157**, 427 (1945).
1192. Hurlbert R. B., Reichard P., Acta chem. scand., **9**, 251 (1955).
1193. Hurwitz J., J. biol. Chem., **205**, 935 (1953).
1194. Hurwitz J., Fed. Proc., **15**, 278 (1956).
1195. Hurwitz J., J. biol. Chem., **234**, 2351 (1959).
1196. Hurwitz J., Bresler A. E., J. biol. Chem., **236**, 542 (1961).
1197. Hurwitz J., Heppel L. A., Horecker B. L., J. biol. Chem., **226**, 525 (1957).
1198. Hurwitz J., Horecker B. L., J. biol. Chem., **223**, 993 (1956).
1199. Hurwitz J., Weissbach A., Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., J. biol. Chem., **218**, 769 (1956).
1200. Hutton R., Westheimer F., Tetrahedron, **3**, 73 (1958).
1201. Huxley H. E., Zubay G., J. mol. Biol., **2**, 10 (1960).
1202. Hylin J. W., Wood J. L., J. biol. Chem., **234**, 2141 (1959).
1203. Ichihara A., Greenberg D. M., J. biol. Chem., **225**, 949 (1957).
1204. Ichihara A., Ichihara E. A., J. Biochem., Tokyo, **49**, 154 (1961).
1205. Ichihara K., Uchida M., Matsuda K., Kumagai N., Kikuoka H., Z. physiol. Chem., **295**, 220 (1953).
1206. Ikehata H., J. gen. appl. Microbiol., **6**, 30 (1960).
1207. Illingworth B., Jansz H. S., Brown J. H., Cori C. F., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **44**, 1180 (1958).
1208. Imsande J., J. biol. Chem., **236**, 1494 (1961).
1209. Imsande J., Handler P., J. biol. Chem., **236**, 525 (1961).
1210. Inaoka M., Soda H., Nature, Lond., **178**, 202 (1956).
1211. Ingold C. K., Structure and Mechanism in Organic Chemistry (London, G. Bell, 1953).
1212. Ingraham L. L., Makower B., J. phys. Chem., **58**, 266 (1954).
1213. Ingram V. M., Nature, Lond., **183**, 1795 (1959).
1214. Ingram V. M., Proceedings of the fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, Symp. № 1 (Oxford, Pergamon Press, 1963).
1215. Irving G. W., Fruton J. S., Bergmann M., J. biol. Chem., **138**, 231 (1941).
1216. Isherwood F. A., Mapson L. W., Chen Y. T., Biochem. J., **76**, 157 (1960).
1217. Ishihara Y., Saito T., Ito Y., Fujino M., Nature, Lond., **181**, 1468 (1958).
1218. Isselbacher K. J., J. biol. Chem., **232**, 429 (1958).
1219. Isselbacher K. J., Axelrod J., J. Amer. chem. Soc., **77**, 1070 (1955).

1220. Ito E., Strominger J. L., J. biol. Chem., **237**, 2689 (1962).
1221. Ito E., Strominger J. L., J. biol. Chem., **237**, 2696 (1962).
1222. Ito N., Grisolia S., J. biol. Chem., **234**, 242 (1959).
1223. Izumiya N., Fruton J. S., J. biol. Chem., **218**, 59 (1956).
1224. Jacob F., Monod J., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, **26**, 193 (1961).
1225. Jacob F., Monod J., J. mol. Biol., **3**, 318 (1961).
1226. Jacobs E. E., Sanadi D. R., J. biol. Chem., **235** 531 (1960).
1227. Jacobsen C. F., C. R. Lab. Carlsberg (Sér. chim), **25**, 325 (1947).
1228. Jacobsen C. F., Léonis J., Linderstrøm-Lang K., Ottesen M., Methods of Biochemical Analysis, **4**, 171 (1957).
1229. Jaenicke L., Brode E., Biochem. Z., **334**, 108 (1961).
1230. Jaenicke L., Lynen F., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 3, p. 3), 1960.
1231. Jagannathan V., Singh K., Damodaran M., Biochem. J. **63**, 94 (1956).
1232. Jakoby W. B., J. biol. Chem., **207**, 657 (1954).
1233. Jakoby W. B., J. biol. Chem., **232**, 75 (1958).
1234. Jakoby W. B., Bonner D. M., J. biol. Chem., **221**, 689 (1956).
1235. Jakoby W. B., Brummond D. O., Ochoa S., J. biol. Chem., **218**, 811 (1956).
1236. Jakoby W. B., Fredericks J., J. biol. Chem., **234**, 2145 (1959).
1237. Jakoby W. B., Fredericks J., Biochim. biophys. Acta, **48**, 26 (1961).
1238. Jakoby W. B., Ohmura E., Hayaishi O., J. biol. Chem., **222**, 435 (1956).
1239. Jakoby W. B., Scott E. M., J. biol. Chem., **234**, 937 (1959).
1240. Jansen E. F., Balls A. K., J. biol. Chem., **137**, 459 (1941).
1241. Jansen E. F., Balls A. K., J. biol. Chem., **194**, 721 (1952).
1242. Jansen E. F., Jang R., Balls A. K., J. biol. Chem., **196**, 247 (1952).
1243. Jansen E. F., Jang R., MacDonald L. R., Arch. Biochem., **15**, 415 (1947).
1244. Jansen E. F., Nutting M.-D. F., Balls A. K., J. biol. Chem., **175**, 975 (1948).
1245. Jansen E. F., Nutting M.-D. F., Balls A. K., J. biol. Chem., **179**, 189, 201 (1949).
1246. Jansen E. F., Nutting M.-D. F., Jang R., Balls A. K., J. biol. Chem., **185**, 209 (1950).
1247. Jansz H. S., Brons D., Warringa M. G. P., Biochim. biophys. Acta, **34**, 573 (1959).
1248. Jansz H. S., Posthumus C. H., Cohen J. A., Biochim. biophys. Acta, **33**, 387, 396 (1959).
1249. Jaques L. B., J. biol. Chem., **133**, 445 (1940).
1250. Jaques L. B., Cho M. H., Biochem. J., **58**, xxv (1954).
1251. Jarabak J., Talalay P., J. biol. Chem., **235**, 2147 (1960).
1252. Järnefelt J., Basford R. E., Tisdale H. D., Green D. E., Biochim. biophys. Acta, **29**, 123 (1958).
1253. Jenkins W. T., Sizer I. W., J. biol. Chem., **235**, 620 (1960).
1254. Jenkins W. T., Yphantis D. A., Sizer I. W., J. biol. Chem., **234**, 51 (1959).
1255. Jeuniaux C., Biochem. J., **66**, 29P (1957).
1256. Jeuniaux C., Arch. Int. Physiol. Biochim., **67**, 597 (1959).
1257. Jeuniaux C., Arch. Int. Physiol. Biochim., **68**, 684 (1960).
1258. Johnson M., Kaye M. A. G., Hems R., Krebs H. A., Biochem. J., **54**, 625 (1953).
1259. Johnston R. B., J. biol. Chem., **221**, 1037 (1956).
1260. Jollès P., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 431), 1960.
1261. Jollès G., Fromageot C., Biochim. biophys. Acta, **11**, 95 (1953).
1262. Jollès G., Fromageot C., Biochim. biophys. Acta, **14**, 219 (1954).
1263. Jollès P., Fromageot C., Biochim. biophys. Acta, **19**, 91 (1956).
1264. Jones M. E., Lipmann F. L., Hilz H., Lynen F., J. Amer. chem. Soc., **75**, 3285 (1953).
1265. Jones M. E., Spector L., J. biol. Chem., **235**, 2897 (1960).
1266. Jones M. E., Spector L., Lipmann F., J. Amer. chem. Soc., **77**, 819 (1955).
1267. Jones N. R., Biochem. J., **60**, 81 (1955).
1268. Josephson K., Z. physiol. Chem., **134**, 50 (1924).
1269. Joshi J. G., Handler P., J. biol. Chem., **235**, 2981 (1960).
1270. Josse J., Kaiser A. D., Kornberg A., J. biol. Chem., **236**, 864 (1961).
1271. Jowett M., Quastel J. H., Biochem. J., **27**, 486 (1932).

1272. Joyce B. K., Grisolia S., J. biol. Chem., **233**, 350 (1958).
1273. Joyce B. K., Grisolia S., J. biol. Chem., **234**, 1330 (1959).
1274. Joyce B. K., Grisolia S., J. biol. Chem., **235**, 2278 (1960).
1275. Jukes T. H., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 48, 1809 (1962).
1276. Julian G. R., Wolfe R. G., Reithel F. J., biol. Chem., **236**, 754 (1961).
1277. Junge J. M., Stein E. A., Neurath H., Fischer E. H., I. biol. Chem., **234**, 556 (1959).
1278. Juni E., J. biol. Chem., **195**, 715 (1952).
1279. Junowicz-Kocholaty R., Hogness T. R., J. biol. Chem., **129**, 569 (1939).
1280. Kacser H., Disc. Faraday Soc., № 20, «The Physical Chemistry of Enzymes», p. 283 (1955).
1281. Kägi J. H. R., Vallee B. L., J. biol. Chem., **235**, 3188 (1960).
1282. Kahana S. E., Lowry O. H., Schulz D. W., Passonneau J. V., Crawford E. J., J. biol. Chem., 235, 2178 (1960).
1283. Kalckar H. M., J. biol. Chem., **153**, 355 (1944).
1284. Kalckar H. M., J. biol. Chem., **158**, 313 (1945).
1285. Kalckar H. M., J. biol. Chem., **167**, 445 (1947).
1286. Kalckar H. M., J. biol. Chem., **167**, 461 (1947).
1287. Kalckar H. M., J. biol. Chem., **167**, 477 (1947).
1288. Kalckar H. M., Pubbl. Staz. zool. Napoli, **23**, Suppl. 87 (1951).
1289. Kalckar H. M., Biochim. biophys. Acta, **12**, 250 (1953).
1290. Kalckar H. M., Braganca B., Munch-Petersen A., Nature, Lond., **172**, 1038 (1953).
1291. Kalckar H. M., MacNutt W. S., Hoff-Jørgensen E., Biochem. J., **50**, 397 (1952).
1292. Kalf G. F., Rieder S. V., J. biol. Chem., **230**, 691 (1958).
1293. Kallio R. E., J. biol. Chem., **192**, 371 (1951).
1294. Kallio R. E., Larson A. D., in A Symposium on Amino Acid Metabolism ed. W. D. McElroy and H. B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 616), 1955.
1295. Kalnitsky G., Anderson E. E., Biochim. biophys. Acta, **16**, 302 (1955).
1296. Kalow W., Staron N., Canad. J. Biochem. Physiol., **35**, 1305 (1957).
1297. Kalyankar G. D., Meister A., J. biol. Chem., **234**, 3110 (1959).
1298. Kamen M. D., Takeda Y., Biochim. biophys. Acta, **21**, 518 (1956).
1299. Kaplan N. O., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 681), 1955.
1300. Kaplan N. O., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 3, p. 873), 1957.
1301. Kaplan N. O., in Steric Course of Microbiological Reactions, CIBA Foundation Study Group № 2 (London, Churchill, p. 37, 1959).
1302. Kaplan N. O. in The Enzymes 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 3, p. 105), 1960.
1303. Kaplan N. O., Ciotti M. M., Biochim. biophys. Acta, 49, 425 (1961).
1304. Kaplan N. O., Ciotti M. M., Stolzenbach F. E., Bachur N. R., J. Amer. chem. Soc., **77**, 815 (1955).
1305. Kaplan N. O., Colowick S. P., Ciotti M. M., J. biol. Chem., **194**, 579 (1952).
1306. Kaplan N. O., Colowick S. P. Neufeld E. F. J. biol. Chem., **195**, 107 (1952).
1307. Kaplan N. O., Colowick S. P., Neufeld E. F., J. biol. Chem., **205**, 1 (1953).
1308. Kaplan H. S., Heppel L. A., J. biol. Chem., **222**, 907 (1956).
1309. Karasek M. A., Greenberg D. M., J. biol. Chem., **227**, 191 (1957).
1310. Karrer P., Krishna H., Helv. chim. Acta, **33**, 555 (1950).
1311. Karrer P., Schöpp K., Benz F., Helv. chim. Acta, **18**, 426 (1935).
1312. Kassel B., Fed. Proc., **18**, 257 (1959).
1313. Katagiri H., Yamada H., Imai K., J. Biochem., Tokyo, **46**, 1119 (1959).
1314. Katagiri M., Hayaishi O., J. biol. Chem., **226**, 439 (1957).
1315. Katchman B., Betheil J. J., Schepartz A. I., Sanadi D. R. Arch. Biochem. Biophys., **34**, 437 (1951).
1316. Kaufman S., J. biol. Chem., **216**, 153 (1955).
1317. Kaufman S., J. biol. Chem., **234**, 2677 (1959).
1318. Kaufman S., Alivasatos S. G. A., J. biol. Chem., **216**, 141 (1955).
1319. Kaufman S., Gilvarg C., Cori O., Ochoa S., J. biol. Chem., **203**, 869 (1953).
1320. Kaufman S., Korkes S., del Campillo A., J. biol. Chem., **192**, 301 (1951).
1321. Kaufman S., Levenberg B., J. biol. Chem., **234**, 2683 (1959).
1322. Kaufman S., Neurath H., Arch. Biochem., **21**, 437 (1949).
1323. Kawahara F. S., Talalay P., J. biol. Chem., **235**, PC1 (1960).

1324. Kay H. D., Biochem. J., 22, 855 (1928).
1325. Kaziro Y., Leone E., Ochoa S., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., 46, 1319 (1960).
1326. Kaziro Y., Ochoa S., Warner R. C., Chen J., J. biol. Chem., 236, 1917 (1961).
1327. Kearney E. B., J. biol. Chem., 194, 747 (1952).
1328. Kearney E. B., J. biol. Chem., 235, 865 (1960).
1329. Kearney E. B., Singer T. P., Arch. Biochem. Biophys., 33, 377, 397, 414 (1951).
1330. Kearney E. B., Singer T. P., J. biol. Chem., 219, 963 (1956).
1331. Keilin D., Proc. roy. Soc., B, 98, 312 (1925).
1332. Keilin D., Proc. roy. Soc., B, 104, 206 (1929).
1333. Keilin D., Proc. roy. Soc., B, 106, 418 (1930).
1334. Keilin D., Ergebn. Enzymforsch., 2, 239 (1933).
1335. Keilin D., Nature, Lond., 133, 290 (1934).
1336. Keilin D., Hartree E. F., Proc. roy. Soc., B, 119, 141 (1936).
1337. Keilin D., Hartree E. F., Proc. roy. Soc., B, 121, 173 (1936).
1338. Keilin D., Hartree E. F., Proc. roy. Soc., B, 122, 298 (1937).
1339. Keilin D., Hartree E. F., Proc. roy. Soc., B, 124, 397 (1938).
1340. Keilin D., Hartree E. F., Proc. roy. Soc., B, 125, 171 (1938).
1341. Keilin D., Hartree E. F., Proc. roy. Soc., B, 127, 167 (1939).
1342. Keilin D., Hartree E. F., Proc. roy. Soc., B, 129, 277 (1940).
1343. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J., 42, 221 (1948).
1344. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J., 50, 331 (1952).
1345. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J., 50, 341 (1952).
1346. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J., 61, 153 (1955).
1347. Keilin D., Mann T., Proc. roy. Soc., B, 122, 119 (1937).
1348. Keilin D., Mann T., Proc. roy. Soc., B, 125, 187 (1938).
1349. Keilin D., Mann T., Nature, Lond., 143, 23 (1939).
1350. Keilin J., Biochem. J., 64, 663 (1956).
1351. Keister D. L., San Pietro A., Stolzenbach F. E., J. biol. Chem., 235, 2989 (1960).
1352. Keller P. J., Cohen E., Neurath H., J. biol. Chem., 223, 457 (1956).
1353. Keller P. J., Cohen E., Neurath H., J. biol. Chem., 230, 905 (1958).
1354. Keller P. J., Cohen E., Neurath H., J. biol. Chem., 233, 344 (1958).
1355. Keller P. J., Cori G. T., J. biol. Chem., 214, 127 (1955).
1356. Kellerman G. M., J. biol. Chem., 231, 427 (1958).
1357. Kendal L. P., Ramanathan A. N., Biochem. J., 52, 430 (1952).
1358. Kendall E. C., McKenzie B. K., Mason H. L., J. biol. Chem., 84, 657 (1929).
1359. Kendrew J. C., Watson H. C., Strandberg B. E., Dickerson R. E., Phillips D. C., Shore V. C., Nature, Lond., 190, 666 (1961).
1360. Kennedy E. P., Weiss S. B., J. biol. Chem., 222, 193 (1956).
1361. Kenney F. T., J. biol. Chem., 234, 2707 (1959).
1362. Kent A. B., Krebs E. G., Fischer E. H., J. biol. Chem., 232, 549 (1958).
1363. Kenten R. H., Biochem. J., 67, 25 (1957).
1364. Kenten R. H., Mann P. J. G., Biochem. J., 57, 347 (1954).
1365. Kern M., Racker E., Arch. Biochem. Biophys., 48, 235 (1954).
1366. Kerr R. W., Cleveland F. C., Katzbeck W. J., J. Amer. chem. Soc., 73, 3916 (1951).
1367. Kertész D. Zito R., Nature, Lond., 179, 1017 (1957).
1368. Keston A. S., Science, 120, 355 (1954).
1369. Keston A. S., Fed. Proc., 14, 234 (1955).
1370. Khorana H. G., Fernandes J. F., Kornberg A., J. biol. Chem., 230, 941 (1958).
1371. Kidder G. W., Dewey V. C., Arch. Biochem., 8, 293 (1945).
1372. Kidder G. W., Dewey V. C., Arch. Biochem., 20, 433 (1949).
1373. Kielley R. K., Fed. Proc., 14, 235 (1955).
1374. Kielley W. W., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 159), 1961.
1375. Kielley W. W., Bradley L. B., J. biol. Chem., 206, 327 (1954).
1376. Kielley W. W., Kalckar H. M., Bradley L. B., J. biol. Chem. 219, 95 (1956).
1377. Kielley W. W., Meyerhof O., J. biol. Chem., 176, 591 (1948).
1378. Kilby B. A., Youatt G., Biochem. J., 57, 303 (1954).
1379. Kilgore W. W., Starr M. P., J. biol. Chem., 234, 2227 (1959).
1380. Kimmel J. R., Smith E. L., Advanc. Enzymol., 19, 267 (1957).
1381. Kimmel J. R., Smith E. L., J. biol. Chem., 207, 515 (1954).
1382. Kindler S. H., Gilvarg C., J. biol. Chem., 235, 3532 (1960).
1383. King E. L., Altman C., J. phys. Chem., 60, 1375 (1956).

1384. King R. J. B., Biochem. J., 79, 361 (1961).
1385. King T. E., Cheldelin V. H., J. biol. Chem., 220, 177 (1956).
1386. King T. E., Lee C. P., Biochim. biophys. Acta, 37, 342 (1960).
1387. Kinsky S. C., J. biol. Chem., 235, 94 (1960).
1388. Kirk P. L., Advanc. Protein Chem., 3, 139 (1947).
1389. Kirkland R. J. A., Turner J. F., Biochem. J., 72, 716 (1959).
1390. Kisliuk R. L., Sakami W., J. biol. Chem., 214, 47 (1955).
1391. Kistiakowsky G. B., Lumry R., J. Amer. chem. Soc., 71, 2006 (1949).
1392. Kitahara K., Obayashi A., Fukui S., Enzymologia, 15, 259 (1953).
1393. Klee W. A., Richards F. M., J. biol. Chem., 229, 489 (1957).
1394. Klee W. A., Richards H. H., Cantoni G. L., Biochim. biophys. Acta, 54, 157 (1961).
1395. Klein A. O., Vishniac W., J. biol. Chem., 236, 2544 (1961).
1396. Kleiner I. S., Tauber H., J. biol. Chem., 96, 755 (1932).
1397. Klenow H., Andersen B., Biochim. biophys. Acta, 23, 92 (1957).
1398. Kline D. L., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 139), 1955.
1399. Klingman J. D., Handler P., J. biol. Chem., 232, 369 (1958).
1400. Klotz I. M., in A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 257), 1954.
1401. Klotz I. M., Loh Ming W.-C., J. Amer. chem. Soc., 76, 805 (1954).
1402. Klotz I. M., Walker F. M., Pivan R. B., J. Amer. chem. Soc., 68, 1486 (1946).
1403. Knappe J., Ringelmann E., Lynen F., Biochem. Z., 332, 195 (1959).
1404. Knappe J., Schlegel H.-G., Lynen F., Biochem. Z., 335, 101 (1961).
1405. Kneen E., Beckord L. D., Arch. Biochem., 10, 41 (1946).
1406. Knivett V. A., Biochem. J., 56, 602 (1954).
1407. Knox W. E., J. biol. Chem., 163, 699 (1946).
1408. Knox W. E., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 289), 1955.
1409. Knox W. E., Edwards S. W., J. biol. Chem., 216, 479 (1955).
1410. Knox W. E., Le May-Knox M., Biochem. J., 49, 686 (1951).
1411. Knox W. E., Pitt B. M., J. biol. Chem., 225, 675 (1957).
1412. Kobayasi S., J. Biochem., Tokyo, 33, 301 (1941).
1413. Koch A. L., J. biol. Chem., 223, 535 (1956).
1414. Kochakian C. D., Carroll B. R., Uhri B., J. biol. Chem., 224, 811 (1957).
1415. Kocholaty W., Krejci L. E., Arch. Biochem., 18, 1 (1948).
1416. Koerner J. F., Sinsheimer R. L., J. biol. Chem., 228, 1039, 1049 (1957).
1417. Koelle G. B., J. Pharmacol., 88, 232 (1946).
1418. Koelle G. B., Biochem. J., 53, 217 (1953).
1419. Koike M., Shah P. C., Reed L. J., J. biol. Chem., 235, 1939 (1960).
1420. Kojima Y., Itada N., Hayaishi O., J. biol. Chem., 236, 2223 (1961)
1421. Kooiman P., Biochim. biophys. Acta, 13, 338 (1954).
1422. Korn E. D., Buchanan J. M., J. biol. Chem., 217, 183 (1955).
1423. Korn E. D., Payza A. N., Biochim. biophys. Acta, 20, 596 (1956).
1424. Korn E. D., Payza A. N., J. biol. Chem., 223, 859 (1956).
1425. Korn E. D., Quigley T. W., J. biol. Chem., 226, 833 (1957).
1426. Kornberg A., J. biol. Chem., 182, 779 (1950).
1427. Kornberg A., J. biol. Chem., 182, 805 (1950).
1428. Kornberg A., in A Symposium on Phosphorus Metabolism, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, Vol. 1, p. 392), 1951.
1429. Kornberg A., Science, 131, 1503 (1960).
1430. Kornberg A., Kornberg S. R., Simms E. S., Biochim. biophys. Acta, 20, 215 (1956).
1431. Kornberg A., Lehman I. R., Simms E. S., Fed. Proc., 15, 291 (1956).
1432. Kornberg A., Lieberman I., Simms E. S., J. Amer. chem. Soc., 76, 2844 (1954).
1433. Kornberg A., Lieberman I., Simms E. S., J. biol. Chem., 215, 417 (1955).
1434. Kornberg A., Pricer W. E., J. biol. Chem., 182, 763 (1950).
1435. Kornberg A., Pricer W. E., J. biol. Chem., 186, 557 (1950).
1436. Kornberg A., Pricer W. E., J. biol. Chem., 189, 123 (1951).
1437. Kornberg A., Pricer W. E., J. biol. Chem., 191, 535 (1951).
1438. Kornberg A., Pricer W. E., J. biol. Chem., 193, 481 (1951).
1439. Kornberg A., Pricer W. E., J. biol. Chem., 204, 329 (1953).
1440. Kornberg A., Pricer W. E., J. biol. Chem., 204, 345 (1953).
1441. Kornberg H. L., Beevers H., Biochim. biophys. Acta, 26, 531 (1957).
1442. Kornberg H. L., Elsden S. R., Advanc. Enzymol., 23, 401 (1961).

1443. Kornberg S. R., Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A., J. biol. Chem., **233**, 159 (1958).
1444. Kornberg S. R., J. biol. Chem., **218**, 23 (1956).
1445. Kornberg S. R., Zimmerman S. B., Kornberg A., J. biol. Chem., **236**, 1487 (1961).
1446. Kornfeld S., Glaser L., J. biol. Chem., **236**, 1791 (1961).
1447. Korzenovsky M., Diller E. R., Marshall A. C., Auda B. M., Biochem. J., **76**, 238 (1960).
1448. Koshland D. E., Biol. Rev., **28**, 416 (1953).
1449. Koshland D. E., Erwin M. J., J. Amer. chem. Soc., **79**, 2657 (1957).
1450. Koshland D. E., Ray W. J., Erwin M. J., Fed. Proc., **17**, 1145 (1958).
1451. Koshland D. E., Stein S. S., J. biol. Chem., **208**, 139 (1954).
1452. Koszalka T. R., Falkenheim R., Altman K. I., Biochim. biophys. Acta, **23**, 647 (1957).
1453. Koukol J., Conn E. E., J. biol. Chem., **236**, 2692 (1961).
1454. Kovachevich R., Wood W. A., J. biol. Chem., **213**, 745 (1955).
1455. Kovachevich R., Wood W. A., J. biol. Chem., **213**, 757 (1955).
1456. Krahl M. E., Biochim. biophys. Acta, **20**, 27 (1956).
1457. Krampitz L. O., Suzuki I., Greull G., Fed. Proc., **20**, 971 (1961).
1458. Kream J., Chargaff E., J. Amer. chem. Soc., **74**, 5157 (1952).
1459. Krebs E. G., Fischer E. H., Biochim. biophys. Acta, **20**, 150 (1956).
1460. Krebs E. G., Kent A. B., Fischer E. H., J. biol. Chem., **231**, 73 (1958).
1461. Krebs E. G., Rafter G. W., Junge J. M., J. biol. Chem., **200**, 479 (1953).
1462. Krebs H. A., Biochem. Z., **220**, 283 (1930).
1463. Krebs H. A., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 499), 1951.
1464. Krebs H. A., Hems R., Biochim. biophys. Acta, **12**, 172 (1953).
1465. Krebs H. A., Roughton F. J. W., Biochem. J., **43**, 550 (1948).
1466. Krieble V. K., Wieland W. A., J. Amer. chem. Soc., **43**, 164 (1921).
1467. Krishnan P. S., Arch. Biochem., **20**, 272 (1949).
1468. Krishnaswamy P. R., Giri K. V., Biochem. J., **62**, 301 (1956).
1469. Krishnaswamy P. R., Meister A., J. biol. Chem., **235**, 408 (1960).
1470. Krupka R. M., Laidler K. J., J. Amer. chem. Soc., **83**, 1445 (1961).
1471. Krupka R. M., Laidler K. J., J. Amer. chem. Soc., **83**, 1448 (1961).
1472. Kubo H., Yamano T., Iwatsubo M., Watari H., Soyama T., Shiraishi J., Sawada S., Kawashima N., Proc. Int. Symp. on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto, p. 345 (1957).
1473. Kubowitz F., Biochem. Z., **292**, 221 (1937).
1474. Kubowitz F., Biochem. Z., **299**, 32 (1938).
1475. Kubowitz F., Haas E., Biochem. Z., **255**, 247 (1932).
1476. Kubowitz F., Ott P., Biochem. Z., **314**, 94 (1943).
1477. Kubowitz F., Ott P., Biochem. Z., **317**, 193 (1944).
1478. Kuby S. A., Lardy H. A., J. Amer. chem. Soc., **75**, 890 (19553.
1479. Kuby S. A., Noda L., Lardy H. A., J. biol. Chem., **209**, 191 (1954).
1480. Kuby S. A., Noda L., Lardy H. A., J. biol. Chem., **210**, 65 (1954).
1481. Kuff E. L., Hogeboom G. H., Dalton A. J., J. biophys. biochem. Cytol., **2**, 33 (1956).
1482. Kuhn R., Reinemund K., Weygand F., Strobele R., Ber. dtsch. chem. Ges., **68**, 1765 (1935).
1483. Kuhn R., Wagner-Jauregg T., Ber. dtsch. chem. Ges., **67**, 361 (1934).
1484. Kühnau J., Biochem. Z., **243**, 14 (1931).
1485. Kühne W., Unters. a. d. physiol. Institut der Univ. Heidelberg, **1**, 291 (1878).
1486. Kun E., J. biol. Chem., **194**, 603 (1952).
1487. Kunitz M., J. gen. Physiol., **22**, 207 (1938).
1488. Kunitz M., Enzymologia, **7**, 1 (1939).
1489. Kunitz M., J. gen. Physiol., **22**, 447 (1939).
1490. Kunitz M., J. gen. Physiol., **24**, 15 (1940).
1491. Kunitz M., J. gen. Physiol., **35**, 423 (1952).
1492. Kunitz M., Science, **108**, 19 (1948).
1493. Kunitz M., McDonald M. R., J. gen. Physiol., **29**, 393 (1946).
1494. Kunitz M., Northrop J. H., J. gen. Physiol., **18**, 433 (1935).
1495. Kunitz M., Northrop J. H., J. gen. Physiol., **19**, 991 (1936).
1496. Kuo M.-H., Blumenthal H. J., Biochim. biophys. Acta, **52**, 13 (1961).
1497. Kurahashi K., Pennington R. J., Utter M. F., J. biol. Chem., **226**, 1059 (1957).
1498. Kurahashi K., Sugimura A., J. biol. Chem., **235**, 940 (1960).
1499. Kusai K., Sekuzu I., Hagihara B., Okunuki K., Yamauchi S., Nakai M., Biochim. biophys. Acta, **40**, 555 (1960).
1500. Lack L., J. biol. Chem., **236**, 2835 (1961).
1501. La Du B. N., Zannoni V. G., J. biol. Chem., **219**, 273 (1956).

1502. Lagerkvist U., J. biol. Chem., **233**, 143 (1958).
1503. Laidler K. J., Disc. Faraday Soc. № 20, «The Physical Chemistry of Enzymes», p. 83 (1955).
1504. Laidler K. J., Trans. Faraday Soc., **51**, 528 (1955).
1505. Laidler K. J., Trans. Faraday Soc., **51**, 550 (1955).
1506. Lajtha A., Mela P., Waelsch H., J. biol. Chem., **205**, 553 (1953).
1507. Lampen J. O., Wang T. P., J. biol. Chem., **198**, 385 (1952).
1508. Landman O. E., Biochim. biophys. Acta, **23**, 558 (1957).
1509. Lane M. D., Halenz D. R., Kosow D. P., Hegre C. S., J. biol. Chem., **235**, 3082 (1960).
1510. Lang C. A., Nason A., J. biol. Chem., **234**, 1874 (1959).
1511. Langdon R. G., J. biol. Chem., **226**, 615 (1957).
1512. Langdon R. G., Weakley D. R., Fed. Proc., **16**, 208 (1957).
1513. Lange K., Z. physiol. Chem., **303**, 272 (1956).
1514. Langer L. J., Alexander J. A., Engel L. L., J. biol. Chem., **234**, 2609 (1959).
1515. Langmuir I., J. Amer. chem. Soc., **38**, 2221 (1916).
1516. Lapresle C., Webb T., Biochem. J., **76**, 538 (1960).
1517. Larner J., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 369), 1960.
1518. Larner J., Gillespie R. E., J. Amer. chem. Soc., **78**, 882 (1956).
1519. Larner J., Gillespie R. E., J. biol. Chem., **223**, 709 (1956).
1520. Larner J., Jackson W. T., Graves D. J., Stamer J. R., Arch. Biochem. Biophys., **60**, 352 (1956).
1521. Larner J., McNickle C. M., J. Amer. chem. Soc., **76**, 4747 (1954).
1522. Larner J., Schliselfeld L. H., Biochim. biophys. Acta, **20**, 53 (1956).
1523. Larsson L., Holmstedt B., Tjus E., Acta chem. scand., **8**, 1563 (1954).
1524. Laskowski M., Laskowski M., Advanc. Protein Chem., **9**, 203 (1954).
1525. Lawrence J. M., Smythe C. V., Arch. Biochem., **2**, 225 (1943).
1526. Layne E. C., Nason A., J. biol. Chem., **231**, 889 (1958).
1527. Lazzarini R. A., Atkinson D. E., J. biol. Chem., **236**, 3330 (1961).
1528. Leder I. G., J. biol. Chem., **225**, 125 (1957).
1529. Leder I. G., J. biol. Chem., **236**, 3066 (1961).
1530. Lee Y. P., J. biol. Chem., **227**, 987, 993 and 999 (1957).
1531. Lehman I. R., J. biol. Chem., **235**, 1479 (1960).
1532. Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A., J. biol. Chem., **233**, 163 (1958).
1533. Lehninger A. L., Physiol. Rev., **30**, 393 (1950).
1534. Lehninger A. L., Fed. Proc., **19**, 952 (1960).
1535. Lehninger A. L., Greville G. D. Biochim. biophys. Acta, **12**, 188 (1953).
1536. Lehninger A. L., Sudduth H. C., Wise J. B., J. biol. Chem., **235**, 2450 (1960).
1537. Leloir L. F., Arch. Biochem. Biophys., **33**, 186 (1951).
1538. Leloir L. F., Advanc. Enzymol., **14**, 193 (1953).
1539. Leloir L. F., Cardini C. E., Biochim. biophys. Acta, **12**, 15 (1953).
1540. Leloir L. F., Cardini C. E., Biochim. biophys. Acta, **20**, 33 (1956).
1541. Leloir L. F., de Fekete M. A., Cardini C. E., J. biol. Chem., **236**, 636 (1961).
1542. Leloir L. F., Dixon M., Enzymologia, **2**, 81 (1937).
1543. Leloir L. F., Goldemberg S. H., J. biol. Chem., **235**, 919 (1960).
1544. Leloir L. F., Muñoz J. M., Biochem. J., **32**, 299 (1938).
1545. Leloir L. F., Olavarría J. M., Goldemberg S. H., Carminatti H., Arch. Biochem. Biophys., **81**, 508 (1959).
1546. Leloir L. F., Trucco R. E., Cardini C. E., Paladini A. C., Caputto A., Arch. Biochem., **24**, 65 (1949).
1547. Lemberg R., Advanc. Enzymol., **23**, 265 (1961).
1548. Lemberg R., Newton N., O'Hagan J. E., Proc. roy. Soc., B, **155**, 356 (1961).
1549. Lenhert P. G., Hodgkin D. C., Nature, Lond., **192**, 937 (1961).
1550. Lenhoff H. M., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **220**, 967 (1956).
1551. Lenta M. P., Riehl M. A., Cancer Res., **12**, 498 (1952).
1552. Leone E., Biochem. J., **54**, 393 (1953).
1553. Lester R. L., Fleischer S., Biochim. biophys. Acta, **47**, 358 (1961).
1554. Leuthardt F., Nielsen H., Helv. chim. Acta, **35**, 1196 (1952).
1555. Leuthardt F., Testa E., Helv. chim. Acta, **34**, 931 (1951).
1556. Levenberg B., Buchanan J. M., J. biol. Chem., **224**, 1005, 1018 (1957).
1557. Levenberg B., Hayaishi O., J. biol. Chem., **234**, 955 (1959).
1558. Levin A. P., Magasanik B., J. biol. Chem., **236**, 184 (1961).
1559. Levin D. H., Racker E., J. biol. Chem., **234**, 2532 (1959).

1560. Levin O., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 27), 1962.
1561. Levin Y., Berger A., Katchalski E., Biochem. J., **63**, 308 (1956).
1562. Levintow L., J. nat. Cancer Inst., **15**, 347 (1954).
1563. Levintow L., Meister A., Fed. Proc., **13**, 251 (1954).
1564. Levvy G. A., Brit. med. Bull., 9, 126 (1953).
1565. Levvy G. A., Biochem. J., **58**, 462 (1954).
1566. Levvy G. A., Marsh C. A., Biochem. J., **52**, 690 (1952).
1567. Levy G. B., Cook E. S., Biochem. J., **57**, 50 (1954).
1568. Levy H. M., Sharon N., Koshland D. E., Biochim. biophys. Acta, **33**, 288 (1959).
1569. Levy H. M., Sharon N., Koshland D. E., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **45**, 785 (1959).
1570. Levy H. M., Sharon N., Lindemann E., Koshland D. E., J. biol. Chem., **235**, 2628 (1960).
1571. Levy H. R., Graves J. L., Vennesland B., Fed. Proc., **15**, 300 (1956).
1572. Levy H. R., Loewus F. A., Vennesland B., J. Amer. chem. Soc., **79**, 2949 (1957).
1573. Levy H. R., Popják G., Biochem. J., 75, 417 (1960).
1574. Levy H. R., Talalay P., J. Amer. chem. Soc., **79**, 2658 (1957).
1575. Levy H. R., Talalay P., J. biol. Chem., **234**, 2014 (1959).
1576. Levy H. R., Vennesland B., J. biol. Chem., **228**, 85 (1957).
1577. Lewin L. M., Brown G. M., J. biol. Chem., **236**, 2768 (1961).
1578. Lewis J. C., Snell N. S., Hirschmann D. J., Fraenkel-Conrat H., J. biol. Chem., **186**, 23 (1950).
1579. Lewis U. J., Williams D. E., Brink N. G., J. biol. Chem., **222**, 705 (1956).
1580. Lewis U. J., Williams D. E., Brink N. G., J. biol. Chem., **234**, 2304 (1959).
1581. Li L. P., Bonner J., Biochem. J., **41**, 105 (1947).
1582. Liddle A. M., Manners D. J., Wright A., Biochem. J., **80**, 304 (1961).
1583. Lieberman I., J. biol. Chem., **219**, 307 (1956).
1584. Lieberman I., J. biol. Chem., **222**, 765 (1956).
1585. Lieberman I., J. biol. Chem., **223**, 327 (1956).
1586. Lieberman I., Eto W. H., J. biol. Chem., **225**, 899 (1957).
1587. Lieberman I., Kornberg A., J. biol. Chem., **207**, 911 (1954).
1588. Lieberman I., Kornberg A., J. biol. Chem., **212**, 909 (1955).
1589. Lieberman I., Kornberg A., Simms E. S., J. biol. Chem., **215**, 403 (1955).
1590. Lieberman I., Kornberg A., Simms E. S., J. biol. Chem., **215**, 429 (1955).
1591. Light A., Smith E. L., J. biol. Chem., **235**, 3144, 3155, 3159 (1960).
1592. Lin E. C. C., J. biol. Chem., **236**, 31 (1961).
1593. Lin E. C. C., Magasanik B., J. biol. Chem., **235**, 1820 (1960).
1594. Lin S.-C. C., Greenberg D. M., J. gen. Physiol., **38**, 181 (1954).
1595. Lindstedt S., Acta chem. scand., **5**, 486 (1951).
1596. Lineweaver H., Burk D., J. Amer. chem. Soc., **56**, 658 (1934).
1597. Lineweaver H., Jansen E. F., Advanc. Enzymol., **11**, 267 (1951).
1598. Ling K.-H., Lardy H. A., J. Amer. chem. Soc., **76**, 2842 (1954).
1599. Linker A., Meyer K., Hoffman P., J. biol. Chem., 219, 13 (1956).
1600. Linker A., Meyer K., Hoffman P., J. biol. Chem., **235**, 924 (1960).
1601. Linnane A. W., Still J. L., Arch. Biochem. Biophys., **59**, 383 (1955).
1602. Lipke H., Kearns C. W., J. biol. Chem., **234**, 2123, 2129 (1959).
1603. Lipmann F., Advanc. Enzymol., **6**, 231 (1946).
1604. Lipmann F., Jones M. E., Black S., Flynn R. M., J. cell. comp. Physiol., **41**, suppl. 1, 109 (1953).
1605. Littauer U. Z., Kornberg A., J. biol. Chem., **226**, 1077 (1957).
1606. Little H. N., J. biol. Chem., **193**, 347 (1951).
1607. Loewus F. A., Vennesland B., Harris D. L., J. Amer. chem. Soc., **77**, 3391 (1955).
1608. Loewus F. A., Westheimer F. H., Vennesland B., J. Amer. chem. Soc., 75, 5018 (1953).
1609. Loewus M. W., Briggs D. R., J. biol. Chem., **199**, 857 (1952).
1610. Lohmann K., Biochem. Z., **254**, 332 (1932).
1611. Lohmann K., Schuster P., Angew. Chem., **50**, 221 (1937).
1612. London M., Hudson P. B., Arch. Biochem. Biophys., **46**, 141 (1953).
1613. London M., Hudson P. B., Biochim. biophys. Acta, **21**, 290 (1956).
1614. Long C., Biochem. J., **59**, 322 (1955).
1615. Long C., Maguire M. F., Biochem. J., **57**, 223 (1954).
1616. Long C., Penny I. F., Biochem. J., 65, 382 (1957).

1617. Lorber V., Utter M. F., Rudney H., Cook M., J. biol. Chem., **185**, 689 (1950).
1618. Lord K. A., Biochem. J., **78**, 483 (1961).
1619. Low B. W., in *The Proteins*, ed. H. Neurath and K. Bailey (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 235), 1953.
1620. Lowenstein J. M., J. biol. Chem., **236**, 1217 (1961).
1621. Lowenstein J. M., Cohen P. P., J. biol. Chem., **220**, 57 (1956).
1622. Lowry O. H., Bessey O. A., Crawford E. J., *J. biol. Chem.*, **180**, 399 (1949).
1623. Lowry O. H., Passonneau J. V., Rock M. K., J. biol. Chem., **236**, 2756 (1961).
1624. Lowry O. H., Roberts N. R., Schulz D. W., Clow J. E., Clark J. R., J. biol. Chem., **236**, 2813 (1961).
1625. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
1626. Lucas N., King H. K., Brown S. J., Biochem. J., *84*, *118* (1962).
1627. Ludowieg J., Vennesland B., Dorfmann A., J. biol. Chem., **236**, 333 (1961).
1628. Luh B. S., Phaff H. J., Arch. Biochem. Biophys., **48**, 23 (1954).
1629. Lukens L. N., Buchanan J. M., J. biol. Chem., **234**, 1799 (1959).
1630. Lukens L. N., Herrington K. A., Biochim. biophys. Acta, **24**, 432 (1957).
1631. Лукомская И. С., ДАН СССР, **129**, 1172 (1959).
1632. Lumry R., Smith E. L., Glantz R. R., J. Amer. chem. Soc., **73**, 4330 (1951).
1633. Lundegårdh H., Physiol. Plant., **7**, 375 (1954).
1634. Lundquist F., Thorsteinsson T., Buus O., Biochem. J., **59**, 69 (1955).
1635. Lynen F., Fed. Proc., **20**, 941 (1961).
1636. Lynen F., Agranoff B. W., Eggerer H., Henning U., Möslein E. M., Angew. Chem., **71**, 657 (1959).
1637. Lynen F., Henning U., Angew. Chem., **72**, 820 (1960).
1638. Lynen F., Knappe J., Lorch E., Jütting G., Ringelmann E., Angew. Chem., **71**, 481 (1959).
1639. Lynen F., Knappe J., Lorch E., Jütting G., Ringelmann E., Lachance J.-P., Biochem. Z., **335**, 123 (1961).
1640. Lynen F., Reichert E., Angew. Chem., **63**, 47 (1951).
1641. Lynen F., Wessely L., Wieland O., Rueff L., Angew. Chem., **64**, 687 (1952).
1642. Lynn W. S., Brown R. H., J. biol. Chem., **232**, 1015 (1958).
1643. Lynn W. S., Perryman N. C., J. biol. Chem., **235**, 1912 (1960).
1644. Maas W. K., J. biol. Chem., **198**, 23 (1952).
1645. Maas W. K., Fed. Proc., **15**, 305 (1956).
1646. Maas W. K., Davis B. D., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **38**, 785 (1952).
1647. Maas W. K., Novelli G. D., Lipmann F., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **39**, 1004 (1953).
1648. McCance R. A., Widdowson E. M., Nature, Lond., **153**, 650 (1944).
1649. McCorkindale J., Edson N. L., Biochem. J., **57**, 518 (1954).
1650. McCormick D. B., Gregory M. E., Snell E. E., J. biol. Chem., **236**, 2076 (1961).
1651. McCoy E. E., Najjar V. A., J. biol. Chem., **234**, 3017 (1959).
1652. McCready R. M., Seegmiller C. G., Arch. Biochem. Biophys., **50**, 440 (1954).
1653. McCullough W. G., Piligian J. T., Daniel I. J., J. Amer. chem. Soc., **79**, 628 (1957).
1654. McDonald M. R., J. gen. Physiol., **32**, 39 (1948).
1655. McDonald M. R., Kunitz M., J. gen. Physiol., **25**, 53 (1941).
1656. Macfarlane M. G., Biochem. J., **42**, 587, 590 (1948).
1657. Macfarlane M. G., Biochem. J., **47**, 270 (1950).
1658. Macfarlane M. G., Patterson L. M. B., Robison R., Biochem. J., **28**, 720 (1934).
1659. McGeachin R. L., Reynolds J. M., J. biol. Chem., **234**, 1456 (1959).
1660. MacGee J., Doudoroff M., J. biol. Chem., **210**, 617 (1954).
1661. McGugan W. A., Laughland D. H., Arch. Biochem. Biophys., **35**, 428 (1952).
1662. McGuire J. S., Hollis V. W., Tomkins G. M., J. biol. Chem., **235**, 3112 (1960).
1663. McIntosh E. N., Purko M., Wood W. A., J. biol. Chem., **228**, 499 (1957).
1664. McKenzie A., Ergebn. Enzymforsch., **5**, 49 (1936).
1665. Mackler B., Mahler H. R., Green D. E., J. biol. Chem., **210**, 149 (1954).
1666. Mackworth J. F., Biochem., J., **42**, 82 (1948).

1667. Mackworth J. F., Webb E. C., Biochem. J., **42**, 91 (1948).
1668. MacLeod R. M., Farkas W., Fridovitch I., Handler P., J. biol. Chem., **236**, 1841 (1961).
1669. MacMunn C. A., Phil. Trans., **177**, 267 (1886).
1670. MacNutt W. S., Biochem. J., **50**, 384 (1952).
1671. McQuillen K., Biochim. biophys. Acta, **17**, 382 (1955).
1672. McQuillen K., Progr. in Biophys., **12**, 67 (1962).
1673. MacWilliam I. C., Nature, Lond., **181**, 1143 (1958).
1674. Madsen N. B., Cori C. F., J. biol. Chem., **223**, 1055 (1956).
1675. Maehly A. C., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 808, footnote 41), 1955.
1676. Magasanik B., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, **26**, 249 (1961).
1677. Magasanik B., Moyed H. S., Gehring L. B., J. biol. Chem., **226**, 339 (1957).
1678. Mager J., Magasanik B., J. biol. Chem., **235**, 1474 (1960).
1679. Mahadevan S., Murthy S. K., Krishnamurthy S., Ganguly J., Biochem. J., **79**, 416 (1961).
1680. Mahler H. R., J. biol. Chem., **206**, 13 (1954).
1681. Mahler H. R., Douglas J., J. Amer. chem. Soc., **79**, 1159 (1957).
1682. Mahler H. R., Elowe D. G., J. biol. Chem., **210**, 165 (1954).
1683. Mahler H. R., Glenn J. L., in Symposium on Inorganic Nitrogen Metabolism, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 575,) 1956.
1684. Mahler H. R., Green D. E., Science, **120**, 7 (1954).
1685. Mahler H. R., Hübscher C., Baum H., J. biol. Chem., **216**, 625 (1955).
1686. Mahler H. R., Mackler B., Green D. E., Bock R. M., J. biol. Chem., **210**, 465 (1954).
1687. Mahler H. R., Raw I., Molinari R., Do Amaral D. F., J. biol. Chem., **233**, 230 (1958).
1688. Mahler H. R., Sarkar N. K., Vernon L. P., Alberty R. A., J. biol. Chem., **199**, 585 (1952).
1689. Mahler H. R., Tomisek A., Huennekens F. M., Exp. Cell. Res., **4**, 208 (1953).
1690. Mahler H. R., Wakil S. J., Bock R. M., J. biol. Chem., **204**, 453 (1953).
1691. Main A. R., Biochem. J., **74**, 10 (1960).
1692. Main A. R., Biochem. J., **75**, 188 (1960).
1693. Main A. R., Biochem. J., **79**, 246 (1961).
1694. Maley F., Lardy H. A., J. Amer. chem. Soc., **78**, 1393 (1956).
1695. Malmgren H., Acta chem. scand., **6**, 16 (1952).
1696. Malmström B. G., Biochim. biophys. Acta, **18**, 285 (1955).
1697. Malmström B. G., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 471), 1961.
1698. Malmström B. G., Kimmel J. R., Smith E. L., J. biol. Chem., **234**, 1108 (1959).
1699. Malmström B. G., Rosenberg A., Advanc. Enzymol., **21**, 131 (1959).
1700. Mancera O., Zaffaroni A., Rubin B. A., Sondheimer F., Rosenkrantz G., Djerassi C., J. Amer. chem. Soc., **74**, 3711 (1952).
1701. Mandeles S., Bloch K., J. biol. Chem., **214**, 639 (1955).
1702. Mandelstam J., Yudkin J., Biochem. J., **51**, 681 (1952).
1703. Mandl I., Advanc. Enzymol., **23**, 163 (1961).
1704. Mann P. J. G., Biochem. J., **25**, 918 (1931).
1705. Mann P. J. G., Biochem. J., **79**, 623 (1961).
1706. Mann P. J. G., Woolf B., Biochem. J., **24**, 427 (1930).
1707. Manners D. J., Advanc. Carbohydrate Chem., **17**, 371 (1962).
1708. Manning G. B., Campbell L. L., J. biol. Chem., **236**, 2952 (1961).
1709. Mapson L. W., Breslow E., Biochem. J., **65**, 29P (1957).
1710. Mapson L. W., Goddard D. R., Biochem. J., **49**, 593 (1951).
1711. Mapson L. W., Isherwood F. A., Chen Y. T., Biochem. J., **56**, 21 (1954).
1712. Marcus P. I., Talalay P., Proc. roy. Soc., B, **144**, 116 (1955).
1713. Marcus P. I., Talalay P., J. biol. Chem., **218**, 661 (1956).
1714. Marcus A., Vennesland B., Stern J. R., J. biol. Chem., **233**, 722 (1958).
1715. Margoliash E., quoted by D. Keilin and E. C. Stater, Brit. med. Bull., **9**, 95 (1953).
1716. Margoliash E., Biochem. J., **56**, 529, 535 (1954).
1717. Margoliash E., Frohwirt N., Wiener E., Biochem. J., **71**, 559 (1959).
1718. Margoliash E., Smith E. L., Kreil G., Tuppy H., Nature, Lond., **192**, 1125 (1961).
1719. Markert C. L., Møller F., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **45**, 753 (1959).
1720. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 558 (1952).
1721. Markham R., Strominger J. L., Biochem. J., **64**, 46P (1956).

1722. Märki F., Martius C., Biochem. Z., **333**, 111 (1960).
1723. Markley K., Smallman E., Biochim. biophys. Acta, **47**, 327 (1961).
1724. Markovitz A., Klein H. P., Fischer E. H., Biochim. biophys. Acta, **19**, 267 (1956).
1725. Marks P. A., Banks J., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **46**, 447 (1960).
1726. Marmur J., Hotchkiss R. D., J. biol. Chem., **214**, 383 (1955).
1727. Marples E. A., Thompson R. H. S., Biochem. J., **74**, 123 (1960).
1728. Marr A. G., Wilson P. W., Arch. Biochem. Biophys., **49**, 424 (1954).
1729. Marrack J. R., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 343), 1951.
1730. Marsh C. A., Biochem. J., **58**, 609 (1954).
1731. Marshall M., Cohen P. P., J. biol. Chem., **236**, 718 (1961).
1732. Marshall M., Metzenberg R. L., Cohen P. P., J. biol. Chem., **233**, 102 (1958).
1733. Marshall M., Metzenberg R. L., Cohen P. P., J. biol. Chem., **236**, 2229 (1961).
1734. Martin A. P., Neufeld H. A., Lucas F. V., Stotz E., J. biol. Chem., **233**, 206 (1958).
1735. Martin E. M., Morton R. K., Biochem. J., **62**, 696 (1956).
1736. Martin E. M., Morton R. K., Biochem. J., **65**, 404 (1957).
1737. Martin H. F., Peers F. G., Biochem. J., **55**, 523 (1953).
1738. Martin R. G., Ames B. N., Garry B. J., Fed. Proc. **20**, 225 (1961).
1739. Martin R. O., Stumpf P. K., J. biol. Chem., **234**, 2548 (1959).
1740. Martinez R. J., Wolfe J. B., Nakada H. I., J. biol. Chem., **234**, 2236 (1959).
1741. Mason H. S., Nature, Lond., **177**, 79 (1956).
1742. Mason M., J. biol. Chem., **227**, 61 (1957).
1743. Massey V., Biochem. J., **51**, 490 (1952).
1744. Massey V., Biochem. J., **53**, 67 (1953).
1745. Massey V., Biochem. J., **53**, 72 (1953).
1746. Massey V., Biochem. J., **55**, 172 (1953).
1747. Massey V., Biochim. biophys. Acta, **30**, 500 (1958).
1748. Massey V., Biochim. biophys. Acta, **37**, 310 (1960).
1749. Massey V., Biochim. biophys. Acta, **37**, 314 (1960).
1750. Massey V., Biochim. biophys. Acta, **38**, 447 (1960).
1751. Massey V., Personal communication.
1752. Massey V., Gibson Q. H., Veeger C., Biochem. J., **77**, 341 (1960).
1753. Massey V., Palmer G., Bennett R., Biochim. biophys. Acta, **48**, 1 (1961).
1754. Massey V., Singer T. P., J. biol. Chem., **228**, 263 (1957).
1755. Massey V., Veeger C., Biochim. biophys. Acta, **48**, 33 (1961).
1756. Mathews M. B., J. biol. Chem., **176**, 229 (1948).
1757. Matsuo Y., Greenberg D. M., J. biol. Chem., **230**, 545, 561 (1958).
1758. Matsuo Y., Greenberg D. M., J. biol. Chem., **234**, 516 (1959).
1759. Matthaei J. H., Jones O. W., Martin R. G., Nirenberg M. W., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **48**, 666 (1962).
1760. Mattson F. H., Beck L. W., J. biol. Chem., **219**, 735 (1956).
1761. Mauzerall D., Granick S., J. biol. Chem., **232**, 1141 (1958).
1762. Maw G. A., Biochem. J., **63**, 116 (1956).
1763. Maw G. A., Biochem. J., **70**, 168 (1958).
1764. Maw G. A., Biochem. J., **72**, 602 (1959).
1765. Maxwell E. S., J. biol. Chem., **229**, 139 (1957).
1766. Maxwell E. S., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **48**, 1639 (1962).
1767. Maxwell E. S., de Robichon-Szulmajster H., J. biol. Chem., **235**, 308 (1960).
1768. Maxwell E. S., Kalckar H. M., Burton R. M., Biochim. biophys. Acta, **18**, 444 (1955).
1769. Maxwell E. S., Kalckar H. M., Strominger J. L., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 2 (1956).
1770. Mayaudon J., Benson A. A., Calvin M., Biochim. biophys. Acta, **23**, 342 (1957).
1771. Mazia D., Dan K., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **38**, 826 (1952).
1772. Mazumder R., Sanadi D. R., Rodwell W. V., J. biol. Chem., **235**, 2546 (1960).
1773. Mazumder R., Sasakawa T., Kaziro Y., Ochoa S., J. biol. Chem., **237**, 3065 (1962).
1774. Medina A., Nicholas D. J. D., Nature, Lond., **179**, 533 (1957).
1775. Medina A., Sols A., Biochim. biophys. Acta, **19**, 378 (1956).
1776. Meedom B., Acta chem. scand., **10**, 150 (1956).
1777. Meedom B., Biochim. biophys. Acta, **31**, 260 (1959).

1778. Mehler A. H., Knox W. E., J. biol. Chem., **187**, 431 (1950).
1779. Meinhart J. O., Chaykin S., Krebs E. G., J. biol. Chem., **220**, 821 (1956).
1780. Meister A., J. biol. Chem., **184**, 117 (1950).
1781. Meister A., J. nat. Cancer Inst., **10**, 1263 (1950).
1782. Meister A., J. biol. Chem., **206**, 587 (1954).
1783. Meister A., J. biol. Chem., **210**, 17 (1954).
1784. Meister A., Fraser P. E., J. biol. Chem., **210**, 37 (1954).
1785. Meister A., Greenstein J. P., J. biol. Chem., **175**, 573 (1948).
1786. Meister A., Levintow L., Greenfield R. E., Abendshein P. A., J. biol. Chem., 215, 441 (1955).
1787. Meister A., Radhakrishnan A. N., Buckley S. D., J. biol. Chem., **229**, 789 (1957).
1788. Meister A., Sober H. A., Peterson E. A., J. biol. Chem., **206**, 89 (1954).
1789. Meister A., Sober H. A., Tice S. V., J. biol. Chem., **189**, 577 (1951).
1790. Meister P. D., Reinecke L. M., Meeks R. C., Murray H. C., Eppstein S. H., Osborn H. M. L., Weintraub A., Peterson D. H., J. Amer. chem. Soc., **76**, 4050 (1954).
1791. Meldrum N. U., Roughton F. J. W., J. Physiol., **80**, 113 (1933).
1792. Melnick I., Buchanan J. M., J. biol. Chem., **225**, 157 (1957).
1793. Mendel B., Mundell D. B., Biochem. J., **37**, 64 (1943).
1794. Mendel B., Mundell D. B., Rudney H., Biochem. J., **37**, 473 (1943).
1795. Mendel B., Rudney H., Biochem. J., **37**, 59 (1943).
1796. Mendicino J., J. biol. Chem., **235**, 3347 (1960).
1797. Mendicino J., Muntz J. A., J. biol. Chem., **233**, 178 (1958).
1798. Menon C. K. K., Friedman D. L., Stern J. R., Biochim. biophys. Acta, **44**, 375 (1960).
1799. Merrick J. M., Roseman S., J. biol. Chem., **235**, 1274 (1960).
1800. Merritt A. D., Tomkins G. M., J. biol. Chem., **234**, 2778 (1959).
1801. Meselson M., Stahl F. W., Proc. nat. Acad. Sci., U. S., **44**, 671 (1958).
1802. Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E., J. Amer. chem., Soc., **76**, 648 (1954).
1803. Metzler D. E., Snell E. E., J. biol. Chem., **198**, 363 (1952).
1804. Meyer A. S., Experientia, **11**, 99 (1955).
1805. Meyer K., Hahnel E., J. biol. Chem., **163**, 723 (1946).
1806. Meyer K., Rapport M. M., Advanc. Enzymol., **13**, 199 (1952).
1807. Meyer K. H., Spahr P.-F., Fischer E. H., Helv. chim. Acta, **36**, 1924 (1953).
1808. Meyer-Arendt E., Beisenherz G., Bücher T., Naturwiss., **40**, 59 (1953).
1809. Meyerhof O., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Summer and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 162), 1951.
1810. Meyerhof O., Beck L. V., J. biol. Chem., **156**, 109 (1944).
1811. Meyerhof O., Shatas R., Kaplan A., Biochim. biophys. Acta, **12**, 121 (1953).
1812. Michaelis L., Die Wasserstoffionenkonzentration (Berlin, Springer-Verlag, 1922).
1813. Michaelis L., Chem. Rev. **16**, 243 (1935).
1814. Michaelis L., Davidsohn H., Biochem. Z., **35**, 386 (1911).
1815. Michaelis L., Menten M. L., Biochem. Z., **49**, 333 (1913).
1816. Mill P. J., Tuttobello R., Biochem. J., **79**, 57 (1961).
1817. Miller A., Waelsch H., J. biol. Chem., **228**, 397 (1957).
1818. Miller K. D., Copeland W. H., Biochim. biophys. Acta, **22**, 193 (1956).
1819. Miller K. D., Copeland W. H., J. biol. Chem., **231**, 997 (1958).
1820. Miller K. D., van Vunakis H., J. biol. Chem., **223**, 227 (1956).
1821. Miller O. N., Huggins C. G., Arai K., J. biol. Chem., **202**, 263 (1953).
1822. Miller R. W., Lukens L. N., Buchanan J. M., J. biol. Chem., **234**, 1806 (1959).
1823. Miller S. L., J. Amer. chem. Soc., **77**, 2351 (1955).
1824. Miller S. L., Biochim. biophys. Acta, **23**, 480 (1957).
1825. Millerd A., Bonner J., Arch. Biochem. Biophys., **49**, 343 (1954).
1826. Mills G. C., Arch. Biochem. Biophys., **86**, 1 (1960).
1827. Mills G. T., Paul J., Smith E. E. B., Biochem. J., **53**, 232 (1953).
1828. Mills J. B., Biochem. J., **44**, 302 (1949).
1829. Milstein C., Biochem. J., **79**, 574, 584, 591 (1961).
1830. Milstein C., Sanger F., Biochem. J., **79**, 456 (1961).
1831. Mirsky A. E., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, **12**, 143 (1947).
1832. Mirsky A. E., Proceedings of the fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, Symp. № 2 (Oxford, Pergamon Press, 1963).

1833. Mirsky A. E., Anson M. L., J. gen. Physiol., 18, 307 (1935).
1834. Mitchell P. D., Ann. Rev. Microbiol., 13, 407 (1959).
1835. Mitchell P. D., in Biological Structure and Function, ed. T. W. Goodwin and O. Lindberg (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 581), 1961.
1836. Mitoma C., Arch. Biochem. Biophys., 60, 477 (1956).
1837. Mitoma C., Posner H. S., Reitz H. C., Udenfriend S., Arch. Biochem. Biophys., 61, 431 (1956).
1838. Mitoma C., Weisshach H., Udenfriend S., Nature, Lond., 175, 994 (1955).
1839. Mitsuhashi S., Davis B. D., Biochim. biophys. Acta, 15, 54 (1954).
1840. Mitsuhashi S., Davis B. D., Biochim. biophys. Acta, 15, 268 (1954).
1841. Mitz M. A., Heinrikson R. L., Biochim. biophys. Acta, 46, 45 (1961).
1842. Mizunuma T., Iguchi N., Report of the Noda Inst. Scientific Research, 2, 18 (1958).
1843. Mizushima S., Kitahara K., J. gen. appl. Microbiol., 8, 56 (1962).
1844. Mokrasch L. C., McGilvery R. N., J. biol. Chem., 221, 909 (1956).
1845. Moldave K., Castelfranco P., Meister A., J. biol. Chem., 234, 841 (1959).
1846. Maldave K., Meister A., J. biol. Chem., 229, 463 (1957).
1847. Mommaerts W. F. H. M., Illingworth B., Pearson C. M., Guillory R. J., Seraydarian K., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., 45, 791 (1959).
1848. Monod J., Cohen-Bazire G., C. R. Acad. Sci., Paris, 236, 530 (1953).
1849. Monod J., Cohen-Bazire G., Cohn M., Biochim. biophys. Acta, 7, 585 (1951).
1850. Monod J., Cohn M., Advanc. Enzymol., 13, 67 (1952).
1851. Monod J., Torriani A.-M., Ann. Inst. Pasteur, 78, 65 (1950).
1852. Monty K. J., Litt M., Kay E. R. M., Dounce A. L., J. biophys. biochem. Cytol., 2, 127 (1956).
1853. Moore B. W., Lee R. H., J. biol. Chem., 235, 1359 (1960).
1854. Moorefield H. H., Contr. Boyce Thompson Inst., 18, 303 (1956).
1855. Morgan E. J., Biochem. J., 20, 1282 (1926).
1856. Morgan E. J., Biochem. J., 24, 410 (1930).
1857. Morgan E. J., Friedmann E., Biochem. J., 32, 733 (1938).
1858. Morgan E. J., Friedmann E., Biochem. J., 32, 862 (1938).
1859. Morgan E. J., Stewart C. P., Hopkins F. G., Proc. roy. Soc., B, 94, 109 (1922).
1860. Morita S., J. Biochem., Tokyo, 48, 870 (1960).
1861. Morita Y., Kameda K., Memoirs of the Research Institute for Food Science, Kyoto University, 12, 14 (1957).
1862. Morita Y., Kameda K., Bull. agr. chem. Soc., Japan, 23, 28 (1959).
1863. Morita Y., Kameda K., Mizuno M., Agr. biol. Chem., 25, 136 (1961).
1864. Moritani M., Hukuoka Acta Med., 43, 651, 731 (1952).
1865. Moritani M., Tung T.-C., Fujii S., Mito H., Izumika N., Kenmochi K., Hirohata R., J. biol. Chem., 209, 485 (1954).
1866. Morris D. L., J. biol. Chem., 142, 881 (1942).
1867. Morrison J. F., Biochem. J., 56, 99 (1954).
1868. Morrison J. F., Griffiths D. E., Ennor A. H., Biochem. J., 65, 143 (1957).
1869. Morrison J. F., O'Sullivan W. J., Ogston A. G., Biochim. biophys. Acta, 52, 82 (1961).
1870. Morrison M., Hamilton H. B., Stotz E., J. biol. Chem., 228, 767 (1957).
1871. Mortenson L. E., Valentine R. C., Carnahan J. E., Biochem. biophys. res. Comm., 7, 448 (1962).
1872. Morton R. A., Nature, Lond., 182, 1764 (1958).
1873. Morton R. K., Biochem. J., 55, 786 (1953).
1874. Morton R. K., Biochem. J., 57, 595 (1954).
1875. Morton R. K., Biochem. J., 61, 232 (1955).
1876. Morton R. K., Biochem. J., 61, 240 (1955).
1877. Morton R. K., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 25), 1955.
1878. Morton R. K., Biochem. J., 65, 674 (1957).
1879. Morton R. K., Biochem. J., 70, 139, 150 (1958).
1880. Morton R. K., Nature, Lond., 192, 4804 (1961).
1881. Morton R. K., Shepley K., Nature, Lond., 192, 639 (1961).
1882. Mounter L. A., Alexander H. C., Tuck K. D., Dien L. T. H., J. biol. Chem., 226, 867 (1957).
1883. Mounter L. A., Baxter R. F., Chanutin A. J. biol. Chem., 215, 699 (1955).
1884. Mounter L. A., Dien L. T. H., J. biol. Chem., 219, 685 (1956).
1885. Mounter L. A., Dien L. T. H., Chanutin A., J. biol. Chem., 215 691 (1955).

1886. Mounter L. A., Floyd C. S., Chanutin A., J. biol. Chem., **204**, 221 (1953).
1887. Mounter L. A., Shipley B. A., J. biol. Chem., **231**, 855 (1958).
1888. Moyed H. S., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, **26**, 323 (1961).
1889. Moyed H. S., Magasanik B., J. biol. Chem., **226**, 351 (1957).
1890. Moyle J., Biochem. J., **63**, 552 (1956).
1891. Moyle J., Nature, Lond., **172**, 508 (1953).
1892. Moyle J., Dixon M., Biochim. biophys. Acta, **16**, 434 (1955).
1893. Moyle J., Dixon M., Biochem. J., **63**, 548 (1956).
1894. Mudd S. H., J. biol. Chem., **234**, 87 (1959).
1895. Mudd S. H., J. biol. Chem., **234**, 1784 (1959).
1896. Mudd S. H., Cantoni G. L., J. biol. Chem., **231**, 481 (1958).
1897. Mueller G. C., Miller J. A., J. biol. Chem., **180**, 1125 (1949).
1898. Muhammed A., Biochim. biophys. Acta, **54**, 121 (1961).
1899. Munch-Petersen A., Arch. Biochem. Biophys., **55**, 592 (1955).
1900. Muntz J. A., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 435 (1953).
1901. Murachi T., Neurath H., J. biol. Chem., **235**, 99 (1960).
1902. Murray D. R. P., Biochem. J., **24**, 1890 (1930).
1903. Murray D. R. P., Thesis for Ph. D. Degree, University of Cambridge, 1933.
1904. Murti C. R. K., Stone B. A., Biochem. J., **78**, 715 (1961).
1905. Muus J., C. R. Lab. Carlsberg (Sér. chim.), **28**, 317 (1953).
1906. Muus J., J. Amer. chem. Soc., **76**, 5163 (1954).
1907. Myers D. K., Biochem. J., **51**, 303 (1952).
1908. Myers D. K., Biochem. J., **55**, 67 (1953).
1909. Myers F. L., Northcote D. H., Biochem. J., **71**, 749 (1959).
1910. Myers J. W., J. biol. Chem., **236**, 1414 (1961).
1911. Myrbäck K., Z. physiol. Chem., **158**, 160 (1926).
1912. Myrbäck K., Z. physiol. Chem., **159**, 1 (1926).
1913. Myrbäck K., Acta chem. scand., **1**, 142 (1947).
1914. Myrbäck K., Ark. Kemi, **11**, 47 (1957).
1915. Myrbäck K., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 379), 1960.
1916. Myrbäck K., Björklund V., Ark. Kemi, **4**, 567 (1952).
1917. Myrbäck K., Örtenblad B., Biochem. Z., **291**, 61 (1937).
1918. Nachmansohn D., Wilson I. B., Advanc. Enzymol., **12**, 259 (1951).
1919. Naganna B., Raman A., Venugopal B., Sripathi C. E., Biochem. J., **60**, 215 (1955).
1920. Najjar V. A., J. biol. Chem., **175**, 281 (1948).
1921. Nakamoto T., Vennesland B., J. biol. Chem., **235**, 202 (1960).
1922. Nakamura K., Bernheim F., Biochim. biophys. Acta, **50**, 147 (1961).
1923. Nakamura T., Biochim. biophys. Acta, **30**, 44, 538 (1958).
1924. Nakayama T., J. Biochem., Tokyo, **48**, 812 (1960).
1925. Narrod S. A., Wood W. A., J. biol. Chem., **220**, 45 (1956).
1926. Nason A., Evans H. J., J. biol. Chem., **202**, 655 (1953).
1927. Nason A., Wosilait W. D., Terrell A. J., Arch. Biochem. Biophys., **48**, 233 (1954).
1928. Nath R. L., Rydon H. N., Biochem. J., **57**, 1 (1954).
1929. Nathans D., Lipmann F., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **47**, 497 (1961).
1930. Naughton M. A., Sanger F., Biochem. J., **78**, 156 (1961).
1931. Naughton M. A., Sanger F., Hartley B. S., Shaw D. C., Biochem. J., **77**, 149 (1960).
1932. Needham D. M., Williams J. M., Biochem. J., **73**, 171 (1959).
1933. Needham J., Chemical Embryology (Cambridge University Press, 1931).
1934. Needham J., Biochemistry and Morphogenesis (Cambridge University Press, 1942).
1935. Negelein E., Wulff H.-J., Biochem. Z., **293**, 351 (1937).
1936. Neilson N. E., Biochim. biophys. Acta, **17**, 139 (1955).
1937. Nelson J. M., Schubert M. P., J. Amer. chem. Soc., **50**, 2188 (1928).
1938. Nemeth A. M., J. biol. Chem., **208**, 773 (1954).
1939. Nemeth A. M., J. biol. Chem., **234**, 2921 (1959).
1940. Nemeth A. M., Biochim. biophys. Acta, **48**, 189 (1961).
1941. Nemeth A. M., Dickerman H., J. biol. Chem., **235**, 1761 (1960).
1942. Neuberg C., Hofmann E., Naturwissenschaften, **19**, 484 (1931).
1943. Neuberg C., Mandl I., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 527), 1951.
1944. Neubert D., Wojtczak A. B., Lehninger A. L., Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **48**, 1651 (1962).
1945. Neufeld E. F., Feingold D. S., Hassid W. Z., Arch. Biochem. Biophys., **83** 96 (1959).

1946. Neufeld E. F., Feingold D. S., Hassid W. Z., J. biol. Chem., **235**, 906 (1960).
1947. Neufeld E. F., Feingold D. S., Ilves S. M., Kessler G., Hassid W. Z., J. biol. Chem., **236**, 3102 (1961).
1948. Neufeld H. A., Green L. F., Latterell F. M., Weintraub R. L., J. biol. Chem., **232**, 1093 (1958).
1949. Neufeld H. A., Levay A. N., Lucas F. V., Martin A. P., Stotz E., J. biol. Chem., **233**, 209 (1958).
1950. Neuhaus F. C., Fed. Proc., **21**, 229 (1962).
1951. Neuhaus F. C., Byrne W. L., J. biol. Chem., **234**, 113 (1959).
1952. Neuman R. E., Smith E. L., J. biol. Chem., **193**, 97 (1951).
1953. Neumann H., Levin Y., Berger A., Katchalski E., Biochem. J., **73**, 33 (1959).
1954. Neumann N. P., Burris R. H., J. biol. Chem., **234**, 3286 (1959).
1955. Neurath H., in Modern Trends in Physiology and Biochemistry, ed. E.S.G. Barron (New York, Academic Press, p. 453), 1952.
1956. Neurath H., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 11), 1960.
1957. Neurath H., Dreyer W. J., Disc. Faraday Soc., № 20, «The Physical Chemistry of Enzymes», p. 32 (1955).
1958. Neurath H., Rupley J. A., Dreyer W. J., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 243 (1956).
1959. Neurath H., Schwert G. W., Chem. Rev., **46**, 69 (1950).
1960. Newmark M. Z., Wenger A. B., Arch. Biochem. Biophys., **89**, 110 (1960).
1961. Micholas D. J. D., Medina A., Jones O. T. G., Biochim. biophys. Acta, **37**, 468 (1960).
1962. Nicholas D. J. D., Nason A., J. biol. Chem., **207**, 353 (1954).
1963. Nicholas D. J. D., Nason A., J. Bact., **69**, 580 (1955).
1964. Nicholas D. J. D., Nason A., Plant Physiol., **30**, 135 (1955).
1965. Nicholas D. J. D., Nason A., McElroy W. D., J. biol. Chem., **207**, 341 (1954).
1966. Nicholas D. J. D., Scawin J. H., Nature, Lond., **178**, 1474 (1956).
1967. Nieft M. L., J. biol. Chem., **177**, 151 (1949).
1968. Nikiforuk G., Colowick S. P., J. biol. Chem., **219**, 119 (1956).
1969. Nimmo-Smith R. H., Biochem. J., **75**, 284 (1960).
1970. Nirenberg M. W., Jakoby W. B., J. biol. Chem., **235**, 954 (1960).
1971. Nirenberg M. W., Matthaei J. H., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **47**, 1588 (1961).
1972. Nishimura J. S., Greenberg D. M., J. biol. Chem., **236**, 2684 (1961).
1973. Nishimura M., J. Biochem., Tokyo, **46**, 219 (1959).
1974. Nisizawa K., J. Biochem., Tokyo, **42**, 825 (1955).
1975. Nisizawa K., Hashimoto Y., Arch. Biochem. Biophys., **81**, 211 (1959).
1976. Nisman B., Bact. Rev., **18**, 16 (1954).
1977. Nisman B., Mager J., Nature, Lond., **169**, 243 (1952).
1978. Nisselbaum J. S., Bodansky O., J. biol. Chem., **234**, 3276 (1959).
1979. Nisselbaum J. S., Bodansky O., J. biol. Chem., **236**, 401 (1961).
1980. Noda L., J. biol. Chem., **232**, 237 (1958).
1981. Noda L., Kuby S. A., J. biol. Chem., **226**, 541 and 551 (1957).
1982. Noda L., Kuby S. A., Lardy H. A., J. biol. Chem., **210**, 83 (1954).
1983. Noda L., Nihei T., Morales M. F., J. biol. Chem., **235**, 2830 (1960).
1984. Noltmann E., Bruns F. H., Biochem. Z., **330**, 514 (1958).
1985. Noltmann E., Bruns F. H., Biochem. Z., **331**, 436 (1959).
1986. Noltmann E. A., Gubler C. J., Kuby S. A., J. biol. Chem., **236**, 1225 (1961).
1987. Nordlie R. C., Fromm H. J., J. biol. Chem., **234**, 2523 (1959).
1988. Norris E. R., Elam D. W., J. biol. Chem., **134**, 443 (1940).
1989. Northrop J. H., J. gen. Physiol., **2**, 471 (1920).
1990. Northrop J. H., J. gen. Physiol., **13**, 739, 767 (1930).
1991. Northrop J. H., J. gen. Physiol., **14**, 713 (1931).
1992. Northrop J. H., J. gen Physiol., **15**, 29 (1931).
1993. Northrop J. H., Ergebn. Enzymforsch., **1**, 302 (1932).
1994. Northrop J. H., Kunitz M., J. gen. Physiol., **16**, 267, 295 (1932).
1995. Northrop J. H., Kunitz M., Ergebn. Enzymforsch., **2**, 104 (1933).
1996. Northrop J. H., Kunitz M., Herriott R. M., Crystalline Enzymes, 2nd edn. (Columbia University Press, 1948).
1997. Nose Y., Lipmann F., J. biol. Chem., **233**, 1348 (1958).
1998. Novelli G. D., Fed. Proc., **12**, 675 (1953).
1999. Novelli G. D., Schmetz F. J., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **206**, 533 (1954).

2000. Novick A., Horiuchi T., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 26, 239 (1961).
2001. Nygaard A. P., J. biol. Chem., 236, 920 (1961).
2002. Nygaard A. P., Theorell H., Acta chem. scand., 8, 1489 (1954).
2003. Nygaard A. P., Theorell H., Acta chem. scand., 9, 1300 (1955).
2004. Nylander O., Malmström B. G., Biochim. biophys. Acta, 34, 196 (1959).
2005. Nyman P. O., Biochim. biophys. Acta, 52, 1 (1961).
2006. Ochoa S., J. biol. Chem., 174, 133 (1948).
2007. Ochoa S., Advanc. Enzymol., 15, 183 (1954).
2008. Ochoa S., Angew. Chem., 72, 225 (1960).
2009. Ochoa S., Burma D. P., Kröger H., Weill J. D., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 47, 670 (1961).
2010. Ochoa S., Mehler A. H., Kornberg A., J. biol. Chem., 174, 979 (1948).
2011. Ochoa S., Mii S., J. biol. Chem., 236, 3303 (1961).
2012. Ochoa S., Stern J. R., Schneider M. C., J. biol. Chem., 193, 691 (1951).
2013. O'Connor R. J., Halvorson H., Biochim. biophys. Acta, 48, 47 (1961).
2014. Oginsky E. L., Gebrig R. F., J. biol. Chem., 198, 799 (1952).
2015. Ogle J. D., Tytell A. A., Arch. Biochem. Biophys., 42, 327 (1953).
2016. Ogston A. G., Nature, Lond., 162, 963 (1948).
2017. Ogston A. G., Nature, Lond., 181, 1462 (1958).
2018. Ohmura E., Hayaishi O., J. biol. Chem., 227, 181 (1957).
2019. O'Kane D. J., Gunsalus I. C., J. Bact., 56, 499 (1948).
2020. Okunuki K., Sekuzu I., Yonetani T., Takemori S., J. Biochem., Tokyo, 45, 847 (1958).
2021. Oliver J. T., Peel J. L., Biochim. biophys. Acta, 20, 390 (1956).
2022. Olson J. A., J. biol. Chem., 234, 5 (1959).
2023. Olson J. A., Anfinsen C. B., J. biol. Chem., 197, 67 (1952).
2024. Olsson U., Z. physiol. Chem., 114, 51 (1921).
2025. Oosterhaan R. A., Kunst P., van Rotterdam J., Cohen J. A., Biochim. biophys. Acta, 27, 556 (1958).
2026. Oosterhaan R. A., van Adrichem M. E., Biochim. biophys. Acta, 27, 423 (1958).
2027. Опарин А. И., The origin of Life on the Earth, 3rd edn. (Edinburgh, Oliver and Boyd, 1957).
2028. Опарин А. И., ed. The Origin of Life on the Earth. Proceedings of the I.U.B Symposium, Moscow (Oxford, Pergamon Press, 1957).
2029. Oppenoorth E. J., van Asperen K., Ent. exp. and appl., 4, 311 (1961).
2030. Oppenoorth F. J., van Asperen K., Science, 132, 298 (1960).
2031. Ord M. G., Thompson R. H. S., Biochem. J., 46, 346 (1950).
2032. Ord M. G., Thompson R. H. S., Biochem. J., 49, 191 (1951).
2033. Ormerod W. E., Biochem. J., 54, 701 (1953).
2034. Osborn M. J., Huennekens F. M., Biochim. biophys. Acta, 26, 646 (1957).
2035. O'Sullivan W. J., Perrin D. D., Biochim. biophys. Acta, 52, 612 (1961).
2036. Otey M. C., Birnbaum S. M., Greenstein J. P., Arch. Biochem. Biophys., 49, 245 (1954).
2037. Otsuka K., J. gen. appl. Microbiol., 4, 211 (1958).
2038. Overath P., Kellerman G. M., Lynen F., Biochem. Z., 335, 500 (1962).
2039. Packer L., Vishniac W., Biochim. biophys. Acta, 17, 153 (1955).
2040. Paege L. M., Schlenk F., Arch. Biochem. Biophys., 40, 42 (1952).
2041. Paigen K., J. biol. Chem., 233, 388 (1958).
2042. Paik W. K., Bloch-Frankenthal L., Birnbaum S. M., Winitz M., Greenstein J. P., Arch. Biochem. Biophys., 69, 56 (1957).
2043. Palade G. E., Porter K. R., J. exp. Med., 100, 641 (1954).
2044. Palade G. E., Siekevitz S., J. biophys. biochem. Cytol., 2, 171 (1956).
2045. Paladini A. C., Caputto R., Leloir L. F., Trucco R. E., Cardini C. E., Arch. Biochem., 23, 55 (1949).
2046. Paléus S., Neilands J. B., Acta chem. scand., 4, 1024 (1950).
2047. Paléus S., Tuppy H., Acta chem. scand., 13, 641 (1959).
2048. Palleroni N. J., Doudoroff M., J. biol. Chem., 218, 535 (1956).
2049. Palleroni N. J., Doudoroff M., J. biol. Chem., 223, 499 (1956).
2050. Palmer R. F., Biochem. J., 78, 839 (1961).
2051. Pant R., Biochem. J., 73, 30 (1959).
2052. Pardee A., Prestidge L., J. Bact., 70, 667 (1955).
2053. Park J. H., Meriwether B. P., Clodfelder P., Cunningham L. W., J. biol. Chem., 236, 136 (1961).
2054. Park R. W., Fox S. W., J. biol. Chem., 235, 3193 (1960).
2055. Parks R. E., Ben-Gershom E., Lardy H. A., J. biol. Chem., 227, 231 (1957).

2056. Pattabiraman T. N., Bachhawat B. K., Biochim. biophys. Acta, **50**, 129 (1961).
2057. Pattabiraman T. N., Bachhawat B. K., Biochim. biophys. Acta, **54**, 273 (1961).
2058. Paul K.-G., Arch. Biochem., **12**, 441 (1947).
2059. Pauling L., Corey R. B., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **37**, 241 (1951).
2060. Payen A., Persoz J. F., Ann. Chim. (Phys.), **53**, 73 (1833).
2061. Pazur J. H., Budovich T., Tipton C. L., J. Amer. chem. Soc., **79**, 625 (1957).
2062. Pazur J. H., Shuey E. W., J. biol. Chem., **236**, 1780 (1961).
2063. Peanasky R. J., Lardy H. A., J. biol. Chem., **233**, 365 (1958).
2064. Pearse A. G. E., Int. Rev. Cytol., **3**, 329 (1954).
2065. Peat S., Whelan W. J., Rees W. R., J. chem. Soc., p. 44 (1956).
2066. Peck H. D., Gest H., Biochim. biophys. Acta, **15**, 587 (1954).
2067. Peers F. G., Biochem. J., **53**, 102 (1953).
2068. Penefsky H. S., Pullman M. E., Datta A., Racker E., J. biol. Chem., **235**, 3330 (1960).
2069. Peng C. H. L., Biochim. biophys. Acta, **22**, 42 (1956).
2070. Perlmann G. E., Nature, Lond., **173**, 406 (1954).
2071. Perrin D., Jacob F., Monod J., C. R. Acad. Sci., Paris, **251**, 155 (1960).
2072. Perry S. V., Bioch. biophys. Acta, **8**, 499 (1952).
2073. Perry S. V., Biochem. J., **48**, 257 (1951).
2074. Perry S. V., Biochem. J., **74**, 94 (1960).
2075. Peterkofsky B., Gilvarg C., J. biol. Chem., **236**, 1432 (1961).
2076. Peters R. A., Proc. roy. Soc., B, **139**, 143 (1952).
2077. Peters R. A., Disc. Faraday Society, № 20, «The Physical Chemistry of Enzymes», p. 189 (1955).
2078. Peters R. A., Johns Hopkins Hosp. Bull., **97**, 21 (1955).
2079. Peterson D. H., Murray H. C., J. Amer. chem. Soc., **74**, 1871 (1952).
2080. Peterson E. A., Sober H. A., in Methods in Enzymology, ed. S.P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 3), 1962.
2081. Petrack B., Sullivan L., Ratner S., Arch. Biochem. Biophys., **69**, 186 (1957).
2082. Phaff H. J., Demain A. L., J. biol. Chem., **218**, 875 (1956).
2083. Phillips L. L., Caldwell M. L., J. Amer. chem. Soc., **73**, 3559 (1951).
2084. Philpot J. St. L., Stanier J. E., Biochem. J., **63**, 214 (1956).
2085. Piérard A., Wiame J. M., Biochim. biophys. Acta, **37**, 490 (1960).
2086. Pierpoint W. S., Hughes D. E., Baddiley J., Mathias A. P., Biochem. J., **61**, 368 (1955).
2087. Pigman W. W., Advanc. Enzymol., **4**, 41 (1944).
2088. Pigman W. W., J. Res. nat. Bur. Stand., **26**, 197 (1941).
2089. Pincus P., Nature, Lond., **66**, 187 (1950).
2090. Pizer L. I., Ballou C. E., J. Amer. chem. Soc., **79**, 3612 (1957).
2091. Pizer L. I., Ballou C. E., J. biol. Chem., **234**, 1138 (1959).
2092. Plagemann P. G. W., Gregory K. F., Wróblewski F., J. biol. Chem., **235**, 2282, 2288 (1960).
2093. Plager J. E., Samuels L. T., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 477 (1953).
2094. Planta R. J., Gruber M., Biochim. biophys. Acta, **53**, 443 (1961).
2095. Plaut G. W. E., J. biol. Chem., **217**, 235 (1955).
2096. Plaut G. W. E., Sung S.-C., J. biol. Chem., **207**, 305 (1954).
2097. Plentl A. A., Page I. H., J. biol. Chem., **163**, 49 (1946).
2098. Pogell B. M., Gryder R. M., J. biol. Chem., **228**, 701 (1957).
2099. Polanyi M., Szabo A. L., Trans. Faraday Soc., **30**, 508 (1934).
2100. Pollister A. W., Pollister P. F., Int. Rev. Cytol., **6**, 85 (1957).
2101. Pollock M., Brit. J. exp. Path., **4**, 739 (1950).
2102. Pollock M. R., Torriani A.-M., Tridgell E. G., Biochem. J., **62**, 387 (1956).
2103. Полянновский О. Л., Кретович В. Л., ДАН СССР, **112**, 1087 (1957).
2104. Pontis H., Degerstedt G., Reichard P., Biochim. biophys. Acta, **51**, 138 (1961).
2105. Pontremoli S., de Flora A., Grazi E., Mangiarotti G., Bonsignore A., Horecker B. L., J. biol. Chem., **236**, 2975 (1961).
2106. Porath J., Biochim. biophys. Acta, **22**, 151 (1956).
2107. Porter J. W., Long R. W., J. biol. Chem., **233**, 20 (1958).
2108. Posternak T., J. biol. Chem., **188**, 317 (1951).
2109. Posternak T., Rosselet J. P., Helv. chim. Acta, **37**, 246 (1954).
2110. Postgate J. R., Biochim. biophys. Acta, **18**, 427 (1955).
2111. Postgate J. R., J. gen. Microbiol., **14**, 545 (1956).
2112. Potter V. R., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 10), 1955.

2113. Potter V. R., Liebl G. J., Cancer Res., **5**, 18 (1945).
2114. Potts J. T., Berger A., Cooke J., Anfinsen C. B., J. biol. Chem., **237**, 1851 (1962).
2115. Powell J. F., Hunter J. R., Biochem. J., **62**, 381 (1956).
2116. Preiss J., Handler P., J. biol. Chem., **225**, 759 (1957).
2117. Press E. M., Porter R. R., Cebra J., Biochem. J., **74**, 501 (1960).
2118. Price J. B., Dietrich L. S., J. biol. Chem., **227**, 633 (1957).
2119. Price V. E., Greenfield R. E., J. biol. Chem., **209**, 363 (1954).
2120. Pricer W. E., Horecker B. L., J. biol. Chem., **235**, 1292 (1960).
2121. Pugh D., Leaback D. H., Walker P. G., Biochem. J., **65**, 464 (1957).
2122. Pullman M. E., Colowick S. P., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **194**, 593 (1952).
2123. Pullman M. E., Najjar V. A., Science, **119**, 630 (1954).
2124. Pullman M. E., Penefsky H. S., Datta A., Racker E., J. biol. Chem., **235**, 3322 (1960).
2125. Pullman M. E., San Pietro A., Colowick S. P., J. biol. Chem., **206**, 129 (1954).
2126. Pumphrey A. M., Redfearn E. R., Biochem. J., **72**, 2P (1959).
2127. Purvis J. L., Biochim. biophys. Acta, **30**, 440 (1958).
2128. Putman E. W., Litt C. F., Hassid W. Z., J. Amer. chem. Soc., **77**, 4351 (1955).
2129. Putnam F. W., in The Proteins, ed. H. Neurath and K. Bailey (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 807, 893), 1953.
2130. Putman F. W., Neurath H., J. biol. Chem., **166**, 603 (1946).
2131. Quastel J. H., Wheatley A. H. M., Biochem. J., **26**, 2169 (1932).
2132. Quastel J. H., Wheatley A. H. M., Biochem. J., **32**, 936 (1938).
2133. Quastel J. H., Witty R., Nature, Lond., **167**, 556 (1951).
2134. Quastel J. H., Wooldridge W. R., Biochem. J., **22**, 689 (1928).
2135. Quayle J. R., Keech D. B., Taylor G. A., Biochem. J., **78**, 225 (1961).
2136. Quayle J. R., Taylor G. A., Biochem. J., **78**, 611 (1961).
2137. Raacke I. D., in Metabolic Pathways, ed. D. M. Greenberg (New York, Academic Press, Vol. 2), 1961.
2138. Rabin B. R., Crook E. M., Biochim. biophys. Acta, **19**, 550 (1956).
2139. Rabinowitz J. C., Barker H. A., J. biol. Chem., **218**, 161 (1956).
2140. Rabinowitz J. C., Pricer W. E., J. Amer. chem. Soc., **78**, 4176 (1956).
2141. Rabinowitz J. C., Pricer W. E., J. Amer. chem. Soc., **78**, 5702 (1956).
2142. Rabinowitz J. C., Pricer W. E., J. biol. Chem., **222**, 537 (1956).
2143. Rabinowitz J. C., Pricer W. E., Fed. Proc., **16**, 236 (1957).
2144. Rabinowitz J. C., Pricer W. E., J. biol. Chem., **229**, 321 (1957).
2145. Rabinowitz M., Lipmann F., J. biol. Chem., **235**, 1043 (1960).
2146. Racker E., J. biol. Chem., **167**, 843 (1947).
2147. Racker E., J. biol. Chem., **177**, 883 (1949).
2148. Racker E., Biochim. biophys. Acta, **4**, 211 (1950).
2149. Racker E., J. biol. Chem., **184**, 313 (1950).
2150. Racker E., Biochem. biophys. Acta, **9**, 577 (1952).
2151. Racker E., J. biol. Chem., **196**, 347 (1952).
2152. Racker E., Advanc. Enzymol., **15**, 141 (1954).
2153. Racker E., J. biol. Chem., **217**, 855 (1955).
2154. Racker E., J. biol. Chem., **217**, 867 (1955).
2155. Racker E., Advanc. Enzymol., **23**, 323 (1961).
2156. Racker E., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 397), 1961.
2157. Racker E., Proc. nat Acad. Sci. U.S., **48**, 1659 (1962).
2158. Racker E., Klybas V., Schramm M., J. biol. Chem., **234**, 2510 (1959).
2159. Rademaker W., Soons J. B., J. Biochim. biophys. Acta, **24**, 451 (1957).
2160. Rafter G. W., J. biol. Chem., **235**, 2475 (1960).
2161. Raijman L., Grisolia S., Edelhoch H., J. biol. Chem., **235**, 2340 (1960).
2162. Raistrick H., Proc. roy. Soc., B, **136**, 481 (1950).
2163. Rall T. W., Lehninger A. L., J. biol. Chem., **194**, 119 (1952).
2164. Rall T. W., Wosilait W. D., Sutherland E. W., Biochim. biophys. Acta, **20**, 69 (1956).
2165. Ramakrishnan C. V., Martin S. M., Arch. Biochem. Biophys., **55**, 403 (1955).
2166. Ramakrishnan T., Campbell J. J. R., Biochim. biophys. Acta, **17**, 122 (1955).
2167. Ramasarma T., Giri K. V., Arch. Biochem. Biophys., **62**, 91 (1956).
2168. Rao D. R., Greenberg D. M., J. biol. Chem., **236**, 1758 (1961).
2169. Rao D. R., Oesper P., Biochem. J., **81**, 405 (1961).

2170. Rao M. S. N., Kegeles G., J. Amer. chem. Soc., 80, 5724 (1958).
2171. Rao N. A., Cama H. R., Kumar S. A., Vaidyanathan C. S., J. biol. Chem., 235, 3353 (1960).
2172. Rapkine L., C. R. Soc. Biol., Paris, 112, 790, 1294 (1933).
2173. Rapkine L., Rapkine S. M., Trpinac P., C. R. Acad. Sci., Paris, 209, 253 (1939).
2174. Rapoport S., Luebering J., J. biol. Chem., 189, 683 (1951).
2175. Rapoport S., Luebering J., J. biol. Chem., 196, 583 (1952).
2176. Rapport M. M., Meyer K., Linker A., J. Amer. chem. Soc., 73, 2416 (1951).
2177. Ratner S., Advanc. Enzymol., 15, 319 (1954).
2178. Ratner S., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 356,) 1955.
2179. Ratner S., Anslow W. P., Petrack B., J. biol. Chem., 204, 115 (1953).
2180. Ratner S., Petrack B., Arch. Biochem. Biophys., 65, 582 (1956).
2181. Ratner S., Rochovansky O., Arch. Biochem. Biophys. 63, 277 (1956).
2182. Ratner S., Rochovansky O., Arch. Biochem. Biophys., 63, 296 (1956).
2183. Ravdin R. G., Crandall D. I., J. biol. Chem., 189, 137 (1951).
2184. Ravel J. M., Grona M. L., Humphreys J. S., Shive W., J. biol. Chem., 234, 1452 (1959).
2185. Ravel J. M., Norton S. J., Humphreys J. S., Shive W., J. biol. Chem., 237, 2845 (1962).
2186. Raw I., Mahler H. R., J. biol. Chem., 234, 1867 (1959).
2187. Raw I., Petragnani N., Nogueira O. C., J. biol. Chem., 235, 1517 (1960).
2188. Ray W. J., Latham H. G., Katsoulis M., Koshland D. E., J. Amer. chem. Soc., 82, 4743 (1960).
2189. Ray W. J., Ruscica J. J., Koshland D. E., J. Amer. chem. Soc., 82, 4739 (1960).
2190. Razzell W. E., J. biol. Chem., 236, 3031 (1961).
2191. Razzell W. E., Khorana H. G., J. biol. Chem., 234, 2105, 2114 (1959).
2192. Razzell W. E., Khorana H. G., J. biol. Chem., 236, 1144 (1961).
2193. Recknagel R. O., J. biol. Chem., 227, 273 (1957).
2194. Reddi K. K., Giri K. V., Enzymologia, 13, 281 (1949).
2195. Reed L. J., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 3, p. 195), 1960.
2196. Reed L. J., De Busk B. G., Gunsalus I. C., Hornberger C. S., Science, 114, 93 (1951).
2197. Rees D. A., Biochem. J., 80, 449 (1961).
2198. Rees D. A., Biochem. J., 81, 347 (1961).
2199. Reese E. T., Mandels M., Canad. J. Microbiol., 5, 173 (1959).
2200. Reeves R. B., Rennie D. W., Pappenheimer J. R., Fed. Proc., 16, 693 (1957).
2201. Reichard P., Acta chem. scand., 11, 523 (1957).
2202. Reichard P., Advanc. Enzymol., 21, 263 (1959).
2203. Reichard P., Hanshoff G., Acta chem. scand., 10, 548 (1956).
2204. Reis J., Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 22, 36 (1940).
2205. Reissig J. L., J. biol. Chem., 219, 753 (1956).
2206. Remmert L. F., Cohen P. P., J. biol. Chem., 181, 431 (1949).
2207. Remy C. N., Remy W. T., Buchanan J. M., J. biol. Chem., 217, 885 (1955).
2208. Remy C. N., Richert D. A., Doisy R. J., Wells I. C., Westerfeld W. W., J. biol. Chem., 217, 293 (1955).
2209. Rendi R., Ochoa S., Science, 133, 1367 (1961).
2210. Rendina G., Coon M. J., J. biol. Chem., 225, 523 (1957).
2211. Rendina G., Singer T. P., J. biol. Chem., 234, 1605 (1959).
2212. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry (Oxford, Pergamon Press, 1961).
2213. Reynard A. M., Hass L. F., Jacobsen D. D., Boyer P. D., J. biol. Chem., 236, 2277 (1961).
2214. Richards F. M., Vithayathil P. J., J. biol. Chem., 234, 1459 (1959).
2215. Richards O. C., Rutter W. J., J. biol. Chem., 236, 3177, 3185 (1961).
2216. Richardson K. E., Tolbert N. E., J. biol. Chem., 236, 1280 (1961).
2217. Richardson K. E., Tolbert N. E., J. biol. Chem., 236, 1285 (1961).
2218. Richert D. A., Westerfeld W. W., J. biol. Chem., 203, 915 (1953).
2219. Richert D. A., Westerfeld W. W., Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 76, 252 (1951).
2220. Rieder S. V., Rose I. A., J. biol. Chem., 234, 1007 (1959).
2221. Riklis E., Rittenberg D., J. biol. Chem., 236, 2526 (1961).
2222. Rilling H. C., Coon M. J., J. biol. Chem., 235, 3087 (1960).

2223. Rimon A., Shapiro B., Biochem. J., **71**, 620 (1959).
2224. Ringler R. L., J. biol. Chem., **236**, 1192 (1961).
2225. Risebrough R. W., Tissières A., Watson J. D., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **48**, 430 (1962).
2226. Robbins K. C., Barnett E. L., Grant N. H., J. biol. Chem., **216**, 27 (1955).
2227. Robbins P. W., Lipmann F., J. biol. Chem., **229**, 837 (1957).
2228. Robbins P. W., Lipmann F., J. biol. Chem., **233**, 681 (1958).
2229. Robbins P. W., Lipmann F., J. biol. Chem., **233**, 686 (1958).
2230. Robbins P. W., Traut R. R., Lipmann F., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **45**, 6 (1959).
2231. Roberts D. W. A., J. biol. Chem., **222**, 259 (1956).
2232. Roberts E., Arch. Biochem. Biophys., **48**, 395 (1954).
2233. Roberts R. B., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **48**, 897, 1245 (1962).
2234. Robinson W. G., Coon M. J., J. biol. Chem., **225**, 511 (1957).
2235. Roche J., Baudoin J., C.R. Soc. Biol., Paris, **137**, 245 (1943).
2236. Roche J., Lacombe G., Biochim. biophys. Acta, **9**, 687 (1952).
2237. Roche J., Lacombe G., Girard H., Biochim. biophys. Acta, **6**, 210 (1950).
2238. Rodkey F. L., Ball E. G., J. biol. Chem., **182**, 17 (1950).
2239. Rodwell V. W., Towne J. C., Grisolia S., Biochim. biophys. Acta, **20**, 394 (1956).
2240. Rodwell V. W., Towne J. C., Grisolia S., J. biol. Chem., **228**, 875 (1957).
2241. Rogers W. I., Kalnitzky G., Biochim. biophys. Acta, **23**, 525 (1957).
2242. Roholt O. A., Greenberg D. M., Arch. Biochem. Biophys., **62**, 454 (1956).
2243. Romano A. H., Nickerson W. J., J. biol. Chem., **208**, 409 (1954).
2244. Roodyn D. B., Biochem. J., **64**, 361 (1956).
2245. Roodyn D. B., Biochem. J., **64**, 368 (1956).
2246. Rose I. A., Grunberg-Manago M., Korey S., Ochoa S., J. biol Chem., **211**, 737 (1955).
2247. Rose I. A., O'Connell E. L., J. biol. Chem., **236**, 3086 (1961).
2248. Rose I. A., Rieder S. V., J. biol. Chem., **231**, 315 (1958).
2249. Rose S. P. R., Heald P. J., Biochem. J., **81**, 339 (1961).
2250. Rosenberg A., Ark. Kemi, **17**, 25, 41 (1960).
2251. Rosenberg A., Biochim. biophys. Acta, **45**, 297 (1960).
2252. Rosenberg L. L., Arnon D. I., J. biol. Chem., **217**, 361 (1955).
2253. Rossiter R. J., J. biol. Chem., **135**, 431 (1940).
2254. Rothberg S., Steinberg D., J. Amer. chem. Soc., **79**, 3274 (1957).
2255. Rothschild H. A., Barron E. S. G., J. biol. Chem., **209**, 511 (1954).
2256. Roush A. H., Betz R. F., J. biol. Chem., **233**, 261 (1958).
2257. Roush A. H., Domnas A. J., Science, **124**, 125 (1956).
2258. Roughton F. J. W., Disc. Faraday Soc., № 17, «The Study of Fast Reactions», p. 116 (1954).
2259. Roughton F. J. W., Clark A. M., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 1250), 1951.
2260. Rovery M., Desnuelle P., Proceedings of the fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, Symp. № 4 (Oxford, Pergamon Press, 1963).
2261. Rovery M., Desnuelle P., Bonjour G., Biochim. biophys. Acta, **6**, 166 (1950).
2262. Rovery M., Fabre C., Desnuelle P., Biochim. biophys. Acta, **9**, 702 (1952).
2263. Rovery M., Gabeloteau C., de Vernejoul P., Guidoni A., Desnuelle P., Biochim. biophys. Acta, **32**, 256 (1958).
2264. Rovery M., Poilroux M., Yoshida A., Desnuelle P., Biochim. biophys. Acta, **23**, 608 (1957).
2265. Rovery M., Yoshida A., Desnuelle P., Biochim. biophys. Acta, **20**, 404 (1956).
2266. Rowen J. W., Kornberg A., J. biol. Chem., **193**, 497 (1951).
2267. Rowsell E. V., Biochem. J., **64**, 235 (1956).
2268. Rowsell E. V., Biochem. J., **64**, 246 (1956).
2269. Roy A. B., Biochem. J., **57**, 465 (1954).
2270. Roy A. B., Biochim. biophys. Acta, **15**, 300 (1954).
2271. Roy A. B., Biochem. J., **64**, 651 (1956).
2272. Roy A. B., Advanc. Enzymol., **22**, 205 (1960).
2273. Roy A. B., Biochem. J., **74**, 49 (1960).
2274. Roy D. K., Underkofler L. A., Cereal Chem., **28**, 72 (1951).
2275. Розенфельд Е. Л., Лукомская И. С., Биохимия, **21**, 412 (1956).
2276. Rudney H., J. biol. Chem., **227**, 363 (1957).
2277. Rudney H., Ferguson J. J., J. biol. Chem., **234**, 1076 (1959).

2278. Russell D. H., Thain E. M., Vernon C. A., Proc. chem. Soc., p. 255 (1960).
2279. Rutter W. J., Lardy H. A., J. biol. Chem., **233**, 374 (1958).
2280. Rutter W. J., Richards O. C., Woodfin B. M., J. biol. Chem., **236**, 3193 (1961).
2281. Ryan K. J., Engel L. L., J. biol. Chem., **225**, 103 (1957).
2282. Ryle A. P., Porter R. R., Biochem. J., **73**, 75 (1959).
2283. Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F., Kitai R., Biochem. J., **60**, 541 (1955).
2284. Sable H. Z., Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **75**, 215 (1950).
2285. Sable H. Z., Guarino A. J., J. biol. Chem., **196**, 395 (1952).
2286. Sadana J. C., McElroy W. D., Arch. Biochem. Biophys., **67**, 16 (1957).
2287. Sadana J. C., Morey A. V., Biochim. biophys. Acta, **50**, 153 (1961).
2288. Sagers R. D., Beck J. V., Gruber W., Gunsalus I. C., J. Amer. chem. Soc., **78**, 694 (1956).
2289. Saito Y., Hayaishi O., Rothberg S., J. biol. Chem., **229**, 921 (1957).
2290. Sakaguchi K., Murao S., J. agric. chem. Soc., Japan, **23**, 411 (1950).
2291. Sakami W., Ukstins I., J. biol. Chem., **236**, PC50 (1961).
2292. Sallach H. J., J. biol. Chem., **223**, 1101 (1956).
2293. Salvador R., Brady R. O., Fed. Proc., **15**, 345 (1956).
2294. Sanadi D. R., Gibson D. M., Ayengar P., Biochim. biophys. Acta, **14**, 434 (1954).
2295. Sanadi D. R., Littlefield J. W., Bock R. M., J. biol. Chem., **197**, 851 (1952).
2296. Sanger F., Biochem. J., **39**, 507 (1945).
2297. Sanger F., Advanc. Protein Chem., **7**, 1 (1952).
2298. Sanger F., Shaw D. C., Nature, Lond., **187**, 872 (1960).
2299. Sanger F., Thompson E. O. P., Biochem. J., **53**, 366 (1953).
2300. Sanger F., Tuppy H., Biochem. J., **49**, 481 (1951).
2301. San Pietro A., Kaplan N. O., Colowick S. P., J. biol. Chem., **212**, 941 (1955).
2302. Sarda L., Desnuelle P., Biochim. biophys. Acta, **30**, 513 (1958).
2303. Sarda L., Marchis-Mouren G., Constantin M. J., Desnuelle P., Biochim. biophys. Acta, **23**, 264 (1957).
2304. Sarid S., Berger A., Katchalski E., J. biol. Chem., **234**, 1740 (1959).
2305. Saroja K., Venkataraman R., Giri K. V., Biochem. J., **60**, 399 (1955).
2306. Sartori M. F., Chem. Rev., **48**, 225 (1951).
2307. Sastry L. V. S., Ramakrishnan T., J. Sci. Ind. Res., **20C**, 277 (1961).
2308. Saunders B. C., Lect. Roy. Inst. Chem., 1 (1957).
2309. Saunders B. C., Some Aspects of the Chemistry and Toxic Action of Organic Compounds containing Phosphorus and Fluorine (Cambridge University Press, 1957).
2310. Savage N., Biochem. J., **67**, 146 (1957).
2311. Sawin P. B., Glick D., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **29**, 55 (1943).
2312. Sawyer C. H., Science, **101**, 385 (1945).
2313. Sayre F. W., Jensen D., Greenberg D. M., J. biol. Chem., **219**, 111 (1956).
2314. Saz H. J., Hillary E. P., Biochem. J., **62**, 563 (1956).
2315. Saz H. J., Hubbard J. A., J. biol. Chem., **225**, 921 (1957).
2316. Scarano E., Quoted by H. M. Kalckar, Biochim. biophys. Acta, **12**, 250 (1953).
2317. Scarano E., J. biol. Chem., **235**, 706 (1960).
2318. Scarano E., Bonaduce L., de Petrocellis B., J. biol. Chem., **235**, 3556 (1960).
2319. Schachman H. K., Adler J., Radding C. M., Lehman I. R., Kornberg A., J. biol. Chem., **235**, 3242 (1960).
2320. Schachman H. K., Pardee A. B., Stanier R. Y., Arch. Biochem. Biophys., **38**, 245 (1952).
2321. Schachter D., Taggart J. V., J. biol. Chem., **208**, 263 (1954).
2322. Schaffer N. K., May S. C., Summerson W. H., J. biol. Chem., **206**, 201 (1954).
2323. Schaffer N. K., Simet L., Harshman S., Engle R. R., Drisko R. W., J. biol. Chem., **225**, 197 (1957).
2324. Schales O., Mims V., Schales S. S., Arch. Biochem., **10**, 455 (1946).
2325. Schales O., Schales S. S., Arch. Biochem., **24**, 83 (1949).
2326. Schapira G., Kruh J., Dreyfus J. C., Schapira F., J. biol. Chem., **235**, 1738 (1960).
2327. Schellenberg K. A., Hellerman L., J. biol. Chem., **231**, 547 (1958).
2328. Schlamowitz M., Fed. Proc., **16**, 242 (1957).
2329. Schlamowitz M., Bodansky O., J. biol. Chem., **234**, 1433 (1959).
2330. Schlesinger M. J., Coon M. J., J. biol. Chem., **236**, 2421 (1961).

2331. Schlossmann K., Brüggemann J., Lynen F., Biochem. Z., **336**, 258 (1962).
2332. Schlossmann K., Lynen F., Biochem. Z., **328**, 591 (1957).
2333. Schmid H., Karrer P., Helv. chim. Acta, **32**, 960 (1949).
2334. Schmid R., Robbins P. W., Traut R. R., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **45**, 1236 (1959).
2335. Schmidt G., Z. physiol. Chem., **208**, 185 (1932).
2336. Schneider W. C., J. Histochem. Cytochem., **1**, 212 (1953).
2337. Schneider W. C., Claude A., Hogeboom G. H., J. biol. Chem., **172**, 451 (1948).
2338. Schnuchel G., Z. physiol. Chem., **298**, 241 (1954).
2339. Schnuchel G., Z. physiol. Chem., **303**, 91 (1956).
2340. Schoenheimer R., The Dynamic State of Body Constituents (Harvard University Press, 1946).
2341. Schønheyder F., Biochem. J., **50**, 378 (1952).
2342. Schrecker A. W., Kornberg A., J. biol. Chem., **182**, 795 (1950).
2343. Schucher R., Hokin L. E., J. biol. Chem., **210**, 551 (1954).
2344. Schuegraf A., Ratner S., Warner R. C., J. biol. Chem., **235**, 3597 (1960).
2345. Schütz E., Z. physiol. Chem., **9**, 577 (1885).
2346. Schütz J., Z. physiol. Chem., **30**, 1 (1900).
2347. Schwander H., Zahler P., Nitschmann H., Helv. chim. Acta, **35**, 553 (1952).
2348. Schwartz A., Oschmann A., C.R. Soc. Biol., Paris, **92**, 169 (1925).
2349. Schweet R. S., Allen E. H., J. biol. Chem., **223**, 1104 (1958).
2350. Schwert G. W., Kaufman S., J. biol. Chem., **180**, 517 (1949).
2351. Schwert G. W., Neurath H., Kaufman S., Snoke J. E., J. biol. Chem., **172**, 221 (1948).
2352. Schwimmer S., Arch. Biochem. Biophys., **43**, 108 (1953).
2353. Schwimmer S., Balls A. K., J. biol. Chem., **179**, 1063 (1949).
2354. Schwimmer S., Pardee A. B., Advanc. Enzymol., **14**, 375 (1953).
2355. Scott D. A., J. biol. Chem., **142**, 959 (1942).
2356. Scott D. B. M., Cohen S. S., Biochem. J., **55**, 23 (1953).
2357. Scott D. B. M., Cohen S. S., Biochem. J., **64**, 686 (1957).
2358. Scott E. M., Jakoby W. B., J. biol. Chem., **234**, 932 (1959).
2359. Scriba P., Holzer H., Biochem. Z., **334**, 473 (1961).
2360. Seegmiller J. E., J. biol. Chem., **201**, 629 (1953).
2361. Segal H. L., Boyer P. D., J. biol. Chem., **204**, 265 (1953).
2362. Segal H. L., Brenner B. M., J. biol. Chem., **235**, 471 (1960).
2363. Segal H. L., Kachmar J. F., Boyer P. D., Enzymologia, **15**, 187 (1952).
2364. Seifter S., Gallop P. M., Klein L., Meilman E., J. biol. Chem., **234**, 285 (1959).
2365. Sekuzu I., Jurtshuk P., Green D. E., Biochem. biophys. res. Comm., 6, 71 (1961).
2366. Sekuzu I., Takemori S., Orii Y., Okunuki K., Biochim. biophys Acta, **37**, 64 (1960).
2367. Seligman A. M., Wolf G., J. Amer. chem. Soc., **73**, 2086 (1951).
2368. Selim A. S. M., Greenberg D. M., J. biol. Chem., **234**, 1474 (1959).
2369. Sellinger O. Z., Miller O. N., Fed. Proc., **16**, 245 (1957).
2370. Sellinger O. Z., Miller O. N., J. biol. Chem., **234**, 1641 (1959).
2371. Selwyn M. J., Private communication.
2372. Semenza G., Biochim. biophys. Acta, **24**, 401 (1957).
2373. SentheShanmuganathan S., Biochem. J., **77**, 619 (1960).
2374. Serif G. S., Kirkwood S., J. biol. Chem., **233**, 109 (1958).
2375. Seubert W., Remberger U., Biochem. Z., **334**, 401 (1961).
2376. Shacter B., Shimkin M. B., J. nat. Cancer Inst., **9**, 155 (1948).
2377. Shapira R., Doherty D. G., Fed. Proc., **15**, 352 (1956).
2378. Shapiro B., Biochem. J., **53**, 663 (1953).
2379. Shapiro S. K., Biochim. biophys. Acta, **29**, 405 (1958).
2380. Shapiro S. K., Yphantis D. A., Biochim. biophys. Acta, **36**, 241 (1959).
2381. Shaw D. R. D., Biochem. J., **64**, 394 (1956).
2382. Shepherd J. A., Kalnitzky G., J. biol. Chem., **207**, 605 (1954).
2383. Shepherdson M., Pardee A. B., J. biol. Chem., **235**, 3233 (1960).
2384. Sher I. H., Mallette M. F., Arch. Biochem. Biophys., **53**, 354 (1954).
2385. Sher I. H., Mallette M. F., Arch. Biochem. Biophys., **53**, 370 (1954).
2386. Sherry S., Troll W., J. biol. Chem., **208**, 95 (1954).
2387. Shields G. S., Hill R. L., Smith E. L., J. biol. Chem., **234**, 1747 (1959).
2388. Shifrin S., Kaplan N. O., Advanc. Enzymol., **22**, 337 (1960).
2389. Shimazono H., J. Biochem., Tokyo, **42**, 321 (1955).
2390. Shimazono H., Hayaishi O., J. biol. Chem., **227**, 151 (1957).

2391. Shimazono N., Mano Y., Tanaka R., Kaziro Y., J. Biochem., Tokyo, 46, 959 (1959).
2392. Shimura K., Nagayama H., Kikuchi A., Nature, Lond., 177, 935 (1956).
2393. Shug A. L., Wilson P. W., Green D. E., Mahler H. R., J. Amer. chem. Soc., 76, 3355 (1954).
2394. Shukuya R., Schwert G. W., J. biol. Chem., 235, 1649, 1653 (1960).
2395. Shukuya R., Schwert G. W., J. biol. Chem., 235, 1658 (1960).
2396. Shulman S., Alkjaersig N., Sherry S., J. biol. Chem., 233, 91 (1958).
2397. Shuster L., Kaplan N. O., J. biol. Chem., 201, 535 (1953).
2398. Shuster L., Kaplan N. O., J. biol. Chem., 215, 183 (1955).
2399. Sidbury J. B., Rosenberg L. L., Najjar V. A., J. biol. Chem., 222, 89 (1956).
2400. Siebert G., Proceedings of the fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, Symp. № 2 (Oxford, Pergamon Press, 1963).
2401. Siebert G., Carsiotis M., Plaut G. W. E., J. biol. Chem., 226, 977 (1957).
2402. Siebert G., Dubuc J., Warner R. C., Plaut G. W. E., J. biol. Chem., 226, 965 (1957).
2403. Siebert G., Lang K., Lucius-Lang S., Herkert L., Stark G., Rossmüller G., Jöckel H., Z. Physiol. Chem., 295, 229 (1953).
2404. Siebert G., Smellie R. M. S., Int. Rev. Cytol., 6, 383 (1957).
2405. Silverman M., Keresztesy J. C., Koval G. J., Gardiner R. C., J. biol. Chem., 226, 83 (1957).
2406. Simpson F. J., Wood W. A., J. biol. Chem., 230, 473 (1958).
2407. Simpson M. V., Velick S. F., J. biol. Chem., 208, 61 (1954).
2408. Singer M. F., Fruton J. S., J. biol. Chem., 229, 111 (1957).
2409. Singer T. P., J. biol. Chem., 174, 11 (1948).
2410. Singer T. P., Hofstee B. H., J. Arch. Biochem., 18, 229, 245 (1948).
2411. Singer T. P., Kearney E. B., Arch. Biochem., 29, 190 (1950).
2412. Singer T. P., Kearney E. B., J. biol. Chem., 183, 409 (1950).
2413. Singer T. P., Kearney E. B., Bernath P., J. biol. Chem., 223, 599 (1956).
2414. Singer T. P., Massey V., Record of Chem. Progress, 18, 201 (1957).
2415. Singer T. P., Massey V., Kearney E. B., Biochim. biophys. Acta, 19, 200 (1956).
2416. Singer T. P., Pensky J., Biochim. biophys . Acta, 9, 316 (1952).
2417. Singer T. P., Pensky J., J. biol. Chem., 196, 375 (1952).
2418. Сисакян Н. М., advanc. Enzymol., 20, 201 (1958).
2419. Sistrom W. R., Stanier R. Y., J. biol. Chem., 210, 821 (1954).
2420. Siu P. M. L., Wood H. G., Stjernholm R. L., J. biol. Chem., 236, PC21 (1961).
2421. Sivak A., Hoffmann-Ostenhof O., Biochim. biophys. Acta, 53, 426 (1961).
2422. Sizer I. W., Advanc. Enzymol., 3, 35 (1943).
2423. Sköld O., J. biol. Chem., 235, 3273 (1960).
2424. Slater E. C., Biochem. J., 44, 305 (1949).
2425. Slater E. C., Disc. Faraday Soc., № 20, «The Physical Chemistry of Enzymes», p. 231 (1955).
2426. Slater E. C., Dusc. Faraday Soc., № 20, «The Physical chemistry of Enzymes», p. 308 (1955).
2427. Slater E. C., Advanc. Enzymol., 20, 147 (1958).
2428. Slater E. C., Bonner W. D., Biochem. J., 52, 185 (1952).
2429. Slein M. W., J. biol. Chem., 186, 753 (1950).
2430. Slein M. W., J. Amer. chem. Soc., 77, 1663 (1955).
2431. Sloane-Stanley G. H., Biochem. J., 44, 373 (1949).
2432. Smiley J. D., Ashwell G., J. biol. Chem., 235, 1571 (1960).
2433. Smiley J. D., Ashwell G., J. biol. Chem., 236, 357 (1961).
2434. Smith E. E. B., Mills G. T., Biochem. J., 54, 164 (1953).
2435. Smith E. E. B., Mills G. T., Biochim. biophys. Acta, 18, 152 (1955).
2436. Smith E. L., J. biol. Chem., 173, 571 (1948).
2437. Smith E. L., J. biol. Chem., 176, 9 (1948).
2438. Smith E. L., Advanc. Enzymol., 12, 191 (1951).
2439. Smith E. L., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 793), 1951.
2440. Smith E. L., Vitamin B_{12} (London, Methuen, 1960).
2441. Smith E. L., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 48, 677 (1962).
2442. Smith E. L., Bergmann M., J. biol. Chem., 153, 627 (1944).
2443. Smith E. L., Davis N. C., Adams E., Spackman D. H., in A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 291 (1954).

2444. Smith E. L., Hill R. L., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 37), 1960.
2445. Smith E. L., Kimmel J. R., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 133), 1960.
2446. Smith E. L., Kimmel J. R., Brown D. M., Thompson E. O. P., J. biol. Chem., **215**, 67 (1955).
2447. Smith E. L., Lumry R., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 4, 168 (1949).
2448. Smith E. L., Spackman D. H., J. biol. Chem., **212**, 271 (1955).
2449. Smith E. L., Stockell A., J. biol. Chem., **207**, 501 (1954).
2450. Smith E. L., Stockell A., Kimmel J. R., J. biol. Chem., **207**, 551 (1954).
2451. Smith L., Bact. Rev., **18**, 106 (1954).
2452. Smith L., Stotz E., J. biol. Chem., **209**, 819 (1954).
2453. Smith M. E., Greenberg D. M., Nature, Lond., **177**, 1130 (1956).
2454. Smith R. S., Gunsalus I. C., J. biol. Chem., **229**, 305 (1957).
2455. Smith R. F., Briggs D. R., J. phys. Chem., **54**, 33 (1950).
2456. Smith S. W., Weiss S. B., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **228**, 915 (1957).
2457. Smithies O., Advanc. Protein Chem., **14**, 65 (1959).
2458. Smyth D. G., Stein W. H., Moore S., J. biol. Chem., **238**, 227(1963).
2459. Smythe C. V., Halliday D., J. biol. Chem., **144**, 237 (1942).
2460. Snell E. E., Broquist H. P., Arch. Biochem., **23**, 326 (1949).
2461. Snoke J. E., J. biol. Chem., **223**, 271 (1956).
2462. Snoke J. E., Bloch K., J. biol. Chem., **213**, 825 (1955).
2463. Snoke J. E., Neurath H., Arch. Biochem., **21**, 351 (1949).
2464. Snoke J. E., Yanari S., Bloch K., J. biol. Chem., **201**, 573 (1953).
2465. Snyder S. H., Silva O. L., Kies M. W., J. biol. Chem., **236**, 2996 (1961).
2466. Socquet I. M., Laidler K. J., Arch. Biochem., **25**, 171 (1950).
2467. Solomon J. B., Biochem. J., **66**, 264 (1957).
2468. Solomon J. B., Biochem. J., **70**, 529 (1958).
2469. Sols A., Crane R. K., J. biol. Chem., **210**, 581 (1954).
2470. Sols A., Fuente G. de la, Biochim. biophys. Acta, **24**, 206 (1957).
2471. Sols A., Fuente G. de la, Villar-Palasí C., Asensio C., Biochim. biophys. Acta, **30**, 92 (1958).
2472. Sörbo B. H., Acta chem. scand., **7**, 1129 (1953).
2473. Sörbo B. H., Acta chem. scand., **7**, 1137 (1953).
2474. Sörbo B., Biochim. biophys. Acta, **24**, 324 (1957).
2475. Sörbo B., Heyman T., Biochim. biophys. Acta, **23**, 624 (1957).
2476. Sorm F., Advanc. Enzymol., **24**, 415 (1962).
2477. Sourkes T. L., Rev. canad. Biol., **14**, 49 (1955).
2478. Spackman D. H., Smith E. L., Brown D. M., J. biol. Chem., **212**, 255 (1955).
2479. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., J. biol. Chem., **235**, 648 (1960).
2480. Spahr P. F., Hollingworth B. R., J. biol. Chem., **236**, 823 (1961).
2481. Spencer D., Austral. J. biol. Sci., **12**, 181 (1959).
2482. Spencer M., Fuller W., Wilkins M. H. F., Brown G. L., Nature, Lond., **194**, 1014 (1962).
2483. Speyer J. F., Lengyel P., Basilio C., Ochoa S., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **48**, 441 (1962).
2484. Spiegelman S., Delorenzo W. F., Campbell A. M., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **37**, 513 (1951).
2485. Spooner E. T. C., Stocker B. A. D., eds., Symposium of Bacterial Anatomy (6th Symposium of the Society for General Microbiology) (Cambridge University Press, 1956).
2486. Sprinson D. B., Rittenberg D., Nature, Lond., **167**, 484 (1951).
2487. Srere P. A., J. biol. Chem., **234**, 2544 (1959).
2488. Srere P. A., J. biol. Chem., **236**, 50 (1961).
2489. Srere P. A., Cooper J. R., Klybas V., Racker E., Arch. Biochem. Biophys., **59**, 535 (1955).
2490. Srere P. A., Kosicki G. W., J. biol. Chem., **236**, 2557 (1961).
2491. Srere P. A., Kosicki G. W., Lumry R., Biochim. biophys. Acta, **50**, 184 (1961).
2492. Srere P. A., Seubert W., Lynen F., Biochim. biophys. Acta, **33**, 313 (1959).
2493. Sribney M., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **233**, 1315 (1958).
2494. Sri Ram J., Terminiello L., Bier M., Nord F. F., Arch. Biochem. Biophys., **52**, 464 (1954).
2495. Srinivasan P. R., Sprinson D. B., J. biol. Chem., **234**, 716 (1959).
2496. Stadtman E. R., Fed. Proc., **11**, 291 (1952).
2497. Stadtman E. R., J. biol. Chem., **196**, 527 (1952).

2498. Stadtman E. R., Cohen G. N., LeBras G., DeRobichon-Szulmajster H., J. biol. Chem., **236**, 2033 (1961).
2499. Stadtman T. C., Biochem. J., **62**, 614 (1956).
2500. Stadtman T. C., Cherkes A., Anfinsen C. B., J. biol. Chem., **206**, 511 (1954).
2501. Stadtman T. C., Elliott P., J. biol. Chem., **228**, 983 (1957).
2502. Stafford H. A., Magaldi A., Vennesland B., J. biol. Chem., **207**, 621 (1954).
2503. Stahmann M. A., Fruton J. S., Bergmann M., J. biol. Chem., **164**, 753 (1946).
2504. Stanier R. Y., Ann. Rev. Microbiol., **5**, 35 (1951).
2505. Stanier R. Y., Symp. sur. le métabolisme microbien (2nd International Congress of Biochemistry, Paris, p. 64 (1952).
2506. Stanier R. Y., Ingraham J. L., J. biol. Chem., **210**, 799 (1954).
2507. Stark G. R., Stein W. H., Moore S., J. biol. Chem., **236**, 436 (1961).
2508. Stearn A. E., Advanc. Enzymol., **9**, 25 (1949).
2509. Stein E. A., Junge J. M., Fischer E. H., J. biol. Chem., **235**, 371 (1960).
2510. Stein S. S., Koshland D. E., Arch. Biochem. Biophys., **39**, 229 (1952).
2511. Stein W. D., Barnard E. A., J. mol. Biol., **1**, 350 (1959).
2512. Stein W. H., Moore S., Fifth International Congress of Biochemistry, Moscow. *Symposium № 4 (Oxford, Pergamon Press, 1963).*
2513. Stenesh J. J., Winnick T., Biochem. J., **77**, 575 (1960).
2514. Stern B. K., Vennesland B., J. biol. Chem., **235**, 205, 209 (1960).
2515. Stern J. R., Biochim. biophys. Acta, **26**, 448 (1957).
2516. Stern J. R., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 5, p. 511), 1961.
2517. Stern J. R., Coon M. J., Del Campillo A., Nature, Lond., **171**, 28 (1953).
2518. Stern J. R., Coon M. J., del Campillo A., Schneider M. C., J. biol. Chem., **221**, 15 (1956).
2519. Stern J. R., del Campillo A., J. Amer. chem. Sos., **77**, 1073 (1955).
2520. Stern J. R., del Campillo A., J. biol. Chem., **218**, 985 (1956).
2521. Stern J. R., del Campillo A., Raw I., J. biol. Chem., **218**, 971 (1956).
2522. Stern J. R., Drummond G. I., Fed. Proc., **15**, 363 (1956).
2523. Stern J. R., Drummond G. I., Coon M. J., del Campillo A., J. biol. Chem., **235**, 313 (1960).
2524. Stern J. R., Ochoa S., J. biol. Chem., **191**, 161 (1951).
2525. Stern J. R., Shapiro B., Stadtman E. R., Ochoa S., J. biol. Chem., **193**, 703 (1951).
2526. Stetten M. R., J. Amer. chem. Soc., **81**, 1437 (1959).
2527. Stetten M. R., Stetten D., J. biol. Chem., **232**, 489 (1958).
2528. Stevens A., Hilmoe R. J., J. biol. Chem., **235**, 3016, 3023 (1960).
2529. Steyn-Parvé E. P., Biochim. biophys. Acta, **8**, 310 (1952).
2530. Stickland L. H., Biochem. J., **44**, 190 (1949).
2531. Stickland R. G., Biochem. J., **73**, 646 and 654 (1959).
2532. Stickland R. G., Biochem. J., **73**, 660 (1959).
2533. Still J. L., Buell M. V., Knox W. E., Green D. E., J. biol. Chem., **179**, 831 (1949).
2534. Still J. L., Sperling E., J. biol. Chem., **182**, 585 (1950).
2535. Stitch S. R., Halkerston I. D. K., Hillman J., Biochem. J., **63**, 705 (1956).
2536. Stjernholm R., Wood H. G., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **47**, 289 (1961).
2537. Stocken L. A., Thompson R. H. S., Physiol. Rev., **29**, 168 (1949).
2538. Stodola F. H., Koepsell H. J., Sharpe E. S., J. Amer. chem. Soc., **74**, 3202 (1952).
2539. Stokstad E. L. R., Hoffmann C. E., Regan M. A., Fordham D., Jukes T. H., Arch. Biochem., **20**, 75 (1949).
2540. Stoll A., Seebeck E., Advanc. Enzymol., **11**, 377 (1951).
2541. Storey I. D. E., Dutton G. J., Biochem. J., **59**, 279 (1955).
2542. Storvick W. O., King K. W., J. biol. Chem., **235**, 303 (1960).
2543. Straub F. B., Biochem. J., **33**, 787 (1939).
2544. Straub F. B., Biochem. J., **34**, 483 (1940).
2545. Straub F. B., Enzymologia, **9**, 143 (1940).
2546. Straub F. B., Z. physiol. Chem., **275**, 63 (1942).
2547. Straub F. B., Ullmann A., Ács G., Biochim. biophys. Acta, **18**, 439 (1955).
2548. Straus O. H., Goldstein A., J. gen. Physiol., **26**, 559 (1943).
2549. Strecker H. J., Arch. Biochem. Biophys., **46**, 128 (1953).
2550. Strecker H. J., Harary I., J. biol. Chem., **211**, 263 (1954).
2551. Strecker H. J., Korkes S., J. biol. Chem., **196**, 769 (1952).
2552. Strelitz F., Biochem. J., **38**, 86 (1944).
2553. Strittmatter C. F., Ball E. G., J. cell. comp. Physiol., **43**, 57 (1954).

2554. Strittmatter P., J. biol. Chem., **236**, 2329 (1961).
2555. Strittmatter P., Ball E. G., J. biol. Chem., **213**, 445 (1955).
2556. Strittmatter P., Velick S. F., J. biol. Chem., **221**, 253 (1956).
2557. Strittmatter P., Velick S. F., J. biol. Chem., **228**, 785 (1957).
2558. Strominger J. L., Biochim. biophys. Acta, **16**, 616 (1955).
2559. Strominger J. L., Mapson L. W., Biochem. J., **66**, 567 (1957).
2560. Strominger J. L., Maxwell E. S., Axelrod J., Kalckar H. M., J. biol. Chem., **224**, 79 (1957).
2561. Strominger J. L., Smith M. S., J. biol. Chem., **234**, 1822 (1959).
2562. Stumpf P. K., Horecker B. L., J. biol. Chem., **218**, 753 (1956).
2563. Sugiyama S., Yano K., Arima K., Bull. agr. chem. Soc. Japan, **24**, 243, 249 (1960).
2564. Sumner J. B., J. biol. Chem., **69**, 435 (1926).
2565. Sumner J. B., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 873), 1951.
2566. Sumner J. B., Chou T. C., Bever A. T., Arch. Biochem., **26**, 1 (1950).
2567. Sumner J. B., Dounce A. L., J. biol. Chem., **121**, 417 (1937).
2568. Sundarajan T. A., Sarma P. S., Biochem. J., **71**, 537 (1959).
2569. Sundaram S., Sarma P. S., Biochem. J., **77**, 465 (1960).
2570. Suskind S. R., J. Bacteriol., **74**, 308 (1957).
2571. Sutherland E. W., Cohn M., Posternak T., Cori C. F., J. biol. Chem., **180**, 1285 (1949).
2572. Sutherland E. W., Posternak T., Cori C. F., J. biol. Chem., **181**, 153 (1949).
2573. Sutherland E. W., Wosilait W. D., J. biol. Chem., **218**, 459 (1956).
2574. Sutton W. B., J. biol. Chem., **226**, 395 (1957).
2575. Suzuki I., Workman C. H., Biochem. J., **74**, 359 (1960).
2576. Suzuki K., Mano Y., Shimazono N., J. Biochem., Tokyo, **48**, 313 (1960).
2577. Suzuki S., Strominger J. L., J. biol. Chem., **235**, 257, 267, 274 (1960).
2578. Swain C. G., Brown J. F., J. Amer. chem. Soc., **74**, 2538 (1952).
2579. Swanson M. A., J. biol. Chem., **184**, 647 (1950).
2580. Swartz M. N., Kaplan N. O., Lamborg M. F., J. biol. Chem., **232**, 1051 (1958).
2581. Sweat M. L., Lipscomb M. D., J. Amer. chem. Soc., **77**, 5185 (1955).
2582. Sweat M. L., Samuels L. T., Lumry R., J. biol. Chem., **185**, 75 (1950).
2583. Swell L., Byron J. E., Treadwell C. R., J. biol. Chem., **186**, 543 (1950).
2584. Swell L., Treadwell C. R., J. biol. Chem., **185**, 349 (1950).
2585. Swenson A. D., Boyer P. D., J. Amer. chem. Soc., **79**, 2174 (1957).
2586. Swick R. W., J. biol. Chem., **231**, 751 (1958).
2587. Swick R. W., Nakao A., J. biol. Chem., **206**, 883 (1954).
2588. Swick R. W., Wood H. G., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **46**, 28 (1960).
2589. Swingle S. M., Tiselius A., Biochem. J., **48**, 171 (1951).
2590. Szent-Györgyi A., Biochem. J., **22**, 1387 (1928).
2591. Szilard L., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **46**, 277 (1960).
2592. Черный Е. Т., Дворникова П. Д., Дегтярь П. Г., ДАН СССР, **67**, 341 (1949).
2593. Tabor C. W., Tabor H., Rosenthal S. M., J. biol. Chem., **208**, 645 (1954).
2594. Tabor H., Mehler A. H., in Methods in Enzymology, ed. S.P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 228), 1955.
2595. Tabor H., Mehler A. H., Stadtman E. R., J. biol. Chem., **204**, 127 (1953).
2596. Tabor H., Wyngarden L., J. biol. Chem., **234**, 1830 (1959).
2597. Tagawa K., Arnon D. I., Nature, Lond., **195**, 537 (1962).
2598. Tagawa K., Shin M., J. Biochem., Tokyo, **46**, 865 (1959).
2599. Tagawa K., Shin M., Okunuki K., Nature, Lond., **183**, 111 (1959).
2600. Tager J. M., Rautanen N., Biochim. biophys. Acta, **18**, 111 (1955).
2601. Takagi Y., Horecker B. L., J. biol. Chem., **225**, 77 (1956).
2602. Takahashi K., J. Biochem., Tokyo, **49**, 1 (1961).
2603. Takahashi N., Egami F., Biochem. J., **80**, 384 (1961).
2604. Takanami M., Okamoto T., Biochim. biophys. Acta, **44**, 379 (1960).
2605. Takebe I., J. Biochem., Tokyo, **50**, 245 (1961).
2606. Talalay P., Dobson M. M., J. biol. Chem., **205**, 823 (1953).
2607. Talalay P., Fishman W. H., Huggins C., J. biol. Chem., **166**, 757 (1946).
2608. Talalay P., Marcus P. I., J. biol. Chem., **218**, 675 (1956).
2609. Talalay P., Wang V. S., Biochim. biophys. Acta, **18**, 300 (1955).
2610. Tallan H. H., Jones M. E., Fruton J. S., J. biol. Chem., **194**, 793 (1952).
2611. Tanaka T., Knox W. E., J. biol. Chem., **234**, 1162 (1959).
2612. Tanenbaum S. W., Biochim. biophys. Acta, **21**, 335 (1956).
2613. Tanenbaum S. W., Shemin D., Fed. Proc., **9**, 236 (1950).
2614. Taniguchi S., Asano A., Iida K., Kono M., Omachi K., Egami F., Proc. int. Symp. Enzyme Chem., Tokyo and Kyoto, **2**, 238 (1958).

2615. Taniguchi S., Mitsui H., Nakamura K., Egami F., Ann. Acad. Sci. fenn., Ser. A II, 60, 200 (1955).
2616. Tang J., Wolf S., Caputto R., Trucco R. E., J. biol. Chem., 234, 1174 (1959).
2617. Tappel A. L., Boyer P. D., Lundberg W. O., J. biol. Chem., 199, 267 (1952).
2618. Tarr H. L. A., Biochem. J., 59, 386 (1955).
2619. Taylor E. S., Gale E. F., Biochem. J., 39, 52 (1945).
2620. Taylor J. F., Green A. A., Cori G. T., J. biol. Chem., 173, 591 (1948).
2621. Taylor W. H., Biochem. J., 71, 373 and 384 (1959).
2622. Tchen T. T., J. biol. Chem., 233, 1100 (1958).
2623. Tchen T. T., Bloch K., J. biol. Chem., 226, 921 (1957).
2624. Tchen T. T., Vennesland B., J. biol. Chem., 213, 533 (1955).
2625. Theorell H., Biochem. Z., 278, 263 (1935).
2626. Theorell H., Ark. Kemi Min. Geol., 16A, № 2 (1943).
2627. Theorell H., Ark. Kemi Min. Geol., 16A, № 14 (1943).
2628. Theorell H., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 397), 1951.
2629. Theorell H., Advanc. Enzymol., 20, 31 (1958).
2630. Theorell H., Åkesson Å., J. Amer. chem. Soc., 63, 1804 (1941).
2631. Theorell H., Åkesson Å., J. Amer. chem. Soc., 63, 1812 (1941).
2632. Theorell H., Åkesson Å., Arch. Biochem. Biophys., 65, 439 (1956).
2633. Theorell H., Bonnichsen R., Acta chem. scand., 5, 1105 (1951).
2634. Theorell H., Holman R. T., Åkesson Å., Acta chem. scand., 1, 571 (1947).
2635. Theorell H., McKinley McKee J. S., Acta chem. scand., 15, 1797 (1961).
2636. Theorell H., McKinley McKee J. S., Nature, Lond., 192, 4797 (1961)
2637. Theorell H., Nygaard A. P., Acta chem. scand., 8, 1649 (1954).
2638. Theorell H., Nygaard A. P., Bonnichsen R., Acta chem. scand., 8, 1490 (1954).
2639. Thiers R. E., Vallee B. L., J. biol. Chem., 226, 911 (1957).
2640. Thoai N. V., Bull. Soc. Chim. biol., 39, 197 (1957).
2641. Thoma J. A., Koshland D. E., J. mol. Biol., 2, 169 (1960).
2642. Thoma R. W., Peterson W. H., J. biol. Chem., 210, 569 (1954).
2643. Thompson E. O. P., Biochim. biophys. Acta, 10, 633 (1953).
2644. Thompson E. O. P., J. biol. Chem., 208, 565 (1954).
2645. Thompson R. H. S., in Symposium on the Biochemical Reactions of Chemical Warfare Agents, ed. R. T. Williams, Biochem. Soc. Symposia №2 (Cambridge University Press, p. 28) 1948.
2646. Thorn M. B., Nature, Lond., 164, 27 (1949).
2647. Thorn M. B., Biochem. J., 54, 540 (1953).
2648. Thorne C. B., in A Symposium on Amino Acid Metabolism, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 41), 1955.
2649. Thorne C. B., Gómez C. G., Housewright R. D., J. Bact., 69, 357 (1955).
2650. Thorne C. B., Molnar D. M., J. Bact., 70, 420 (1955).
2651. Thorne C. J. R., Biochim. biophys. Acta, 42, 175 (1960).
2652. Thorne C. J. R., Biochem. J., 76, 4P (1960).
2653. Thurlow S., Biochem. J., 19, 175 (1925).
2654. Tietz A., Ochoa S., Arch. Biochem. Biophys., 78, 477 (1958).
2655. Tiselius A., Hjertén S., Levin Ö., Arch. Biochem. Biophys., 65, 132 (1956).
2656. Tissières A., Biochem. J., 50, 279 (1951).
2657. Tissières A., Nature, Lond., 174, 183 (1954).
2658. Tissières A., Biochem. J., 64, 582 (1956).
2659. Tissières A., Burris R. H., Biochim. biophys. Acta, 20, 436 (1956).
2660. Tissières A., Schlessinger D., Gros F., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 46, 1450 (1960).
2661. Tissières A., Slater E. C., Nature, Lond., 176, 736 (1955).
2662. Tissières A., Watson J. D., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 48, 1061 (1962).
2663. Todd C. M., Proc. Univ. Otago med. Sch., 32, 9 (1954).
2664. Todrick A., Brit. J. Pharmacol., 9, 76 (1954).
2665. Tokuyama K., J. Biochem., Tokyo, 46, 1379, 1453 (1959).
2666. Tomkins G. M., J. biol. Chem., 218, 437 (1956).
2667. Tomkins G. M., J. biol. Chem., 225, 13 (1957).
2668. Tomkins G. M., Michael P. J., Curran J. F., Biochim. biophys. Acta, 23, 655 (1957).
2669. Tookey H. L., Balls A. K., J. biol. Chem., 218, 213 (1956).

2670. Tookey H. L., Wilson R. G., Lohmar R. L., Dutton H. J., J. biol. Chem., **230**, 65 (1958).
2671. Topper Y. J., J. biol. Chem., **225**, 419 (1957).
2672. Touster O., Reynolds V. H., Hutcheson R. M., J. biol. Chem., **221** 697 (1956).
2673. Tracey M. V., Biochem. J., **42**, 281 (1948).
2674. Tracey M. V., Biochem. J., **61**, 579 (1955).
2675. Troll W., Sherry S., Wachman J., J. biol. Chem., **208**, 85 (1954).
2676. Truhowitz S., Feldman D., Morgenstern S. W., Hunt V. M., Biochem. J., **80**, 369 (1961).
2677. Trucco R. E., Caputto R., Leloir L. F., Mittelman N., Arch. Biochem., **18**, 137 (1948).
2678. Труфанов А. Ф., Курсанова И. А., Бюлл. эксп. биол. и мед., **22**, № 6 (1946).
2679. Tsuboi K. K., Estrada J., Hudson P. B., J. biol. Chem., **231**, 19 (1958).
2680. Tsuboi K. K., Hudson P. B., Arch. Biochem. Biophys., **61**, 197 (1956).
2681. Tsuboi K. K., Hudson P. B., J. biol. Chem., **224**, 879 (1957).
2682. Tsuboi K. K., Penefsky Z. J., Hudson P. B., Arch. Biochem. Biophys., **68**, 54 (1957).
2683. Tsuboi K. K., Wiener G., Hudson P. B., J. biol. Chem., **224**, 621 (1957).
2684. Tsuchihashi M., Biochem. Z., **140**, 63 (1923).
2685. Tubbs P. K., Greville G. D., Biochim. biophys. Acta, **34**, 290 (1959).
2686. Turba F., Advanc. Enzymol., **22**, 417 (1960).
2687. Turba F., Gundlach G., Biochem. Z., **327**, 186 (1955).
2688. Turner D. H., Turner J. F., Biochem. J., **74**, 486 (1960).
2689. Turner D. H., Turner J. F., Biochem. J., **79**, 143 (1961).
2690. Turner J. F., King J. E., Biochem. J., **79**, 147 (1961).
2691. Tuve T. W., Anfinsen C. B., J. biol. Chem., **235**, 3437 (1960).
2692. Udenfriend S., Clark C. T., Titus E., J. Amer. chem. Soc., **75**, 501 (1953).
2693. Udenfriend S., Cooper J. R., J. biol. Chem., **194**, 503 (1952).
2694. Uehara K., J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect., **73**, 311 (1952).
2695. Umbarger H. E., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, **26**, 301 (1961).
2696. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F., Manometric Techniques (Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1945).
2697. Umbreit W. W., Heneage P., J. biol. Chem., **201**, 15 (1953).
2698. Umbreit W. W., O'Kane D. J., Gunsalus I. C., J. Bact., **51**, 576(1946).
2699. Underkofler L. A., Roy D. K., Cereal Chem., **28**, 18 (1951).
2700. Успенская В. Д., Горячечкова Е. В., Биохимия, **23**, 212 (1958).
2701. Utter M. F., Keech D. B., J. biol. Chem., **235**, PC17 (1960).
2702. Utter M. F., Kurahashi K., J. biol. Chem., **207**, 787 (1954).
2703. Uziel M., Hanahan D. J., J. biol. Chem., **226**, 789 (1957).
2704. Vagelos P. R., Earl J. M., Stadtman E. R., J. biol. Chem., **234**, 490 (1959).
2705. Valentine R. C., Jackson R. L., Wolfe R. S., Biochem. biophys. res. Comm., **7**, 453 (1962).
2706. Valentine R. C., Wolfe R. S., J. biol. Chem., **235**, 1948 (1960).
2707. Vallee B. L., Advanc. Protein Chem., **10**, 317 (1955).
2708. Vallee B. L., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 3, p. 225), 1960.
2709. Vallee B. L., Adelstein S. J., Olson J. A., J. Amer. chem. Soc., **77** 5196 (1955).
2710. Vallee B. L., Ropley J. A., Coombs T. L., Neurath H., J. biol. Chem., **235**, 64 (1960).
2711. Vallee B. L., Stein E. A., Sumerwell W. N., Fischer E. H., J. biol. Chem., **234**, 2901 (1959).
2712. Vallee B. L., Wacker W. E. C., J. Amer. chem. Soc., **78**, 1771 (1956).
2713. Vallee B. L., Williams R. J. P., Hoch F. L., J. biol. Chem., **234**, 2621 (1959).
2714. Van Asperen K., J. Ins. Physiol., **3**, 306 (1959).
2715. Van Asperen K., Oppenoorth F. J., Ent. exp. and appl., **3**, 68 (1960).
2716. Van Eys J., Kaplan N. O., J. Amer. chem. Soc., **79**, 2782 (1957).
2717. Van Eys J., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **228**, 305 (1957).
2718. Van Goor H., Enzymologia, **8**, 113 (1940).
2719. Van Heyningen R., Pirie A., Biochem. J., **53**, 436 (1953).
2720. Van Orden H. O., Smith E. L., J. biol. Chem., **208**, 751 (1954).
2721. Van Slyke D. D., Cullen G. E., J. biol. Chem., **19**, 141 (1914).
2722. Van Vunakis H., Herriott R. M., quoted by C. B. Anfinsen and R. R. Redfield, Advanc. Protein Chem., **11**, 1 (1956).

2723. Van Vunakis H., Herriott R. M., Biochim. biophys. Acta, **22**, 537 (1956).
2724. Van Vunakis H., Herriott R. M., Biochim. biophys. Acta, **23**, 600 (1957).
2725. Veibel S., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 621), 1951.
2726. Velick S. F., in A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 491), 1954.
2727. Velick S. F., Ronzoni E., J. biol. Chem., **173**, 627 (1948).
2728. Velick S. F., Strittmatter P., J. biol. Chem., **221**, 265 (1956).
2729. Velick S. P., Udenfriend S., J. biol. Chem., **203**, 575 (1953).
2730. Velick S. P., Wicks L. F., J. biol. Chem., **190**, 741 (1951).
2731. Venkataraman R., Racker E., J. biol. Chem., **236**, 1876 and 1883 (1961).
2732. Vernon L. P., J. biol. Chem., **222**, 1035 and 1045 (1956).
2733. Vesell E. S., Bearn A. G., Ann. N.Y. Acad. Sci., **75**, 286 (1958).
2734. Villar-Palasí C., Larner J., Arch. Biochem. Biophys., **86**, 270 (1960).
2735. Villavicencio M., Barron E. S. G., Arch. Biochem. Biophys., **67**, 121 (1957).
2736. Villee C. A., Spencer J. M., J. biol. Chem., **235**, 3615 (1960).
2737. Villela G. G., Affonso O. R., Mitidieri E., Arch. Biochem. Biophys., **59**, 532 (1955).
2738. Viswanatha T., Liener I. E., Arch. Biochem. Biophys., **61**, 410 (1956).
2739. Vogel H. J., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **39**, 578 (1953).
2740. Vogel H. J., in Symposium on the chemical Basis of Heredity, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 276), 1957. (Химические основы наследственности, ИЛ, М., 1960.)
2741. Vogel H. J., Bonner D. M., J. biol. Chem., **218**, 97 (1956).
2742. Volk W. A., J. biol. Chem., **235**, 1550 (1960).
2743. Wachsman J. T., J. biol. Chem., **223**, 19 (1956).
2744. Wada H., Snell E. E., J. biol. Chem., **236**, 2089 (1961).
2745. Waelsch H., Advanc. Enzymol., **13**, 237 (1952).
2746. Wagner R. P., Mitchell H. K., Genetics and Metabolism (New York, John Wiley, 1955). (Р. Вагнер, Г. Митчелл, «Генетика и обмен веществ», ИЛ, М., 1958.)
2747. Wagner-Jauregg T., Möller E. F., Z. physiol. Chem., **236**, 222 (1935).
2748. Wahba A. J., Basilio C., Speyer J. F., Lengyel P., Miller R. S., Ochoa S., Proc. nat. Acad. Sci., U.S., **48**, 1683 (1962).
2749. Wainio W. W., Eichel B., Gould A., J. biol. Chem., **235**, 1521 (1960).
2750. Wakabayashi M., Fishman W. H., J. biol. Chem., **236**, 996 (1961).
2751. Wakil S. J., Biochim. biophys. Acta, **18**, 314 (1955).
2752. Wakil S. J., Biochim. biophys. Acta, **19**, 497 (1956).
2753. Wakil S. J., J. Amer. chem. Soc., **80**, 6465 (1958).
2754. Wakil S. J., Bressler R., J. biol. Chem., **237**, 687 (1962).
2755. Wakil S. J., Green D. E., Mii S., Mahler H. R., J. biol. Chem., **207**, 631 (1954).
2756. Wakil S. J., Hübscher G., J. biol. Chem., **235**, 1554 (1960).
2757. Wakil S. J., Waite M., Biochem. biophys. res. Comm., **9**, 18 (1962).
2758. Waksman S. A., Carey C. L., Allen M. C., J. Bact., **28**, 213 (1934).
2759. Waldschmidt-Leitz E., Köhler F., Biochem. Z., **258**, 360 (1933).
2760. Waley S. G., Biochim. biophys. Acta, **10**, 27 (1953).
2761. Waley S. G., Watson J., Biochem. J., **55**, 328 (1953).
2762. Walker A. C., Schmidt C. L. A., Arch. Biochem., **5**, 445 (1944).
2763. Walker D. A., Biochem. J., **74**, 216 (1960).
2764. Walker G. C., Nicholas D. J. D., Biochim. biophys. Acta, **49**, 350 (1961).
2765. Walker G. C., Nicholas D. J. D., Biochim. biophys. Acta, **49**, 361 (1961).
2766. Walker G. J., Whelan W. J., Nature, Lond., **183**, 46 (1959).
2767. Walker J. B., Arch. Biochem. Biophys., **59**, 233 (1955).
2768. Walker J. B., J. biol. Chem., **204**, 139 (1953).
2769. Walker J. B., J. biol. Chem., **218**, 549 (1956).
2770. Walker J. B., J. biol. Chem., **224**, 57 (1957).
2771. Walker J. B., J. biol. Chem., **235**, 2357 (1960).
2772. Wall M. C., Laidler K. J., Arch. Biochem. Biophys., **43**, 299 (1953).
2773. Wallach D. P., Grisolia S., J. biol. Chem., **226**, 277 (1957).
2774. Wallenfels K., Arens A., Biochem. Z., **332**, 247 (1960).
2775. Wallenfels K., Bernt E., Angew. Chem., **64**, 28 (1952).
2776. Wallenfels K., Malhotra O. P., in The Enzymes, 2nd edn., ed P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 409), 1960.
2777. Wallenfels K., Zarnitz M. L., Laule G., Bender H., Keser M., Biochem. Z., **331**, 459 (1959).
2778. Walti A., J. Amer. chem. Soc., **60**, 493 (1938).
2779. Wang T. P., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **206**, 311 (1954).
2780. Wang T. P., Sable H. Z., Lampen J. O., J. biol. Chem., **184**, 17 (1950).
2781. Wang T. Y., Tsou C. L., Wang Y. L., Scientia Sinica, **5**, 73 (1956).

2782. Warburg O., Biochem. Z., **177**, 471 (1926).
2783. Warburg O., Christian W., Biochem. Z., **242**, 206 (1931).
2784. Warburg O., Christian W., Biochem. Z., **254**, 438 (1932).
2785. Warburg O., Christian W., Biochem. Z., **287**, 291 (1936).
2786. Warburg O., Christian W., Biochem. Z., **298**, 368 (1938).
2787. Warburg O., Christian W., Biochem. Z., **303**, 40 (1949).
2788. Warburg O., Christian W., Biochem. Z., **310**, 384 (1941).
2789. Warburg O., Christian W., Biochem. Z., **314**, 149 (1943).
2790. Warburg O., Christian W., Griese A., Biochem. Z., **282**, 157 (1935).
2791. Warburg O., Negelein E., Biochem. Z., **214**, 64 (1929).
2792. Warren L., Buchanan J. M., J. biol. Chem., **229**, 613 (1957).
2793. Warringa M. G. P. J., Giuditta A., J. biol. Chem., **230**, 111 (1958).
2794. Warringa M. G. P. J., Smith O. H., Giuditta A., Singer T. P., J. biol. Chem., **230**, 97 (1958).
2795. Watanabe Y., Konishi S., Shimura K., J. Biochem., Tokyo, 44, 299 (1957).
2796. Watkins W. M., Hassid W. Z., Biochem. biophys. res. Comm., 5, 260 (1961).
2797. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, Lond., **171**, 964 (1953).
2798. Watt D., Krampitz L. O., Fed. Proc., **6**, 301 (1947).
2799. Wattiaux R., Baudhuin P., Berleur A.-M., de Duve C., Biochem. J., **63**, 608 (1956).
2800. Wattiaux R., de Duve C., Biochem. J., **63**, 606 (1956).
2801. Waugh D. F., Baughman D. J., Miller K. D., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 215) 1960.
2802. Weaver R. H., Herbst E. J., J. biol. Chem., **231**, 647 (1958).
2803. Weaver R. H., Lardy H. A., J. biol. Chem., **236**, 313 (1961).
2804. Webb E. C., Biochem. J., **42**, 96 (1948).
2805. Webb E. C., in Symposium on the biochemical Reactions of Chemical Warfare Agents, ed. R. T. Williams, Biochem. Soc. Symposium (Cambridge University Press, № 2, p. 50), 1948.
2806. Webb E. C., in Steric Aspects of the Chemistry and Biochemistry of Natural Products, ed. J. K. Grant and W. Klyne, Biochem. Soc. Symposium (Cambridge University Press, № 19, p. 90), 1960.
2807. Webb E. C., Biochem. J. (in preparation).
2808. Webb E. C., Unpublished observations.
2809. Webb E. C., Morrow P. F. W., Biochem. J., **73**, 7 (1959).
2810. Webster G., Whitman S. L., Biochim. biophys. Acta, **61**, 316 (1962).
2811. Webster G. C., Biochim. biophys. Acta, **49**, 141 (1961).
2812. Webster G. C., Varner J. E., Arch. Biochem. Biophys., **52**, 22 (1954).
2813. Webster G. C., Varner J. E., J. biol. Chem., **215**, 91 (1955).
2814. Webster G. R., Marples E. A., Thompson R. H. S., Biochem. J., **65**, 374 (1957).
2815. Webster L. T., Davie E. W., J. biol. Chem., **236**, 479 (1961).
2816. Weibull C., Tiselius A., Arkiv Kemi Min. Geol., **19A**, № 19 (1945).
2817. Weichselbaum T. E., Amer. J. clin. Path., Tech. Sect., **10**, 40 (1946).
2818. Weil L., Buchert A. R., Arch. Biochem. Biophys., **34**, 1 (1951).
2819. Weil L., Buchert A. R., Maher J., Arch. Biochem. Biophys., **40**, 245 (1952).
2820. Weil L., James S., Buchert A. R., Arch. Biochem. Biophys., **46**, 266 (1953).
2821. Weil-Malherbe H., Biochem. J., **31**, 2080 (1937).
2822. Weil-Malherbe H., Biochem. J., **33**, 1997 (1939).
2823. Weil-Malherbe W., Green R. H., Biochem. J., **61**, 218 (1955).
2824. Weimberg R., J. biol. Chem., **234**, 727 (1959).
2825. Weimberg R., Doudoroff M., J. biol. Chem., **217**, 607 (1955).
2826. Weisblum B., Benzer S., Holley R. W., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **48**, 1449 (1962).
2827. Weiss S. B., Fed. Proc., **21**, 120 (1962).
2828. Weiss S. B., Kennedy E. P., Kiyasu J. Y., J. biol. Chem., **235**, 40 (1960).
2829. Weiss S. B., Nakamoto T., J. biol. Chem., **236**, PC18 (1961).
2830. Weiss S. B., Smith S. W., Kennedy E. P., J. biol. Chem., **231**, 53 (1958).
2831. Weissbach A., Horecker B. L., Hurwitz J., J. biol. Chem., **218**, 795 (1956).
2832. Weissbach H., Lovenberg W., Udenfriend S., Biochim. biophys. Acta, **50**, 177 (1961).
2833. Weissbach H., Redfield B. G., Axelrod J., Biochim. biophys. Acta, **54**, 190 (1961).
2834. Weissbach H., Redfield B. G., Udenfriend S., J. biol. Chem., **229**, 953 (1957).
2835. Weissbach H., Toohey J., Barker H. A., Proc. nat. Acad. Sci., U.S., **45**, 521 (1959).

2836. Weissmann B., J. biol. Chem., **216**, 783 (1955).
2837. Wellner D., Meister A., J. biol. Chem., **235**, PC12 (1960).
2838. Wellner D., Meister A., J. biol. Chem., **235**, 2013 (1960).
2839. Wenner C. E., Spirtes M. A., Weinhouse S., Cancer Res., **12**, 44 (1952).
2840. Werkheiser W. C., Bartley W., Biochem. J., **66**, 79 (1957).
2841. Werle E., Biochem. Z., **311**, 270 (1942).
2842. Werle E., Koch W., Biochem. Z., **319**, 305 (1949).
2843. Werle E., Krautzun H., Biochem. Z., **296**, 315 (1938).
2844. Werle E., Menniken G., Biochem. Z., **291**, 325 (1937).
2845. Westerfeld W. W., Richert D. A., Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **71**, 181 (1949).
2846. Westhead E. W., Malmström B. G., J. biol. Chem., **228**, 655 (1957).
2847. Westley J., Green J. R., J. biol. Chem., **234**, 2325 (1959).
2848. Wharton D. C., Griffiths D. E., Arch. Biochem. Biophys., **96**, 103 (1962).
2849. Wheat R. W., Ajl S. J., J. biol. Chem., **217**, 897 (1955).
2850. Whistler R. L., Masak E., J. Amer. chem. Soc., **77**, 1241 (1955).
2851. Whitaker D. R., Arch. Biochem. Biophys., **43**, 253 (1953).
2852. Whitaker D. R., Arch. Biochem. Biophys., **53**, 439 (1954).
2853. Whitby L. G., Biochem. J., **57**, 390 (1954).
2854. White J. W., Arch. Biochem. Biophys., **39**, 238 (1952).
2855. Whiteley H. R., Osborn M. J., Huennekens F. M., J. biol. Chem., **234**, 1538 (1959).
2856. Whitfeld P. R., Heppel L. A., Markham R., Biochem. J., **60**, 15 (1955).
2857. Whittaker V. P., Adams D. H., Nature, Lond., **164**, 315 (1949).
2858. Wickremasinghe R. L., Fry B. A., Biochem. J., **58**, 268 (1954).
2859. Widmer C., Crane F. L., Biochim. biophys. Acta, **27**, 203 (1958).
2860. Wieland O., Suyter M., Biochem. Z., **329**, 320 (1957).
2861. Wieme R. J., Clin. chim. Acta, **4**, 46 (1959).
2862. Wiest W. G., J. biol. Chem., **234**, 3115 (1959).
2863. Wiggans D. S., Winitz M., Fruton J. S., Yale J. Biol. Med., **27**, 11 (1954).
2864. Wijesundera S., Woods D. D., Biochem. J., **55**, viii (1953).
2865. Wilkinson G. N., Biochem. J., **80**, 324 (1961).
2866. Wilkinson J. F., Biochem. J., **44**, 460 (1949).
2867. Williams E. J., Sung S.-C., Laskowski M., J. biol. Chem., **236**, 1130 (1961).
2868. Williams F. R., Hager L. P., J. biol. Chem., **236**, PC36 (1961).
2869. Williams R. J. P., Biol. Rev., **28**, 381 (1953).
2870. Williams V. R., McIntyre R. T., J. biol. Chem., **217**, 467 (1955).
2871. Williams W. J., Litwin J., Thorne C. B., J. biol. Chem., **212**, 427 (1955).
2872. Williams-Ashman H. G., Banks J., Arch. Biochim. Biophys., **50**, 513 (1954).
2873. Williams-Ashman H. G., Banks J., J. biol. Chem., **223**, 509 (1956).
2874. Williamson M. B., Passmann J. M., J. biol. Chem., **222**, 151 (1956).
2875. Willstätter R., Kraut H., Ber. dtsch. chem. Ges., **56**, 1117 (1923).
2876. Willstätter R., Kuhn R., Lind O., Memmen F., Z. physiol. Chem., **167**, 303 (1927).
2877. Wilson D. G., King K. W., Burris R. H., J. biol. Chem., **208**, 863 (1954).
2878. Wilson D. M., Ajl S., J. Bact., **73**, 410 (1957).
2879. Wilson D. M., Ajl S., J. Bact., **73**, 415 (1957).
2880. Wilson I. B., in A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action, ed. W. D. McElroy and B. Glass (Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 642), 1954.
2881. Wilson I. B., Disc. Faraday Soc. «The Physical Chemistry of Enzymes», № 20, p. 119 (1955).
2882. Wilson I. B., in The Enzymes, 2nd edn., ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 4, p. 501), 1960.
2883. Wilson I. B., Bergmann F., J. biol. Chem., **186**, 683 (1950).
2884. Wilson I. B., Bergmann F., Nachmansohn D., J. biol. Chem., **186**, 781 (1950).
2885. Wilson I. B., Harrison M. A., J. biol. Chem., **236**, 2292 (1961).
2886. Wilson I. B., Hatch M. A., Ginsburg S., J. biol. Chem., **235**, 2312 (1960).
2887. Winitz M., Bloch-Frankenthal L., Izumiya N., Birnbaum S. M., Baker C. G., Greenstein J. P., J. Amer. chem. Soc., **78**, 2423 (1956).
2888. Winkelman J., Ashwell G., Biochim. biophys. Acta, **52**, 170 (1961).
2889. Winkelman J., Lehninger A. L., J. biol. Chem., **233**, 794 (1958).
2890. Wittenberg J., Kornberg A., J. biol. Chem., **202**, 431 (1953).
2891. Wixom R. L., Shatton J. B., Strassman M., J. biol. Chem., **235**, 128 (1960).
2892. Wojtczak L., Lehninger A. L., Biochim. biophys Acta, **51**, 442 (1961).

2893. Wold F., Ballou C. E., J. biol. Chem., **227**, 301 (1957).
2894. Wold F., Ballou C. E., J. biol. Chem., **227**, 313 (1957).
2895. Wolfe R. G., Nielands J. B., J. biol. Chem., **221**, 61 (1956).
2896. Wolff E. C., Black S., Downey P. F., J. Amer. chem. Soc., **78**, 5958 (1956).
2897. Wolff J. B., Britton B. B., Nakada H. I. Arch. Biochem. Biophys., **66**, 333 (1957).
2898. Wolff J. B., Kaplan N. O., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 346), 1955.
2899. Wolff J. B., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **218**, 849 (1956).
2900. Wolin M. J., Simpson F. J., Wood W. A., J. biol. Chem., **232**, 559 (1958).
2901. Wolochow H., Putman E. W., Doudoroff M., Barker H. A., Hassid W. Z., J. biol. Chem., **180**, 1237 (1949).
2902. Wolstenholme G. E. W., O'Connor M., eds. CIBA Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols (London, Churchill, 1959).
2903. Wolstenholme G. E. W., O'Connor C. M., eds., CIBA Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport (London, Churchill, 1961).
2904. Wong D. T. O., Ajl S. J., J. Amer. chem. Soc., **78**, 3230 (1956).
2905. Wong J. T.-F., Hanes C. S., Canad. J. Biochem. Physiol., **40**, 763 (1962).
2906. Wong K. K., Meister A., Moldave K., Biochim. biophys. Acta, **36**, 531 (1959).
2907. Wong K. K., Moldave K., J. biol. Chem., **235**, 694 (1960).
2908. Wood B. J. B., Rainbow C., Biochem. J., **78**, 204 (1961).
2909. Wood H. G., Stjernholm R., Proc. nat. Acad. Sci. U.S., **47**, 289 (1961).
2910. Wood W. A., in Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 242), 1955.
2911. Wood W. A., Gunsalus I. C., J. biol. Chem., **181**, 171 (1949).
2912. Wood W. A., Gunsalus I. C., J. biol. Chem., **190**, 403 (1951).
2913. Wood W. A., McDonough M. J., Jacobs L. B., J. biol. Chem., **236**, 2190 (1961).
2914. Woolf B., quoted in Allgemeine Chemie der Enzyme by J. B. S. Haldane and K. G. Stern (Dresden and Leipzig, Steinkopff-Verlag, p. 119), 1932.
2915. Woolen J. W., Heyworth R., Walker P. G., Biochem. J., **78**, 111 (1961).
2916. Wosilait W. D., J. biol. Chem., **235**, 1196 (1960).
2917. Wosilait W. D., Nason A., J. biol. Chem., **206**, 255 (1954).
2918. Wosilait W. D., Nason A., Terrell A. J., J. biol. Chem., **206**, 271 (1954).
2919. Wosilait W. D., Sutherland E. W., J. biol. Chem., **218**, 469 (1956).
2920. Wright B. E., J. biol. Chem., **219**, 873 (1956).
2921. Wu E. C., Laskowski M., J. biol. Chem., **235**, 1680 (1960).
2922. Wyngaarden J. B., Ashton D. M., J. biol. Chem., **234**, 1492 (1959).
2923. Wynn C. H., Dodgson K. S., Biochem. J., **66**, 44P (1957).
2924. Yakushiji E., Okunuki K., Proc. imp. Acad. Japan, **16**, 299 (1940).
2925. Yamada E. W., J. biol. Chem., **236**, 3043 (1961).
2926. Yamada E. W., Jakoby W. B., J. biol. Chem., **234**, 941 (1959).
2927. Yamada E. W., Jakoby W. B., J. biol. Chem., **235**, 589 (1960).
2928. Yamada H., Yasunobu K. T., J. biol. Chem., **237**, 1511 (1962).
2929. Yamada H., Yasunobu K. T., J. biol. Chem., **237**, 3077 (1962).
2930. Yamafuji K., Eto M., Enzymologia, **16**, 247 (1954).
2931. Yamafuji K., Omura H., Miura K., Enzymologia, **16**, 75 (1953).
2932. Yamafuji K., Shimamura M., Omura H., Enzymologia, **17**, 359 (1956).
2933. Yamamoto Y., Beevers H., Biochim. biophys. Acta, **48**, 20 (1961).
2934. Yamanaka T., Kijimoto S., Okunuki K., Kusai K., Nature, Lond., **194**, 759 (1962).
2935. Yamashina I., Acta chem. scand., **10**, 739 (1956).
2936. Yamashina I., Ark. Kemi, **9**, 225 (1956).
2937. Yamashina I., Biochim. biophys. Acta, **20**, 433 (1956).
2938. Yamazaki I., Mason H. S., Piette L., J. biol. Chem., **235**, 2444 (1960).
2939. Yamazoye S., J. Biochem., Tokyo, **23**, 319 (1936).
2940. Yanagita T., Foster J. W., J. biol. Chem., **221**, 593 (1956).
2941. Yaniv H., Gilvarg C., J. biol. Chem., **213**, 787 (1955).
2942. Yanofsky C., J. biol. Chem., **194**, 279 (1952).
2943. Yanofsky C., J. biol. Chem., **198**, 343 (1952).
2944. Yanofsky C., J. biol. Chem., **223**, 171 (1956).
2945. Yanofsky C., Reissig J. L., J. biol. Chem., **202**, 567 (1953).
2946. Yates P. A., Pardee A. B., J. biol. Chem., **227**, 677 (1957).
2947. Ефимочкина Е. Ф., Брауништейн А. Е., Arch. Biochem. Biophys. **83**, 350 (1959).
2948. Yonetani T., J. biol. Chem., **235**, 3138 (1960).
2949. Yonetani T., J. biol. Chem., **236**, 1680 (1961).
2950. York J. L., Grollman A. P., Bublitz C., Biochim. biophys. Acta, **47**, 298 (1961).

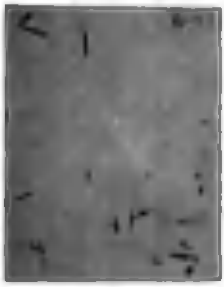
2951. Yoshikawa H., J. Biochem., Tokyo, **38**, 1 (1951).
2952. Yotsuyanagi Y., C. R. Acad. Sci., Paris, **248**, 274 (1959).
2953. Yunis A. A., Fischer E. H., Krebs E. G., J. biol. Chem., **235**, 3163 (1960).
2954. Yura T., Vogel H. J., J. biol. Chem., **234**, 335 (1959).
2955. Yura T., Vogel H. J., J. biol. Chem., **234**, 339 (1959).
2956. Zabin I., Kepes A., Monod J., J. biol. Chem., **237**, 253 (1962).
2957. Zakrzewski S. F., Nichol C. A., J. biol. Chem., **235**, 2984 (1960).
2958. Zamecnik P. C., Keller E. B., J. biol. Chem., **209**, 337 (1954).
2959. Zatman L. J., Kaplan N. O., Colowick S. P., J. biol. Chem., **200**, 197 (1953).
2960. Zatman L. J., Kaplan N. O., Colowick S. P., Ciotti M. M., J. Amer. chem. Soc., **75**, 3293 (1953).
2961. Zechmeister L., Rohdewald M., Fortschr. Chem. org. Naturst., **8**, 341 (1951).
2962. Zechmeister L., Tóth G., Enzymologia, **7**, 165 (1940).
2963. Zechmeister L., Tóth G., Vajda É., Enzymologia, **7**, 170 (1939).
2964. Zelitch J., J. biol. Chem., **201**, 719 (1953).
2965. Zelitch I., J. biol. Chem., **216**, 553 (1955).
2966. Zelitch I., J. biol. Chem., **234**, 3077 (1959).
2967. Zelitch I., Ochoa S., J. biol. Chem., **201**, 707 (1953).
2968. Zeller E. A., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 2, p. 536), 1951.
2969. Zeller E. A., Birkhäuser H., Mislin H., Wenk M., Helv. chim. Acta, **22**, 1381 (1939).
2970. Zimmerman S. B., Kornberg A., J. biol. Chem., **236**, 1480 (1961).
2971. Zittle C. A., Dellamonica E. S., Custer J. H., Krikorian R., Arch. Biochem. Biophys., **56**, 469 (1955).
2972. Zittle C. A., Reading E. H., J. biol. Chem., **160**, 519 (1945).
2973. Bender A. E., Krebs H. A., Biochem. J., **46**, 210 (1950).
2974. Bergmann M., Advanc. Enzymol., **2**, 49 (1942).
2975. Boyer P. D., Dehuca M., Ebner K. E., Nultquist D. E., Peter J. B., J. biol. Chem., **237**, 3306 (1962).
2976. Brown G. M., J. biol. Chem., **234**, 370 (1959).
2977. Cornforth J. W., Ryback G., Popjak G., Donninger C., Schroepfer G., Biochem. biophys. res. Comm., **9**, 371 (1962).
2978. Diven W. F., Johnston R. B., Scholz J. J., Biochim. biophys. Acta, **67**, 161 (1962).
2979. Dodgson K. S., Spencer B., Williams K., Biochem. J., **61**, 374 (1955).
2980. Green D. E., Leloir L. F., Nocito W., J. biol. Chem., **161**, 559 (1945).
2981. Griffiths D. E., Chaplain R. A., Biochem. biophys. res. Comm., **8**, 497 501 (1962).
2982. Hartley B. S., Biochem. J., **64**, 27P (1956).
2983. Hoagland M. B., Novelli G. D., J. biol. Chem., **207**, 767 (1954).
2984. Jacobson K. B., Kaplan N. O., J. biol. Chem., **226**, 427 (1957).
2985. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J., **41**, 500 (1947).
2986. Keilin D., Hartree E. F., Nature, Lond., **176**, 200 (1955).
2987. King H. K., Biochem. J., **54**, XI (1953).
2988. Krasna A. I., J. biol. Chem., **233**, 1010 (1958).
2989. Lynen F., Ochoa S., Biochim. biophys. Acta, **12**, 299 (1953).
2990. Massey V., Alberty R. A., Biochim. biophys. Acta, **13**, 354 (1954).
2991. Myrbäck K., Neumüller G., in The Enzymes, 1st edn., ed. J. B. Sumner and K. Myrbäck (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 653), 1951.
2992. Northrop J. H., J. gen. Physiol., **30**, 177 (1946).
2993. Ravel J. M., Norton S. J., Humphreys J. S., Shive W., J. biol. Chem., **237**, 2845 (1962).
2994. Renson J., Weissbach H., Udenfriend S., J. biol. Chem., **237**, 2261 (1962).
2995. Robbins E. A., Boyer P. D., J. biol. Chem., **224**, 121 (1957).
2996. Sohler M. R., Seibert M. A., Kreke C. W., Cook E. S., J. biol. Chem., **198**, 281 (1952).
2997. Stockell A., Smith E. L., J. biol. Chem., **227**, 1 (1957).
2998. Sturge L. M., Whittaker V. P., Biochem. J., **47**, 518 (1950).
2999. Suzuki I., Werkman C. H., Arch. Biochem. Biophys., **76**, 103 (1958).
3000. Theorell H., Nygaard A. P., Bonnichsen R., Acta chem. scand., **9**, 1148 (1955).
3001. Theorell H., Paul K. G., Ark. Kemi Min. Geol., **18A**, № 12 (1945).
3002. Tristram G. R., in The Proteins, ed. H. Neurath and K. Bailey (New York, Academic Press, Vol. 1, p. 181), 1953.
3003. Velick S. F., Biochim. biophys. Acta, **2**, 228 (1956).

АТЛАС КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

В помещаемом ниже атласе воспроизводятся микрофотографии почти всех кристаллических ферментов, для которых такие микрофотографии когда-либо были опубликованы. Под каждым снимком указаны: название фермента его шифр, источник, из которого он получен, увеличение при съемке и ссылка на литературные данные. Для некоторых ферментов приведено несколько снимков; это сделано либо в том случае, когда один и тот же фермент получен из разных источников, либо тогда, когда из одного и того же источника получены различные кристаллические формы фермента.



Алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) (печень лошади)
× 900 [289]



Алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1) (дрожжи)
× ? [1935]



Глицерофосфатдегидрогеназа (1.1.1.8) (мышцы кролика)
× 1000 [529]



Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27) (сердечная мышца быка)
× 330 [2544]



Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27) (печень крысы)
× 1500 [829]



Редуктаза полуальдегида тартроновой кислоты (1.1.1.g) (*Pseudomonas*)
× 2800 [875]



Малатдегидрогеназа (1.1.1.37) (надосадочная фракция сердечной мышцы быка)
× 300 [697]



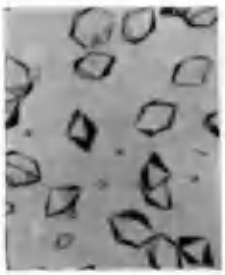
Фосфоглюконатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) (1.1.1.44) (дрожжи)
× 1700 [2105]



Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (1.1.1.49) (молочная железа коровы)
× 370 [1276]



Кортизонредуктаза (1.1.1.53) (*Streptomyces*)
× 1000 [1179]



Лактатдегидрогеназа (цитохром b_2) (1.1.2.3)
× 42 [1881]



Гликолатоксидаза (1.1.3.1) (листья шпината)
× 480 [788]



Лактатоксидаза (1.1.3.2) (*Mycobacterium*)
× 2150 [2574]



Глюкозооксидаза 1.1.3.4) (*Penicillium*)
× 310 [1499]



Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12) (мышцы кролика)
× 260 [505]



Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12) (дрожжи)
× 55 [2787]



Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (1.2.1.12) («дрожжевой белок 2»)
× 130 [1493]



Пируватдегидрогеназа (1.2.2.2) (*E. coli*)
× 250 [2868]



Ксантиноксидаза (1.2.3.2) (коровье молоко)
× 1000 [105]



Дигидрооротатдегидрогеназа (1.3.3.1) (*Zymobacterium*)
× ? [786]



Глутаматдегидрогеназа (1.4.1.3) (печень человека)
× 1800 [1472]



Оксидаза L-аминокислот (1.4.3.2) (змеиный яд)
× 500 [2838]



Оксидаза D-аминокислот (1.4.3.3) (почки свиньи)
× 545 [1753]



НАДФ·H_2-диафораза (1.6.99.1) (дрожжи)
× 290 [2632]



Цитохромоксидаза (1.9.3.1) (сердечная мышца быка)
× 200 [2949]



Цитохромоксидаза *Pseudomonas* (1.9.3.a)
× 160 [2934]



Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 1-я форма)
× 260 [2567]



Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 2-я форма)
× 265 [2567]



Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 3-я форма)
× 270 [2567]



Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 4-я форма)
× 250 [2338]



Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 5-я форма)
× 250 [2338]



Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 6-я форма)
× 250 [2338]



Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 7-я форма)
× 250 [2338]



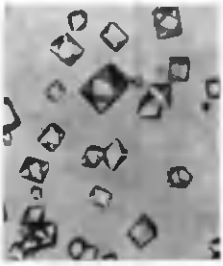
Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 8-я форма)
× 250 [2338]



Каталаза (1.11.1.6) (печень быка; 9-я форма)
× 250 [2338]



Каталаза (1.11.1.6) (эритроциты лошади)
× 130 [287]



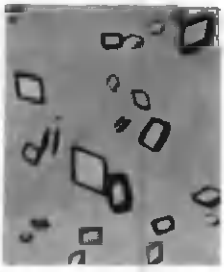
Каталаза (1.11.1.6) (*Micrococcus lysodeikticus*)
× 200 [1077]



Пероксидаза (1.11.1.7) (корень хрена)
× 680 [2626]



Пероксидаза (1.11.1.7) (репа)
× 390 [1170]



Пероксидаза *a* (1.11.1.7) (японская редька; 1-я форма)
× 350 [1861]



Пероксидаза *a* (1.11.1.7) (японская редька; 2-я форма)
× 265 [1861]



Пероксидаза *c* (1.11.1.7) (японская редька)
× 120 [1863]



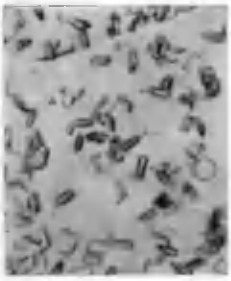
Пероксидаза (1.11.1.7) (зародыши пшеницы)
× 150 [2598]



Пероксидаза (1.11.1.7) (коровье молоко)
× 700 [3001]



Липоксигеназа (1.99.2.1) (семена сои)
× 1200 [2634]



Аспартат-карбамоилтрансфераза (2.1.3.2) (*E. coli*) × ? [2383]



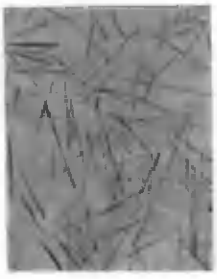
Транскетолаза (2.2.1.1) (дрожжи) × 1600 [587]



α-Глюканфосфорилаза *a* (2.4.1.1) (мышцы кролика) × 90 [893]



α-Глюканфосфорилаза *b* (2.4.1.1) (мышцы кролика) × 350 [501]



α-Глюканфосфорилаза *b* (Mg — АМФ-димер) (мышцы кролика) × 50 [735]



Гексокиназа (2.7.1.1) (дрожжи; 1-я форма) × 38 [1493]



Гексокиназа (2.7.1.1) (*дрожжи; 2-я форма*) × 68 [138]



Глицеролкиназа (2.7.1.30) (печень голубя) × 140 [2860]



Пируваткиназа (2.7.1.40) (мышцы кролика) × 600 [2654]



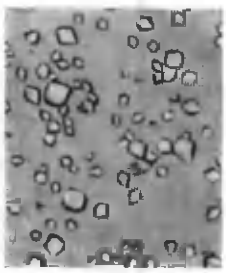
Фосфоглицераткиназа (2.7.2.3) (дрожжи; 1-я форма)
× ? [354]



Фосфоглицераткиназа (2.7.2.3) (дрожжи; 2-я форма)
× ? [354]



Креатинкиназа (2.7.3.2) (мышцы кролика)
× 190 [1479]



Аргининкиназа (2.7.3.3) (мышцы краба)
× ? [2592]



Аденилаткиназа (2.7.4.3) (мышцы кролика)
× 200 [1981]



Фосфоглюкомутаза (2.7.5.1) (мышцы кролика)
× 160 [1920]



Фосфоглицеромутаза (2.7.5.3) (дрожжи)
× 300 [2239]



Люцифераза (светляки)
× 42 [894]



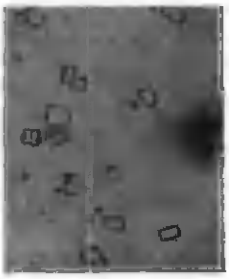
Рибонуклеаза (2.7.7.16) (поджелудочная железа быка; 1-я форма)
× 190 [1490]



Рибонуклеаза (2.7.7.16) (поджелудочная железа быка; 2-я форма)
× 200 [1490]



Рибонуклеаза (2.7.7.16) (поджелудочная железа быка; 3-я форма)
× 140 [1490]



Тиосульфат-сульфидтрансфераза (2.8.1.1) (печень быка; 1-я форма)
× 150 [2472]



Тиосульфат-сульфидтрансфераза (2.8.1.1) (печень быка; 2-я форма)
× 300 [2472]



Фосфолипаза А (3.1.1.4) (яд кобры)
× 200 [574]



Дезоксирибонуклеаза (3.1.4.5) (поджелудочная железа быка)
× 250 [1492]



α-Амилаза (3.2.1.1) (поджелудочная железа человека)
× 730 [2991]



α-Амилаза (3.2.1.1) (слюна человека; 1-я форма)
× 550 [2991]



α-Амилаза (3.2.1.1) (слюна человека; 2-я форма)
× 150 [737]



α-Амилаза (3.2.1.1) (поджелудочная железа свиньи)
× 230 [2991]



α-Амилаза (3.2.1.1) (солод)
× 580 [2353]



α-Амилаза (3.2.1.1) (*Aspergillus*; 1-я форма)
× 150 [2699]



α-Амилаза (3.2.1.1) (*Aspergillus*; 2-я форма)
× 205 [736]



α-Амилаза (3.2.1.1) (*Aspergillus*; 3-я форма)
× 1000 [27]



α-Амилаза (3.2.1.1) (*B. stearothermophilus*)
× ? [1708]



α-Амилаза (3.2.1.1) (*B. subtilis*)
× 110 [2991]



β-Амилаза (3.2.1.2) (батат)
× 200 [148]



β-Амилаза (3.2.1.2) (пшеница)
× 940 [1807]



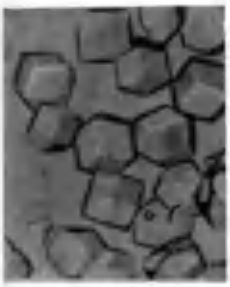
Целлюлаза (3.2.1.4) (*Irpex lacteus*)
× 600 [1974]



Ксиланаза (3.2.1.8) (*Bacillus*)
× 600 [1210]



Олиго-1,6-глюкозидаза (3.2.1.10) (*Aspergillus*)
× 150 [2699]



Мурамидаза (3.2.1.17) (яичный белок; 1-я форма)
× ? [3]



Мурамидаза (3.2.1.17) (яичный белок; 2-я форма)
× 95 [40]



Мурамидаза (3.2.1.17) (селезенка кролика; 1-я форма)
× 75 [1261]



Мурамидаза (3.2.1.17) (селезенка кролика; 2-я форма)
× 60 [1262]



β-Галактозидаза (3.2.1.23) (*E. coli*)
× 200 [2777]



Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) (сок поджелудочной железы быка; 1-я форма)
× 47 [76]



Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) (сок поджелудочной железы быка; 2-я форма)
× 170 [2130]



Карбоксипептидаза А (3.4.2.1) (сок поджелудочной железы быка; 3-я форма)
× 170 [2130]



Пепсин (3.4.4.1) (желудочный сок свиньи; 1-я форма)
× 60 [1083]



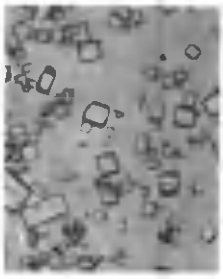
Пепсин (3.4.4.1) (желудочный сок свиньи; 2-я форма)
× 120 [2992]



Пепсин (3.4.4.1) (желудок лосося)
× ? [1988]



Гастрицин (3.4.4.a) (желудочный сок человека)
× 480 [2616]



Реннин (3.4.4.3) (желудок телёнка)
× 300 [235]



Трипсин (3.4.4.4) (сок поджелудочной железы быка)
× 200 [1495]



α-Химотрипсин (3.4.4.5) (сок поджелудочной железы быка; 1-я форма)
× 120 [1494]



α-Химотрипсин (3.4.4.5) (сок поджелудочной железы быка; 2-я форма)
× 150 [1487]



β-Химотрипсин (3.4.4.5) (сок поджелудочной железы быка)
× 315 [1487]



γ-Химотрипсин (3.4.4.5) (сок поджелудочной железы быка)
× 12 [1487]



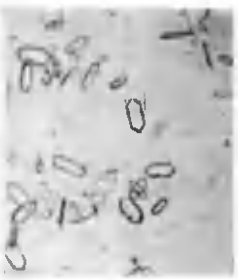
Химотрипсин B (3.4.4.6) (сок поджелудочной железы быка; 1-я форма)
× 120 [342]



Химотрипсин B (3.4.4.6) (сок поджелудочной железы быка; 2-я форма)
× 210 [342]



Панкреатопептидаза E (3.4.4.7) (поджелудочная железа свиньи)
× 750 [1579]



Папаин (3.4.4.10) (латекс *Carica papaya*)
× 100 [147]



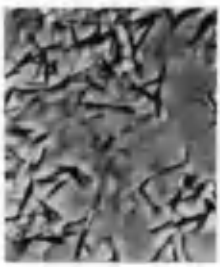
Субтилопептидаза A (3.4.4.16) (*B. subtilis*)
× 135 [953]



Субтилопептидаза A (3.4.4.16) (*B. subtilis*)
× 200 [972]



Аспергиллопептидаза А (3.4.4.17) (*Aspergillus*)
× 300 [518]



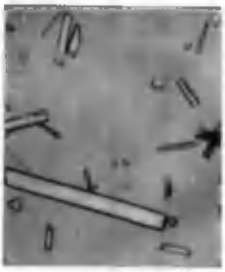
Стрептококковая пептидаза А (3.4.4.18)
× 560 [687]



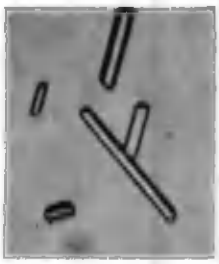
Пептидаза *Tetrahymena* (ртутная соль)
× 40 [2738]



Уреаза (3.5.1.5) (семена *Canavalia*)
× 1300 [2565]



Пенициллиназа (3.5.2.6) (*B. cereus*)
× 27 [2102]



Аргиназа (3.5.3.1) (печень быка)
× 340 [120]



АМФ-дезаминаза (3.5.4.6) (мышцы кролика)
× ? [1530]



Тиаминаза II (3.5.99.2) (*B. aneurinolyticus*)
× 650 [1206]



Неорганическая пирофосфатаза (3.6.1.1) (дрожжи)
× 110 [1491]



Альдолаза (4.1.2.7) (печень быка)
× 440 [2063]



Альдолаза (4.1.2.b) (мышцы крысы; 1-я форма)
× ? [2789]



Альдолаза (4.1.2.b) (мышцы крысы; 2-я форма)
× 150 [2620]



Альдолаза (4.1.2.b) (мышцы кролика; 1-я форма)
× 85 [2620]



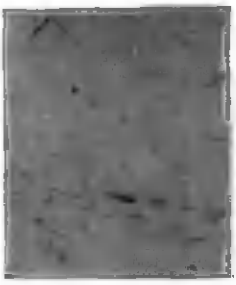
Альдолаза (4.1.2.b) мышцы кролика; 2-я форма)
× 260 [161]



Цитрат-синтаза (4.1.3.7) (сердечная мышца свиньи)
× 600 [2012]



Фумаратгидратаза (4.2.1.2) (сердечная мышца свиньи; 1-я форма)
× 600 [1743]



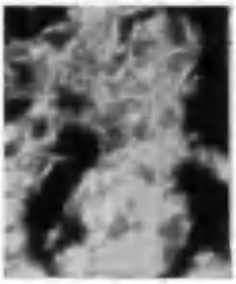
Фумаратгидратаза (4.2.1.2) (сердечная мышца свиньи; 2-я форма)
× 400 [1743]



Фумаратгидратаза (4.2.1.2) (сердечная мышца свиньи; 3-я форма)
× ? [1751]



Фосфопируват-гидратаза (4.2.1.11) (ртутная соль) (дрожжи)
× 300 [2788]



Фосфопируват-гидратаза (4.2.1.11) (мышцы кролика)
× 850 [529]



Гомосериндегидратаза (4.2.1.15) (печень крысы)
× 500 [1757]



Еноил-КоА—гидратаза (4.2.1.17) (печень быка)
× 700 [2521]



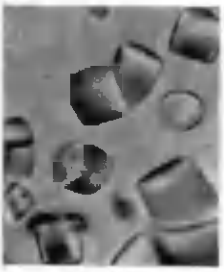
Триозофосфат-изомераза (5.3.1.1) (мышцы кролика; 1-я форма)
× 200 [529]



Триозофосфат-изомераза (5.3.1.1) (мышцы кролика; 2-я форма)
× 200 [529]



Стероид-Δ-изомераза (5.3.3.1) (*Pseudomonas*)
× 56 [1323]



Пропионил-КоА — карбоксилаза (6.4.1.3) (сердечная мышца свиньи)
× 850 [1326]

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абсолютная скорость реакции 13, 132, 135
Авидин, сродство к биотину 365
Автолиз клеток 530, 545
— освобождение ферментов 36
Агликон, влияние на специфичность 196
Агматин, образование см. 4.1.1.19
Аденилаткиназа 131, 167, 254, 260, 396, 538, 540
Аденилилсульфат, образование см. 2.7.7.4 и 2.7.7.5
Аденилосукцинат-лиаза 521, 522
Аденилосукцинат-синтетаза 522
Аденозилгомоцистеин, образование 255, 507
Аденозилгомоцистеиназа 507
S-аденозилметионин как переносчик метильных групп 164, 355, 473, 515
— образование 355, 506; см. также 2.4.2.13
— реакции 506, 507; см. также подгруппу 2.1.1
Аденозиндезаминаза 539, 554
Аденозиндифосфат см. АДФ
Аденозинди(три)фосфат, структура 348
Аденозинмонофосфат см. АМФ
Аденозинтетрафосфат, гидролиз АТФ-азой 374
Аденозинтрифосфат см. АТФ
— структура 348
Аденозин-5′-фосфат см. АМФ
Аденозинфосфаты, количество в тканях 533
Аденокарциномы, ферменты 561
Адсорбция фракционная 43, 44
АДФ, гидролиз см. 3.6.1.a, 3.6.1.5, 3.6.1.9
— как переносчик фосфата 347, 349, 350
— сродство к магнию 385—387
Азид как ингибитор ферментов 299, 344
Азотистая кислота, действие на РНК 431
Азот общий, определение 33, 34
— экскреция 557, 558
Аконитатгидратаза 26, 56, 182, 262, 481, 495, 497
— распространение 539, 540, 556
цис-Аконитат, образование из цитрата 495; см. также 4.2.1.3 и 4.2.1.4
— превращение в изоцитрат 495; см. также 4.2.1.3
Акрилат, образование см. 4.4.1.3
Акрилил-КоА, образование см. 4.4.1.b и 6.2.1.1
Акролеин, образование см. 1.1.1.a
— торможение ферментов 303
Активаторная константа 24, 379
Активаторы, влияние на специфичность —373, 374
Активаторы в препаратах ферментов 61, 62
— ионы металлов 272, 370—388
— концентрация 373
— неорганические 318, 370—392
— соединение с ингибиторами 293
Активация панкреатического комплекса 464, 465
— пепсиногена 455—457
— прокарбоксипептидазы 464
— проренина 457
— субстрата ферментом 13, 235
— трипсиногена 458, 459
— ферментов субклеточных частиц 540, 545
— — участвующих в свертывании крови 465
— химотрипсиногена 459—463
— энергия 13, 135, 136, 139—144
Активированный комплекс 13, 135—137, 243, 274
«Активирующий», ошибочное использование термина 155, 174
Активность, единицы 22, 23
— каталитического центра 22
— — — холинэстеразы, определение 295, 296
— молекулярная 21—23
— раствора фермента, определение понятия 33
— удельная 21—23, 33
— фермента, тест 32
Активный ацетальдегид 364
— *ацетил* 351, *см. также Ацетил-КоА*
— сульфат 169
— центр, асимметрия 574, 575
— — атомы металла 375, 399
— — демаскирование во время образования фермента 455, 459
— — изучение при помощи меченых соединений 310
— — ионизация 108, 114, 115, 118, 129, 130, 140, 310, 409
— — определение понятия 12, 13
— — строение 193, 231, 259, 408—417
— — число в молекуле фермента 295, 310, 399, 403—407
Актин 375
Актомиозин 375
Акцепторы водорода, спектрофотометрический метод изучения 25, 26
— специфичность дегидрогеназ 163, 274, 275
Аланин, образование см. 4.1.1.12
Аланин-аминотрансфераза 45

β-Аланин, образование 3.4.3.4, 3.5.1.6 и 4.1.1.11
— превращение в пантотенат 488, 518; см. также 6.3.2.1
Алкалоиды как ингибиторы ферментов 313, 314
— распространение 547
Алкаптонурия 572
Алкилсульфенат, образование см. 4.4.1.4
Алкилтрансферазы 166
Алкогольдегидрогеназа, действие Zn^{++} 377, 399
— дрожжей, аминокислотный состав 401
— — кинетика действия 93, 246, 247
— индукция 420
— использование для изучения фосфатаз 26
— механизм действия 240—242, 322
— печени, кинетика действия 392
— реакции 469, 470, 493
— содержание цинка 274, 399
— специфичность 179, 183, 184
— строение 397, 400, 404, 405, 413
— торможение 301, 302, 413
Аллели 569—572
Аллин-лиаза 362
Аллотреонинальдолаза 181
Альбинизм 570, 572
Альдегиддегидрогеназа 184, 242, 372, 470
Альдегид-лиазы 172
«Альдегидмутаза» 470
Альдегидоксидазы 179, 275, 302
Альдегиды в форме гидратов 237
— окисление 162, 237
— соединение с НАД 326
Альдозо-мутаротаза 230, 263
Альдозы и кетозы, взаимопревращения см. подгруппу 5.3.1
Альдолаза 172, 397, 539, 552
— внутриклеточная локализация 542, 546, 552
— использование для определения фосфофруктокиназы 26
— кинетика действия 57
— образование 418, 419
— реакции 480, 491, 502, 525, 526
— строение 397, 400, 407
— торможение 301
D-альтроза, изомеризация см. 5.3.1.3
Алюминия гидроокись, приготовление 43
— ион, активация ферментов 371, 372, 376
Амберлит IR-50 45
Амидин-лиазы 173; см. также подгруппу 4.3.2
Амидины, гидролиз см. подгруппы 3.5.3 и 3.5.4
— как ингибиторы ферментов 313
Амидофосфаты, образование 167
Амидофосфорибозилтрансфераза 259, 520
Амиды, гидролиз см. подгруппы 3.5.1 и 3.5.2
— — пептидазами 197—226
Амилаза, образование 419
— реакции 170
— строение 396, 400, 564—566
— термостабильная форма 132
α-Амилаза, аминокислотный состав 401
β-Амилаза 170, 187, 397, 410, 414
Амилопектин, синтез 165
— фосфоролиз 186
Аминоацилаза I 562
Аминоацил-АМФ-ангидриды 271
п-Аминобензойная кислота 368, 369
Аминобутират, образование см. 4.1.1.15
α-Аминогруппы в ферментах и белках 399; см. также Концевые аминокислотные остатки
Аминогруппы, ионизация 129
— переносчики 346, 347, 361, 362
2-Амино-2-дезокси-D-глюкозо-6-фосфат, изомеризация см. 5.3.1.10
Аминокислотный состав ферментов 400, 401, 564
Аминокислоты, замена 430—432, 565, 566, 571
— ионизация 114, 115
— окисление, механизм 162, 237
— полинуклеотидный код 427, 430—434
— последовательность в белках 564—566, 571
— — — ферментах 400, 415, 447, 459, 463, 566
— — — цитохромах 341, 565
— репрессирующее действие 442—444
— фактор включения 434, 435
Аминоптерин 368, 369
Амитал как ингибитор в дыхательной цепи 311, 333, 476
Аммония ион как активатор фермента 372, 373
АМФ, биосинтез 489, 522
— связывание фосфорилазой 399
АМФ-дезаминаза 398, 551
Аналоги кофермента А 229, 351
— НАД и НАДФ 246, 360, 561, 564, 567
Ангидролейковорин 353
Андростендион, образование из андростерона см. 1.1.1.50
— — — тестостерона см. 1.1.1.j, 1.1.1.k и 1.1.1.51
Анионы как активаторы ферментов 78, 121, 370, 388—392
Аномеры, специфичность 184, 187
Анри уравнение 105
Антагонизм ионов 371—373
Антивитамины 368, 369
Антигенные группы ферментов 317
Антимицин А 311, 333, 342, 476
Антитела 317
Антиферменты 317, 568
Антихолинэстеразы 294
Апофермент, образование 441
Аппарат Гольджи 534, 537
L-арабиноза 230; см. также 5.1.3.3
Арабинозоизомераза 509
β-L-арабинозо-1-фосфат, образование см. 2.7.1
D-арабинозо-5-фосфат, образование см. 4.1.2.e
L-арабинулоза как акцептор глюкозильной группы 187
Аргиназа 316, 397, 411, 420, 515
— активация 272, 375—377, 385
— распространение 539, 546, 551, 557
Аргининдекарбоксилаза 301, 559
Аргинин как репрессор 442, 444
— превращение в орнитин см. 2.6.2.1 и 3.5.3.1
Аргининосукцинат-синтетаза 372, 514
Ариламин-ацетилтрансфераза 256

Арил-4-гидроксилаза 538
Арилсульфатаза 389, 410
— *кинетика действия* 58, 61, 127
— распространение 538, 543
Аррениуса теория 13, 136
— уравнение 136, 139, 141—144
Арсенат 255
— гидролиз в его присутствии 166, 255, 494
— как активатор фермента 275, 389
— — акцептор гликозильных групп 187, 255
Асимметрическое фосфорилирование глицерина 181
Асимметричные двуосновные кислоты, *ионизация* 112—115
Аскорбат, образование см. 1.3.2.3; см. также Аскорбиновая кислота
Аскорбатоксидаза 300, 329, 330, 397
Аскорбатредуктаза 330
Аскорбиновая кислота как восстановитель 330, 342
— — окисление 97, 98, 329, 330, 342, 343, 532
— — строение и свойства 329, 330
Аспарагиназа 177
Аспарагин как репрессор 442
Аспарагиновая кислота в активном центре 412, 415
Аспарагинсинтетаза как репрессор 442
Аспартат — аммиак-лиаза 56, 229, 262, 263, 567
Аспартат-аминотрансфераза 45, 166, 397, 513, 539, 553, 557
Аспартат — 1-декарбоксилаза 559
Аспартат как переносчик аммония 488, 513, 514
Аспартат-карбамоилтрансфераза 397, 442, 523
Аспартаткиназа 442, 451, 453
D-аспартат-оксидаза 357
Атропин 314
— гидролиз см. 3.1.1.10
АТФ-аза миозина 143, 257, 372, 374, 398, 539, 551
АТФ в процессе образования ферментов 419
— — реакциях нуклеотидилтрансферазы 349
— — *синтезе полипептидов* 435
— — фосфорилировании см. подгруппы 2.7.1 и 2.7.4
— гидролиз см. 3.6.1.a, 3.6.1.3, 3.6.1.4, 3.6.1.5, 3.6.1.8 и 3.6.1.9
— как депо энергии 532
— — переносчик фосфата 167, 472, 473
— комплекс с металлами 306, 385, 386
— образование 532
— предотвращение набухания митохондрий 531
— свободная энергия гидролиза 164, 531
— специфичность киназ 187, 347
— *сродство к магнию* 385—388
— участие в ферментативных реакциях, колориметрический метод 30
— функции 347, 349, 350, 359, 426, 429, 531—533
Аутокаталитический процесс 455, 456—458, 464, 465
Аутоокисление цитохромов 340
Ацетаткиназа 256, 510
Ацетат-КоА-лиагаза см. Ацетил-КоА — синтетаза
β-Ацетамидодезоксиглюкозидаза 538, 550, 557
Ацетилгидролиноат, образование 328, 364, 493, 531; см. также 1.2.4.1 и 2.3.1.12
— свободная энергия гидролиза 531
Ацетилглутамат 487, 488, 513, 523
Ацетилдибромтирозин 405
Ацетилизатин, образование см. 1.7.3.2
Ацетилированный фермент 74, 251, 256, 288
Ацетил-КоА — ацетилтрансфераза 505, 510
Ацетил-КоА — гидролаза 498
Ацетил-КоА — карбоксилаза 365, 499
Ацетил-КоА, колориметрический метод *определения* 30
— образование см. 1.2.1.10, 2.3.1.8, 2.3.1.9 и 2.3.1.10
— реакции 351, 481, 482, 496, 497, 510; см. также подгруппу 2.3.1
— свойства 351
Ацетил-КоА — синтетаза 270, 372, 497
N-ацетил-5-метокситриптамин, образование см. 2.1.1.4
Ацетилорнитин-деацетилаза 442
N-ацетилсериламид 417
Ацетилтиаминпирофосфат 481
Ацетилфенилаланилдииодтирозин 411
Ацетилфосфаты 30
Ацетилхолин, образование см. 2.3.1.6
— структура 193, 314
— торможение при высоких концентрациях субстрата 193
Ацетилхолинэстераза 307—309, 311, 313, 315, 316
— распространение 193, 538, 554, 557, 560
— специфичность 193—195
— строение 407, 410
— торможение 288, 407
N-ацетилцистеамин как аналог кофермента А 352
Ацетилэстераза 307
Ацетоацетат, обмен 485, 505
— образование 505; см. также 1.1.1.30, 3.7.1.2 и 4.1.3.4
Ацетоацетил-КоА, образование 505, 510; см. также 1.1.1.35, 1.1.1.36, 2.3.1.9, 2.3.1.16, 2.8.3.5 и 4.1.3.5
Ацетоин, образование 364; см. также 1.1.1.45
Ацетолфосфат, образование см. 1.1.1.7 и 2.7.1.29
Ацетон, образование см. 4.1.1.4
— приготовление активного сухого порошка из ткани 37
— разрушение клеток 36
— фракционирование ферментов 19, 39, 40
— экстракция убихинона 332
Ацил-АМФ как промежуточный продукт 270
Ацилирование фермента 248, 251, 256, 307
Ацил-КоА-дегидрогеназа 184, 276, 357, 498
Ацил-КоА, образование 174, 351
Ацил-КоА — синтетаза 498
Ацилтрансферазы 164, 165, 231, 351
Ацилфосфаты, образование 167, 248, 531, 532; см. также 1.2.3.3, 2.3.1.8, 2.7.2.1 и 4.1.2.9
Ацильные группы, переносчики 350, 351, 472, 473

Базальные тельца ресничек 534
Бактерии как источник ферментов 36
— строение клетки 535, 543
— термостабильные ферменты 132
Бактериостатические вещества 454
Бактериофаги, ДНК 421, 426
БАЛ («британский антилюизит») 305, 311, 342
Барбитурат, образование см. 1.2.99.1
Барий как активатор ферментов 372
Белки, видовые различия 564—566
— гидролиз как комплексный процесс 60
— денатурация 39, 49, 132, 133
— денатурированные, образование комплексов с металлами 306
— ионизация 129
— константа седиментации 50, 395, 398, 564
— переваривание, механизм 170
— природа ферментов 11, 12, 13, 50, 51, 132, 395
— разрушение внутри клетки 418, 419
— растворимость в растворах солей 42
— реакция с подацетатом 302
— синтез 420—436, 574, 575
— спиральная конфигурация 239, 402
Бензальдегид, образование см. 4.1.1.7 и 4.1.2.10
Бесконкурентное торможение 282
Бетаин 185
Бетаинальдегид, образование см. 1.1.99.1
Бикарбонатные буферы 27
Бимолекулярные реакции, константа скорости 71, 96
— — ферментативные 70—72, 88—94
Биология ферментов 530—577
Биолюминесценция 349, 530, 533
Биосинтез ароматических соединений 573
— белка 420—436, 533
— общие механизмы 532, 533
— последовательные реакции 445, 446
— система с многими путями, репрессия 451, 452
— ферментов 418—454, 533, 574—577
— — контроль генов 420, 436—454
— энергия 530, 532, 533
Биотин 174, 269, 270, 365, 366
Биохимическое повреждение 280
Бифункциональные катализаторы, согласованная атака 235
Богатые энергией связи 164, 167, 531
Бриггса — Холдейна теория 86—88, 126; см. также Стационарное состояние, кинетика
Брожение, роль дегидрогеназных систем, связанных с коферментом 469
— спиртовое, влияние ингибиторов 302
Бром, активация α-амилазы 389
Бромацетат как ингибитор фермента 413
Бромбензилцианид как ингибитор ферментов 303, 304
Бромелаин см. 3.4.4.c
Бутанол, экстракция ферментов 37
Бутирил-КоА-дегидрогеназа 357, 397

Валиндекарбоксилаза 438
Версен как агент, образующий комплексы с металлами 306, 374
Витамин(ы), отношение к коферментам 367—369
Витамин А, роль в восприятии света 369
Витамин-А-эстераза 538
Витамин-B_1-пирофосфат 364; см. также Тиаминпирофосфат
Витамин B_6 367; см. также Пиридоксин
— B_{12} как переносчик метильных групп 354, 356
— С 329, 367; см. также Аскорбиновая кислота
— К 331, 333
Внутриклеточные структуры 534, 535
— частицы, выделение 474, 535, 536, 544
Внутримолекулярные оксидоредуктазы 173
— трансферазы 173
Вода, концентрация, влияние на скорость ферментативной реакции 72, 74
— содержание, влияние на термостабильность фермента 133
Водород, акцепторы 237
— доноры 237
— и ацетильная группа, комбинированный перенос 480, 481, 493
— перенос в клеточном дыхании 468
— — как источник энергии 347
Водорода ион 108, 119, 140, 244, 245
Водородные связи в ДНК 422, 425
— — — комплексе фермент — субстрат 234
— — разрыв при денатурации 133, 409
Волютина гранулы 534
Восстановление с помощью $LiAlH_4$ 244
Восстановленный кофермент как кофактор гидроксилаз 163
Время, необходимое для активации фермента металлом 373, 385
— — —образования комплекса трипсин — ингибитор 465
— переноса 473, 474
Вторичная структура 402, 434
Высушивание из замороженного состояния 20, 50
— инактивирование ферментов 20
Выход продукта при очистке фермента 35, 36

D-галактогексодиальдоза, образование см. 1.1.3.c
Галактоза, система превращений 485, 486, 506
D-галактоза, мутаротация 230 см. 5.1.3.3
— окисление см. 1.1.3.5 и 1.1.3.c
L-галактоза, изомеризация 5.3.1.3
β-Галактозидаза 196, 316, 401, 538, 550, 557
— неактивная форма 438, 439, 449
— образование 418, 419, 437, 439, 440, 444, 447, 451
Галактозидпермеазы 444
Галактозиды как индукторы 440
D-галактозо-1-фосфат, гидролиз см. 3.1.3.10
— образование см. 2.7.1.6
— превращение в глюкозо-1-фосфат 506
Галактозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 506
Галактокиназа 191, 444, 506
D-галактоно-γ-лактон, образование см. 1.1.1.48
Галактофлавин 368
D-галактуронат, восстановление см. 1.1.1.19

D-галактуронат, изомеризация см. 5.3.1.12
Галловая кислота, образование см. 3.1.1.20
Гваякол, образование см. 2.1.1.a
ГДФ, гидролиз см. 3.6.1.6
— как переносчик фосфата 349
Гексозодифосфатаза 502, 525, 539
Гексозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 444, 506
Гексокиназа 189, 254, 316, 397, 491
— специфичность 189
Гем как простетическая группа 394
— число на молекулу 334—337
— *a* 279, 339, 345
— *b*, *c* и *d* 339
Гемоглобин(ы) 399, 429
— взаимозамещение аминокислот 566
— мутантные типы 571
— серповидноклеточный 571
Гемопротеидные ферменты, механизм действия 277—279
— — торможение 299, 344—346, 563
Ген(ы) в оперонах 445—447
— необходимые для образования ферментов 419—434, 559, 566, 569—573
— расположение в хромосомах 445—447
— репликация 422—425
— структурные 447
— *i* 447—449
— *y* 446
— *z* 438, 446—448
Генетические блоки 443, 466, 467, 573
Генные мутации 413, 419, 438, 569—573
Генотип, лимитирование числа возможных ферментов в клетке 419, 466, 467, 569
Гены-регуляторы 447—451
Гепатома, ферменты 561
Гидрогеназа 163, 302, 396
— манометрический метод определения 27
Гидроксамовая кислота 30, 311
Гидроксилаза, определение 158
Гидроксиламинредуктаза, торможение 300
Гидроксиламин, фосфорилирование см. 2.7.1.40
Гидроксилапатит, получение 45
Гидролазы 158, 159, 169—171
— механизм действия 250—261
Гидро-лиазы 173
Гидролиз как реакция переноса 149, 250
— ферментативный, механизм 250—261
Гидроокись алюминия (Cγ), гель 43
Гидросульфит, восстановление коферментов 241, 320—322, 324
— восстановление цитохромов 342
Гипертензин, взаимозамещение аминокислот 566
Гипертензиноген, активация см. 3.4.4.15
Гипоксантин, образование см. 3.2.2.2 и 3.5.4.2
Гистамин-метилтрансфераза 553
Гистамин, образование см. 4.1.1.22
Гистидин — аммиак-лиаза 105, 121, 301, 411
Гистидин, биосинтез 445, 453; см. также 1.1.1.23
— в активном центре 310, 407, 411, 415, 416
— как репрессор 442, 444
— реакция с иодацетатом 304
— — — ионом Ag^+ 306
Гистидиндекарбоксилаза 301, 551, 559
Гистидинол, образование см. 3.1.3.5
Гистидинолдегидрогеназа 442
Гистидинолфосфатаза 442
Гистидинолфосфат-аминотрансфераза 442
Гистохимические методы 535
Гликоген, гидролиз см. 3.2.1.1, 3.2.1.2 и 3.2.1.3
— гранулы в клетках 534, 537
— синтез 165, 350, 486, 507; см. также 2.4.1.11
— фосфоролиз 186, 187, 253, 480, 491; см. также 2.4.1.1
Гликозидазы 170; см. также подгруппу 3.2
— специфичность 196
Гликозил, механизм переноса 252
Гликозилтрансферазы 164, 165
— специфичность 186, 187
Гликозильные группы, перенос 252, 349, 350
Гликолатоксидаза 357, 397, 398, 503
Гликолиз, влияние ингибиторов 280, 281, 303
— манометрический метод 27
— реакции 469, 480, 491—494
Глиоксалаза 169
Глиоксилат — гликолат, перенос водорода 346, 468, 484, 503
— как переносчик водорода 484, 503
— образование см. 1.1.3.1, 2.6.1.4, 3.5.3.4, 2.6.1.4, 4.1.3.1 и 4.1.3.2
Глиоксилатный цикл, реакции 482, 497, 498
Глиоксилатредуктаза 503
Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа 162, 525
— аминокислотный состав 401, 464
— механизм действия 237, 247, 248, 253, 564
— реакции 162, 242, 248, 324, 326, 469, 470, 491, 494
— структура 397, 401, 407, 413
— торможение 248, 302, 313, 407
D-глицеральдегид, фосфорилирование см. 2.7.1.28
L-глицеральдегид, фосфорилирование см. 2.7.1.30
D-глицеральдегид-3-фосфат, изомеризация см. 5.3.1.1
— образование см. 2.7.1.28, 4.1.2.4, 4.1.2.b, 4.1.2.c и 4.1.2.9
Глицератдегидрогеназа 242
D-глицерат, образование см. 1.1.1.26
— окисление см. 1.1.1.29
Глицериды, гидролиз см. 3.1.1.3
Глицерин, асимметрическое фосфорилирование 181
Глицериновое брожение 470
Глицеролдегидрогеназа 372
Глицеролкиназа 180, 398, 516
Глицерофосфат, образование см. 2.3.1.15 и 2.3.1.c
Глицерофосфатдегидрогеназа 242, 470, 549
Глицилглицин-дипептидаза 198—217, 225, 272, 273, 541, 562
Глицилаейцин-дипептидаза 372
Глицин, образование из аминомалоната см. 4.1.1.10
— — — гуанидинацетата, см. 3.5.3.2
— — — саркозина, см. 1.5.3.1

Глицин, образование из серина см. 2.1.2.1
— — — треонина и аллотреонина см. 4.1.2.5, 4.1.2.6
Глицин-амидинотрансфераза 442, 514
Глобин, действие пепсина 219
Глобулярные белки, конфигурация 402
Глубокое охлаждение ферментов 20
Глутамат, изомеризация см. 5.4.99.1
— как переносчик водорода 472
Глутаматдегидрогеназа 180, 274, 393, 398, 399, 470—472, 513, 560, 572
— распространение 538, 540, 544
— специфичность 166, 180, 242
Глутаматдекарбоксилаза 133, 301, 559
γ-Глутамилцистеин-синтетаза 268
Глутамин как репрессор 442
— образование см. 2.4.2.14, 6.3.1.2
Глутаминсинтетаза 372, 442, 556
Глутатион, действие на митохондрии 531
— как кофактор 173, 181, 263, 264, 330, 466, 467, 485, 505, 506
— — кофермент 366, 367
— образование см. 6.3.2.3
— окисленный как ингибитор фермента 306
— реакция с иодацетатом 302
— структура и свойства 328, 329
Глутатион-гомоцистин-трансгидрогеназа 329
Глутатионпероксидаза 531
Глутатионредуктаза 242, 245, 324, 329, 358, 396, 539
Глутатионсинтетаза 268
α-Глюканфосфорилаза 364, 398, 399, 491, 539
— аминокислотный состав 401
— механизм действия 253, 255, 259
— образование димера с Mg^{2+} 399
— специфичность 186, 255
— *a* и *b* 398, 399, 415
Глюкоза как репрессор 451
— метаболизм 480—484, 491, 494, 499, 503, 560, 562
— мутаротация 230; см. также 5.1.3.3
α-Глюкоза как ингибитор α-глюкозидазы 316
α-Глюкозидаза 196, 316, 410
Глюкозилтрансферазы, механизм действия 258, 259
Глюкозоарсенат 255
Глюкозодегидрогеназа 242
Глюкозодифосфат как кофермент 168, 261, 470, 491, 507, 508, 528
Глюкозооксидаза 49, 99, 162, 237, 357, 394, 397
— специфичность 184
Глюкозо-1-фосфат, механизм ферментативной атаки 253, 254, 255, 261
— образование см. 2.4.1.1, 2.4.1.8 и 2.4.1.a
— превращение в галактозо-1-фосфат см. 2.7.7.12 и 5.1.3.2
— — — УДФ-глюкозу см. 2.7.7.9
— фосфорилирование см. 2.7.1.10
Глюкозо-1,6-дифосфат, образование 261; см. также 2.7.1.10 и 2.7.1.41
Глюкозо-6-фосфат 45, 242, 319, 499, 539, 558
— изомеризация см. 2.7.5.1 и 5.3.1.9
— образование 491; см. также 2.7.1.1, 2.7.1.2, 2.7.5.1 и 5.3.1.9
— окислительная система 483, 484, 499
Глюкозо-6-фосфатаза, распространение 538, 550
Глюкозофосфат-изомераза 264, 397, 491, 501, 503, 528, 558
Глюкозо-1-фосфат — уридилилтрансфераза 506, 508, 528
Глюкозо-1-фосфат-фосфодиэстераза 376
Глюкокиназа 191, 507, 539
Глюконолактоназа 500
D-глюкуронат, образование см. 1.99.2.6
— фосфорилирование см. 2.7.1.a
β-Глюкуронидаза 539, 540, 543, 551
Глюкурониды, образование см. 2.4.1.17
ГМФ, образование 489, 523; см. также 6.3.4.1
ГМФ-синтетаза 523
Гомогенизация тканей 558
Гомогенность препаратов клеточных частиц 474, 536
— — ферментов, критерий 50—53, 398
Гомогентизат, образование 485, 504, см. 1.99.1.14
Гомогентизат-оксигеназа 300, 504, 553
Гомосериндегидратаза 228, 362, 397, 507, 562
Гомоцистеин, образование 486, 507
Грамицидин 311
200Å-гранулы у бактерий 534, 537
Граны хлоропластов 537, 546
ГТФ в реакциях нуклеотидилтрансферазы 349
— — — синтетазы 351, 497
— гидролиз см. 3.6.1.3
— и синтез белка 421, 428
— фосфорилирование см. 2.7.1.f, 2.7.1.30, 2.7.1.g, 2.7.1.40, 2.7.4.d и 4.1.1.32
Гуанидинацетат, образование 488, 515; см. также 2.6.2.1
Гуанидинацетат-метилтрансфераза 515
Гуанидиндезаминаза 551
Гуанидинди(три)фосфат, структура 348
Гуанин, превращение в ГМФ см. 2.4.2.8
L-гулонат, образование см. 1.1.1.19

Двухосновные кислоты, ионизация 108—118
Двухуглеродный фрагмент 351; см. также Ацетил-КоА
Дегидразы 156
Дегидроаскорбиновая кислота как акцептор водорода 329, 330
Дегидрогеназные реакции, манометрический метод определения 27
Дегидрогеназы 162, 163, 179, 239—250, 469—473
— в клеточном дыхании 469
— метод Тунберга 27, 28
— D-2-оксикислот 357
— определение при помощи измерения флуоресценции 27
— системы, связанные с коферментом 469—472
— содержание цинка 274
— спектрофотометрические методы 25—27
— специфичность 179, 184, 323, 324, 326
— стереоспецифичность 182, 183, 241, 243
— торможение, механизм 236—250, 274—279, 321—326, 359—361, 375
Дегидрогенирование 236—250

Дезаминокоферменты, трансгидрогенирование см. 1.6.1.1
2-Дезокси-D-глюкоза как субстрат гексокиназы 189
6-Дезокси-D-глюкоза как ингибитор гексокиназы 316
Дезоксирибонуклеаза 170, 396, 538, 562
— аминокислотный состав 401
— как реагент на ДНК 536
— распространение 550, 562
Дезоксирибонуклеиновая кислота, двухцепочечная спирализованная структура 423
— — как матрица для синтеза РНК 421, 425, 426
— — локализация в клетках 536, 544, 545
— — репликация 422—425
— — роль в синтезе белков и ферментов 421—425, 543
Дезокси-УМФ, *образование см. 3.5.4*
Дезоксихолат, экстракция ферментов 37, 341, 475
Дейтерий, применение при изучении ферментативных реакций 100, 182, 240—245, 262, 321—323
Декарбоксилазы аминокислот 172
— — механизм действия 362, 363
— классификация 171, 172
— манометрические методы определения 27
Декстран 186
— *образование см. 2.4.1.2 и 2.4.1.5*
Декстрин-1,6-глюкозидаза 410
Декстрины как ингибиторы фосфорилаз 186
Денатурация белков 39, 133
— — хлороформом 49
— обратимая 409
— тепловая, фракционирование ферментов 39
— ферментов 19, 132, 133, 408
Детергенты, использование для экстрагирования ферментов 37, 545
Диализ 47, 50, 275
Диаминобиотин 365
Диаминоксидаза 301, 313, 552
Диаминопимелат-эпимераза 263
Диамины как ингибиторы ферментов 313
Диастаза 9, 10
Диацетил, образование см. 1.1.1.5
Дигаллат, гидролиз см. 3.1.1.20
Дигидрооротаза 523
Дигидрооротатдегидрогеназа 242, 360, 441, 523
Дигидропорфирин в цитохроме D 339
Дигитонин 475, 531
Диизопропилфторфосфат (ДФФ) 224, 309, 311, 406, 407, 414, 415, 459
— комплекс с ферментом 310, 414, 415
— — — химотрипсином 310
Дикарбоновые кислоты как конкурентные ингибиторы 311
Диксона кривая для определения K_i 291, 292
— уравнение pH-функций 112, 124, 125
Дикумарин 311
— торможение менадионредуктазы 333
Димеркаптопропанол см. БАЛ
Диметилаллилпирофосфат, изомеризация см. 5.3.3.2
Диметилаллилтрансфераза 512
Диметилглицин, образование см. 2.1.1.5
Диметил-*n*-нитрофенилфосфат как ингибитор фермента 309
Диметилрибофлавин 368
Диметилтетин-гомоцистеин-метилтрансфераза 185, 553
Динамическое равновесие белков 418
Динитрофенол как ингибитор фермента 419
— — разобщающий агент 311, 319, 532
— стимуляция АТФ 531
Диоксиацетон, образование см. 1.1.1.6
Диоксиацетон, фосфорилирование см. 2.7.1.30
Диоксиацетон — трансальдолаза (комплекс) 261
Диоксиацетонфосфат, образование см. 1.1.1.8, 1.1.2.1, 2.7.1.30, 4.1.2.2, 4.1.2.7, 4.1.2.b и 5.3.1.1
α,β-Диоксиэтилтиаминпирофосфат 365
Дипептиды, действие пептидаз 197—226
Дисахариды, инверсия при гидролизе 258
Дисмутация, реакции 470
Диссоциация продукта, лимитирование 93, 247
— ферментов 274, 393, 394, 398, 399
Дисульфидные мостики в молекулах ферментов 409
— — разрыв при окислении 409, 462
Дисульфиды как ингибиторы ферментов 306
Дитиоловые соединения, реактивация ферментов 305
Дифенолоксидазы 375, 397
Дифосфаты как коферменты 168, 366, 470, 491
Дифосфоглицериновая кислота, образование 480, 491, 525, 531; см. также 1.2.1.12, 1.2.1.13 и 2.7.2.3
Дифосфопиридиннуклеотид см. НАД
Дифференцировка тканей, регулирование действия ферментов 454, 560—562
Диэтил-*n*-нитрофенилфосфаты как ингибиторы ферментов 309—311, 407
ДНК-нуклеотидилтрансфераза 425
Додецилсульфат натрия 392
Доминантные признаки 570
ДПН см. НАД
ДФФ см. Диизопропилфторфосфат
— комплекс с трипсином 310
DBC-*кофермент 356*
Дыхательная цепь 343, 468
Дыхательные ферменты, фракционирование 475
ДЭАЭ-целлюлоза 46, 48, 531, 567
DPNH-X 324

Единицы фермента, выбор 33
— — определение 22
— — произвольные 21—23, 33
Еноил-КоА — гидратаза 397, 498

Железа ион как активатор фермента 275, 276, 371, 372, 532
— — способ окисления 238, 239
— — сродство к флавинам 274
— *соединения, механизм окисления* 238, 239
Железо в гемопротеидах 238, 239, 278, 279

Железо в металлофлавопротеидах 274, 275, 360, 404
— негемиповое в митохондриях 333, 343
Жирные кислоты, системы окисления 498, 541
Жировой обмен 474, 482, 483, 498, 499
Жировые капельки в клетках 534

Забуферивание, необходимость 18
Загрязнение ферментов бактериальное 20
— — следами других ферментов 18
Замораживание и оттаивание для разрушения клеток 36
— — — — — клеточных частиц 545
— с целью удаления воды 50
Зарин 310, 311
Защита ферментов от ингибиторов 305, 311, 407, 413, 414
Зимогеновые гранулы 534

Идентичность двух ферментов, критерий 178, 563
L-идитолдегидрогеназа, торможение 301
ИДФ, гидролиз см. 3.6.1.6
— образование см. 3.5.4.7
Изменение поверхностного заряда фермента 376
Изобутиламин, образование см. 4.1.1.14
Изомеразы 160, 173
— механизм действия 263—265
Δ-Изомеразы 173, 264; см. также подгруппу 5.3.3
цис-транс-Изомераза 173, 181, 263, 264, 367
Изомеры, специфичность ферментов 179—181, 184, 197, 221—224, 226—230, 320, 327
Изопентенилпирофосфат-изомераза 511
Изопентенилпирофосфат, образование см. 4.1.1.33
Изопреноидные соединения, биосинтез 166, 486, 510, 511
Изопропилантипирин 315
Изотопный обмен, реакции 254—257, 265—270
Изотопы, асимметрия 182, 183
— изучение механизма действия ферментов 167, 182, 240—245, 251—257, 262, 271, 321, 322, 406, 414, 415, 424, 560
— — синтеза и распада белков 418, 435
Изоферменты 317, 561, 567—569
— в клинической диагностике 557, 567, 568
— электрофоретическое разделение 53, 567—569
Изоцитратдегидрогеназа 45, 162, 179, 242, 396, 469, 470, 472, 495, 539, 543
— изоформы 567
— использование для определения аконитатгидратазы 26
— распространение 539, 543, 549
— торможение 300
Изоцитрат-лиаза 498
Имидазол как катализатор 317
Имидазолглицерофосфат-дегидратаза 442
Имидазольная группа в цитохроме с 239
— — ионизация 129
Иминодипептидаза 198—217, 225, 372
Иминокислота, образование из аминокислоты 162, 236
Иммунологические реакции 457
Иммунологическое изучение образования ферментов 461
ИМФ-дегидрогеназа 442, 522
ИМФ, образование 489, 522; см. также 1.6.6.a, 3.5.4.6 и 3.5.4.10
ИМФ-циклогидролаза 442, 522
Инактивация ферментов, влияние на уравнение Аррениуса 143
— — высушиванием 20
— — кислотами или щелочами 19, 106
— — необратимая при изменении pH 106, 449
— — обратимая, влияние на уравнение Аррениуса 143
— — органическими растворителями 19
— — под влиянием низких температур 133, 134
— — предохранение 133, 134, 408
— — реагентами, атакующими активный центр 413, 414
— — тепловая 131—134
— — — влияние pH 133
— — термодинамические параметры 133
Инверсия оптическая при ферментативных реакциях 166, 170, 185, 186, 255, 257—259, 485, 506
— при гидролизе 258
Ингибирующая способность 309, 310
Ингибиторная константа, влияние pH 123—125, 297, 298
— — определение 24, 281, 283, 285, 289—293
Ингибиторы 280—317
— влияние на скорость реакции 58, 59
— в препарате фермента 58, 59
— действие на характер кривой pH — активность 116, 389—391
— дыхания 298, 299, 300, 311, 312, 342—346
— — и фосфорилирования 311
— использование 280, 305, 306, 311, 405—407
— комплексы с металлами 376, 377
— конкурентные 281, 311—316
— — действие 281—285, 291—293, 311—316
— — использование в специфических исследованиях 177, 227, 311, 312
— — стереохимическая специфичность 316
— — требования к структуре 231, 311, 312, 314—316
— неконкурентные 281—293, 311—316
— — действие 286—293
— обратимые и необратимые 281, 307—311
— определение понятия 14
— различные типы влияния 289—292
— смешанного конкурентного и неконкурентного типа 287, 288
— соединение с субстратом или активатором 293
— с очень высоким сродством к ферменту 294—296
— стабилизация ферментов 133, 306, 311
— структура 313—316
— с четвертичным атомом азота 314
— типы 281
Индол, образование см. 4.1.2.8 и 4.2.1.20

Индофенол как акцептор водорода см. 1.1.99.1, 1.1.99.4
Индуктор и рецептор, взаимодействие 438
— концентрация, влияние на скорость синтеза фермента 438
— природа 420
Индукция и репрессия, теория 437, 449—451
— как ослабление репрессии 448
— кинетика 436, 437
— *образования ферментов* 420, 436—451
— серийная 444, 466
— специфичность 437—445
Индуцибельные ферменты 441
Инозин, образование см. 3.5.4.4
Инозиназа 196
Инозинди(три)фосфат, структура 348
Инсектициды как ингибиторы ферментов 280, 572
Инсулин, А-цепь и Б-цепь, действие пептидазы 219
— видовые различия 565
— структура 220, 565
Информационная РНК 421, 425, 426, 428
— — образование 425, 426, 446, 447, 449; см. также 2.7.7.6
Иода ионы, действие на характер pH-кривой α-амилазы 389
Иодацетамид как ингибитор ферментов 303, 304, 404
Иодацетат как ингибитор ферментов 302—304, 413
— — реагент на тиоловые группы 302, 304
Иодозобензоат как ингибитор ферментов 306, 407
Ионизации константы 108, 111, 113, 125, 130
Ионизация ингибитора 297, 298
— комплекса фермент—субстрат 107, 116—130, 297, 409
— НАД 319
— отдельных компонентов ферментных систем 117—130, 297
— субстрата 107, 116—130, 177, 178
— ферментов 107, 108, 116—130, 140, 147, 297, 310, 409
— — влияние температуры 147
Ионы, входящие в состав буферных растворов, влияние на активность ферментов 389—392
— как активаторы ферментов 370—392
— металлов, связывание белками 404, 406
Иприт 304
Источники ферментов 36, 563
Итаконат, образование см. 4.1.1.6
ИТФ, гидролиз 374; см. также 3.6.1.3, 3.6.1.4 и 3.6.1.8
— набухание митохондрий 542
— фосфорилирование см. 2.7.1.1, 2.7.1.11, 2.7.1.f, 2.7.1.40, 2.7.4.d и 4.1.1.32

Кадаверин, образование см. 4.1.1.18
Кадмий как активатор ферментов 371, 372
Казеин, *дефосфорилирование* см. 3.1.3.16
Калий в митохондриях 542
Кальций в митохондриях 542
— действие на активацию трипсиногена 458
— как активатор фермента 371—373, 376
— — ингибитор фермента 371, 372
Кальция оксалат, гранулы в клетке 534
— фосфат, приготовление геля 43
Канаванин см. 3.5.3.1
Карбаматкиназа 513, 523, 558, 564
Карбамоил-β-аланин, гидролиз см. 3.5.1.6
— образование см. 4.1.1.13
Карбамоиласпартат, гидролиз см. 3.5.1.7
— образование см. 2.1.3.2, 3.5.2.3, 3.5.2.4
Карбамоилфосфат, образование 514; см. также 2.7.2.2, 2.7.2.a
— реакции 514; см. также 2.1.3.2, 2.1.3.3
Карбамоилхолин 315
Карбоангидраза 27, 300, 555, 557
Карбобензоксиглицил-D-фенилаланин как *ингибитор карбоксипептидаз* 317
Карбобензоксифенилаланин, включение кислорода 257
1′-N-карбоксибиотин 365
Карбоксилазы 261
Карбоксильная группа, ионизация 129
Карбоксилэстераза, активный центр 193
— кинетика действия 73, 83, 85
— мутантная форма 572
— распространение 538, 540, 554
— специфичность 179, 192, 193
— структура 406, 410, 416
— торможение 307, 406
Карбоксиметилцеллюлоза 46, 261
Карбоксипептидаза, идентификация *концевой группы* 400, 412, 456
— A 396, 400
— — аминокислотный состав 401
— — кинетика действия 100
— — механизм действия 272, 273
— — образование из предшественника 464
— — специфичность 198—217, 223, 374
— — торможение 317
— B 374, 396, 464
Карбонильная группа, реакция с цианидом 299
Карнозиназа, торможение 300
Каталаза 163, 277
— аминокислотный состав 401
— из разных источников 564
— *кинетика действия* 278
— механизм действия 277—279
— молекулярный вес 397
— распространение 553
— *стимуляция фосфорилирования* 531
— торможение 297, 298, 317
— «Kat. f» 22
Каталитический центр, активность 22
Катепсин C 198—217, 222, 223
— D 396
Катехол-метилтрансфераза 553
Катехолоксидаза 300, 317, 397, 543
Катехол-1,2-оксидаза 397
Катионы как активаторы ферментов 370—388
Кейлина — Хартри препараты 475, 545
Кетогексокиназа 191, 372, 539
β-Кетокислоты, гидролиз 221
Кетол-изомеразы 160, 264
Кетоны, *соединения с* НАД 326
Киназа(ы) 167, 347, 349, 473
— из *Penicillium* 458
— и фосфорилазы, совместное действие 265, 533
— механизм действия 253, 254, 256, 259, 260

Киназа(ы) обратимость реакций 167
— определение 158
— подавление активности SH-реагентами 413
— специфичность 179, 187—191, 349
— участие в переносе энергии 532
— фосфорилазы 375
Книга — Альтмана метод 88—92
Кинетика активации предшественников 456, 458, 459, 561
— действия активаторов 377—388
— — ингибиторов 283—297
— — ферментов 12, 54—147, 477
— индукции 436, 437
— стационарного состояния 100—102, 283
Кинуренин, образование см. 3.5.1.9
Кислая фосфатаза 195, 253, 259, 410, 526, 529
— — распространение 538, 540, 544, 557, 562
Кислород молекулярный в биологическом окислении см. подгруппу 1.99
— — как акцептор водорода 237, 246, 343, 345, 359, 503
— — образование в процессе фотосинтеза 490, 524
Кислота, активация пепсиногена 455, 456
— — проренина 457
Кислотные ангидриды, гидролиз 171
Классификация ферментов 148—174
— цитохромов 333—338
Клетка, дыхание, роль цитохромов 299, 341—346
— строение 534—546
— структура ядра в процессе деления 534, 535
Клеточная мембрана, образование 577
— — разрушение 36, 37, 536
— оболочка 534, 544
— — синтез полипептидов 435
Клостридиопептидаза А 397
КоА-трансфераза 169
Кобальт в молекуле кофермента B_{12} и витамина B_{12} 356
— как активатор фермента 272, 273, 371—375
— комплекс с пептидами 273, 274
— неферментативный катализ 265
Код полинуклеотидный 427, 430—434
Козимаза см. НАД
Кокаин, гидролиз см. 3.1.1.10
— как ингибитор фермента 314
Колонки, хроматографический метод разделения ферментов 44—46
Колориметрические методы определения белка 34
Конкурентное торможение см. Торможение конкурентное
Конкуренция между активатором и субстратом 77, 383, 392
— — ферментативными и неферментативными реакциями 479, 480
— — — реакциями 479, 480
— при обратимом торможении 282
Константа активации относительная 392
— ионизации групп 108, 113, 125, 130
— — молекулярная, определение 109
— — — отношение к константе ионизации групп 113, 130
Константа равновесия, выражение через I и K_m 104
— торможения 73
Конститутивные мутанты 447, 448
С- и N-концевые аминокислотные остатки 218, 223, 224, 412, 456, 457, 459, 461, 462, 464
Конфигурация ферментного белка 402, 403, 406, 408, 414, 564
Концевые группы в ферментах и белках 219, 341, 399, 400, 412, 456, 459, 461, 462, 564
Концентрирование растворов ферментов, методы 50
Координационная связь субстрата и металла фермента 234, 376
Координированная индукция 446
Кортикотропин, взаимозамещение аминокислот 566
Кофактор, определение 318
— природа и действие 318—394
— удаление диализом 33, 47
Кофермент(ы), восстановление с помощью $NaBH_3$ 244
— в препаратах ферментов 61, 62
— и витамины 367—369
— кобамидные 265, 355, 456
— митохондриальные 474, 541, 544
— определение понятия 12, 13, 318
— отличие от простетической группы и субстрата 394
— специфичность 318—370
— функция переноса 318—366, 469—472
— эффект высокой концентрации фермента 53, 56, 57
— I 319; см. также НАД
— II см. НАДФ
— A, аналоги 229, 351
— — биосинтез 351, 488, 519
— — гидролиз см. 3.6.1.9
— — носитель тиоловых групп 413
— — структура 351
— B_{12} 356
— — строение 355
— C 352
— Q 331; см. также Убихинон
Красители, восстановление, спектрофотометрический метод 27, 28, 29
— связывание белками 406
Крахмал, гранулы в клетках 534
— синтез 174, 350
— фосфоролиз см. 2.4.1.1
Креатин как репрессор 442
— количество в тканях 533
— образование 488, 515; см. также 2.1.1.2
Креатинкиназа, активация 372, 382
— аминокислотный состав 401
Кристаллизация ферментов 11, 31, 32, 46, 47
Кристаллическая форма ферментов, изменчивость 11, 31, 32, 563, 564
Критерии идентичности ферментов 178
Критическая температура 141—147
Кровь, ферменты, участвующие в свертывании 465
Кротоноил-КоА, образование см. 5.3.3.3
Ксантин, окисление см. 1.2.3.2
Ксантиноксидаза, ингибиторы 281, 299, 300
— кинетика действия 74, 76, 121, 122, 410
— механизм действия 246, 275, 277
— молекулярный вес 398

Ксантиноксидаза, очистка 11
— распространение 539, 547, 557, 560, 562
— свойства 357, 398, 410
— спектрофотометрический метод определения 25
— специфичность 163, 179, 277, 361
Ксантозин-5′-фосфат, образование см. 1.2.1.14
D-ксилоза как ингибитор гексокиназ 316
— мутаротация 230; см. также 5.1.3.3
Ксилозоизомераза 509
D-ксилулоза, образование см. 1.1.1.9, 1.1.1.11 и 5.3.1.5
L-ксилулоза, образование см. 1.1.1.10, 1.1.1.12 и 4.1.1.a
Ксилулозофосфат, образование 484, 486, 490, 500, 508, 509, 526; см. также 2.2.1.1, 2.7.1.17, 4.1.2.9 и 5.1.3.1
Ксилулокиназа 509
Кьельдаля метод определения общего азота 33, 34
«Kat. f» 22
K_A см. Активаторная константа
K_i см. Ингибиторная константа
K_m см. Михаэлиса константа
K_s см. Субстратная константа

Лайнуивера — Бэрка кривая 66, 177, 438
— — — действие ингибитора 285, 289
Лактат, гликолиз 481, 492
Лактатдегидрогеназа 181, 183, 242, 271, 334, 342, 357, 393, 397, 401, 471, 561, 566—569
— в метаболических системах 469, 471, 492
— из разных тканей 564, 566
— кинетика действия 53, 57, 95
— молекулярный вес 397
— специфичность 183, 241, 242, 323, 326
D-лактат, окисление см. 1.1.1.1, 1.1.1.28, 1.1.2.4 и 1.1.99.a
Лактатоксидаза 357
Лактоза, мутаротация 230; см. также 5.1.3.3
— образование см. 2.4.1.c
— окисление см. 1.1.3.5
Лактоилглутатион-лиаза 367, 505
Лактоназы 169
Лактоны, действие эстераз 169
Ланостерол, образование из сквалена 487, 513; см. также 1.99.1.13
Латентный период в действии ферментов 82, 83
Лейцинаминопептидаза 275, 397, 412
— распространение 539, 551
— специфичность 198—217, 224
Лейцин как индуктор 438
L-лейцин, декарбоксилирование см. 4.1.1.14
— — ингибитор аргиназ 316
— как репрессор 452
Лекарственные вещества как ингибиторы ферментов 280, 313, 314
Летальное разбавление 577
Летальные мутации 572
Лецитин, гидролиз см. 3.1.1.4
— образование 488, 516; см. также 2.7.8.2
Лецитиназа см. Фосфолипаза
Лиазы 172, 173
— кетокислот 172
— механизм действия 261, 262
Лиазы определение 149
— специфичность 226—229
Лигазы 161, 174
— механизм действия 174, 265—271
— определение 149
Лизиндекарбоксилаза 301, 361, 559
Лизин как репрессор 442, 451
— образование см. 4.1.1.20
Лизис ферментативный 36
Лизосомы 534, 537, 540, 542, 545
Лизофосфолипаза 301, 392, 554
Лизоцим 170
D-Ликсоза, изомеризация см. 5.3.1.7
— как ингибитор гексокиназ 316
Лимонная кислота, асимметрическое окисление 181, 182
— — цикл 31, 281, 312, 481, 495—497
— — — локализация ферментов 474, 541
Лимфосаркома 562
Лиофилизация см. Высушивание на замороженном состоянии
Липаза 85, 141, 307, 414, 419
— активация кальцием 376
— специфичность 191
Липиды и окислительное фосфорилирование 532
— связываемые белком митохондрий 475, 545
Липоамиддегидрогеназа 246—250, 328, 358, 393, 397, 471, 481, 494
— восстановление препаратом НАД·H_2 249
Липоат как переносчик водорода и ацильных групп 328, 364, 471, 481, 493, 496
Липоат-ацетилтрансфераза 471, 493, 496
Липоевая кислота 327
— — свойства 327, 328
— — соединение с мышьяком 304, 413
— — строение 327
Липоксигеназа 397
Липопротеиды 37, 475
Липофильные ионы как активаторы ферментов 392
Лития ион как ингибитор ферментов 372
Лихенин 186
— гидролиз см. 3.2.1.6
Логарифмическая кривая, правила для интерпретации 124
Логарифмическое уравнение pH-функций 111, 112, 119—121, 124, 125, 127, 130
Люизит 305
Люмихром, образование см. 3.5.99.1
Люцифераза 18, 397

Магний в молекулах флавопротеидов 458
— содержание в митохондриях 542
Магния ион, изменение константы равновесия киназных реакций 387, 388
— — как активатор ферментов 75, 77, 272, 370—373, 381, 387, 388
— — сродство к АДФ и АТФ 385—388
Максимальная скорость в теории Михаэлиса 63
— — ферментативной реакции, влияние неконкурентных ингибиторов 281—293, 297
— — — — выражение 81, 87, 90, 92, 118, 289, 389, 390
— — — — графическое определение 64—68

Малатдегидрогеназа 242, 372, 396, 469, 496, 498, 514, 539, 540, 548, 560, 567
Малатсинтетаза 498
Малеилацетоацетат, образование 485, 504; см. также 1.99.2.5
Малеилацетоацетат-изомераза 329, 505
Малеилпируват, образование см. 1.99.2.4
Малеилпируват-изомераза 329
Малеиновая кислота, реакция с SH-группами 304
Малонат как ингибитор фермента 281, 312
— образование см. 1.2.1.a и 3.5.2.1
Малонил-КоА, образование 483, 499; см. также 6.4.1.2
Мальтоза, мутаротация 230; см. также 5.1.3.3
— окисление см. 1.1.3.5
β-Мальтоза, образование 170
Мальтозофосфорилаза 186, 255, 258, 259
Маннановые камеди см. 3.2.1.25
Маннитол-1-фосфат-дегидрогеназа, торможение 301
D-маноза, окисление см. 1.1.3.5
— фосфорилирование см. 2.7.1.1 и 2.7.1.7
α-Маннозидаза 196, 550, 557
β-Маннозидаза 196
Маннозофосфат-изомераза 264
Маннозо-1-фосфат, превращение в ГДФ-маннозу см. 2.7.7.13
Маннозо-6-фосфат, изомеризация см. 5.3.1.8
Манометрические методы 27
— — лимитирующее действие диффузии газа 55
Марганец, содержание в митохондриях 542
Марганца ион как активатор фермента 272, 371—373, 375, 381
Матрицы и гены 570
— механизм действия 422, 424, 425, 428—434
— полинуклеотидные 393, 394, 422—426
Мевалонаткиназа 511
— образование 487, 511; см. также 1.1.1.32, 1.1.1.33 и 1.1.1.34
Медь в геме *a* 279, 345
Меди ион как активатор фермента 371, 372, 375
— — — ингибитор фермента 48, 306, 372
Медьсодержащие ферменты 279, 298, 299, 345, 375
— — роль металла 375
— — торможение 298, 299
— флавопротеиды 357, 358, 360
Международная комиссия по ферментам, рекомендации 22, 24, 33, 148—161, 319, 331, 333, 338, 541
Международный биохимический союз 22, 148, 319
Международный союз чистой и прикладной химии 319
Мезогем-группы в цитохроме С 338
Меланин, образование 573
Меланотропин, взаимозамещения аминокислот 566
Мембрана клеточная 534, 535, 577
— лизосом 545
— микросом 545
— митохондрий 474, 476, 534, 540, 542, 544, 545
— протопласта 535, 543, 544
— ядерная 534, 535
Менадион как переносчик водорода 333
— структура 331
Менадионредуктаза 311, 333, 358, 396
Менделирующие признаки 570
Меркаптиды 304
3-Меркаптопируват, образование см. 2.6.1.3
Металлы, внутриклеточная локализация 542
— загрязнение препаратов ферментов 404
— как активаторы 272, 370—388
— катализ окисления 328, 329
— комплексообразующие агенты как ингибиторы 306
— — — — реактиваторы 306
— связывание белками 404
— способ соединения с ферментом 272—274, 375, 376
— тяжелые в очистке ферментов 48
— — как ингибиторы ферментов 306
— удаление из препаратов ферментов 275, 299
Металл — ингибитор (комплекс) 376, 377
Металл — продукт (комплекс) 376
Металл — субстрат (комплекс) 272, 376, 379—383, 385, 386
Метенил-ГТФ 353
1-Метил-L-гистидин, образование см. 3.4.3.4
Метилглиоксаль, превращение в молочную кислоту 366, 367, 485, 505; см. также 3.1.2.6 и 4.4.1.5
Метилглутаконил-КоА, образование см. 6.4.1.4
Метиленовый синий, восстановление 27, 28, 74, 75, 323, 360
— — как акцептор водорода см. 1.1.99.a, 1.2.99.1 и 1.6.99.1
— — — ингибитор фермента 314
— — применение в спектрофотометрическом методе 25
— — структура 314
Метилкобаламин 356
Метилкротонил-КоА — карбоксилаза 270, 365
Метилмалонил-КоА — мутаза 265
Метилмалонил-КоА — рацемаза 263
Метилмалоновой кислоты полуальдегид, образование см. 1.1.1.31
5-Метил-ТГФ 354, 356
Метилтрансферазы 164, 355, 473, 486, 507
Метилцистеин, образование см. 2.1.1.c
Метильная группа активная 166
— — перенос тетрагидрофолатом 352, 353
Метионил-*s*-РНК — синтетаза 271
Метионин как донор метильных групп 164, 166, 355, 486, 506
— — репрессор 442
— обмен 486, 506
— образование из гомоцистеина 356; см. также 2.1.1.e, 2.1.1.3 и 2.1.1.5
— реакция с иодацетатом 304
Метионин-аденозилтрансфераза 355, 372, 506
Методика изучения ферментов 15—30
Методы изучения механизма действия ферментов 239, 279
— — ферментативных реакций 17, 24—30
— очистки ферментов 31—50

Методы, связанные с восстановлением меди 30
— фракционирования 37—50
Механизм активации ионами металлов 375—377, 384—386
— действия лиаз 261, 262
— — металлоферментов 271—279
— — ферментов 235—279
— реакций переноса водорода 236—250
— — *ферментативного переноса* 250—261
— с образованием тройных комплексов 269—271, 276
Механическая работа, энергия 530, 533
Механическое перемешивание 19
Меченые группы в активном центре 310
Микросомы, мембрана 545
— образование 534
— размер 537
— растительных клеток 543
— структура 545
— ферменты 538, 539, 542
— цитохромы 341, 342
«10-минутный фосфор» 20
Миоглобин 399, 402
Миозин 171
Мио-инозитолизомераза 396
Миофибриллы 534
Митохондрии дрожжей 543
— извлечение 36, 474, 475, 536
— как источник ферментов 36, 37, 474, 475
— — частицы, продуцирующие энергию 541
— коферменты 474, 541, 544
— мембрана 474, 476, 534, 540, 542, 544, 545
— набухание 531
— окислительное фосфорилирование 531
— организованная ферментная система 31, 474—476, 540, 541
— освобождение ферментов 474, 544
— размер 534, 537
— разрушение структуры 474, 475, 540, 545
— растительных клеток 543
— структура 474—476, 534, 537, 541
— участки, связывающие цитохром 474
— ферменты 467, 474—477, 540, 541
— — экстракция 37
— цитохромы 341, 541, 543
Михаэлиса константа 381, 382, 383, 385
— — влияние ингибиторов 282—293
— — влияние pH 121—130, 363, 409
— — — температуры 130
— — графическое определение 64—68, 291
— — для индукторов 438
— — — металла-активатора 377—379, 383, 384
— — кажущаяся 78, 281, 284, 379, 382
— — определение 24, 64, 87, 121
— pH-функции 108
— теория 62—64
— — для ингибиторов 283
— уравнение 62—64
— — интегрированное 105, 106
Множественный контакт фермента и субстрата 234
Молекулярный вес ферментов 395—399, 455, 458, 462
Молибдат, использование в полярометрических методах 29
Молибден в молекулах флавопротеидов 274, 358
— недостаточность, влияние на содержание ферментов 419
Молочная кислота, образование из метилглиоксаля 485, 506
Молярная поверхностная концентрация 86
Моноаминоксидаза 106, 232, 300, 552, 558
Монокарбоновые кислоты, специфичность фумаратгидратазы 227
Монофенолы, окисление см. 1.10.3.1
Монофосфаты как коферменты фосфомутаз 366
Морфин как ингибитор фермента 313, 314
Мочевина, образование в печени 487, 488, 513—515, 557, 561
— разрыв водородных связей 399, 409, 462
цис-цис-Мукопат, образование см. 1.99.2.2
Мукопептиды, гидролиз см. 3.2.1.17
Мукополисахариды, гидролиз см. 3.2.1.17 3.2.1.18 и 3.2.1.19
Мурамидаза 396, 400
— видовые и тканевые различия 565
— лизис клеток *Micrococcus lysodeikticus* 37, 170
Мускарин как ингибитор фермента 313, 314
Мутагенные вещества 430
Мутантный гемоглобин 431, 571
Мутанты конститутивные 447, 448
Мутации как средство изучения метаболизма 572
— обратные 570
Мышечное сокращение 171, 349, 533
Мышечный экстракт, компоненты 51
Мышьяк как ингибитор фермента 304

Набухание микросом 545
— митохондрий 531
НАД 319
— *аналоги* 245, 325, 326, 561, 564, 567
— внутриклеточное распределение 342, 541
— восстановление водородом в присутствии Pt 321
— — гидросульфитом 241, 320—322, 324
защитное действие по отношению к ферментам 414
— α- и β-изомеры 320, 325
— и НАДФ, аналоги 324, 325
— — — биосинтез 488, 517
— — — восстановление, спектрофотометрический *метод определения* 25—27
— — — понизация 319
— — — как переносчики водорода 322—324, 343, 469—472
— — — распространение 324, 325
— — — способ восстановления 240—243, 321—325
— — — стабильность при сдвиге pH 324
— — — структура 319, 320
— как субстрат 394
— образование из НАДФ 26, 319, 323, 517
— *связывание с* НАДФ 471, 472
— синтез 517
— соединение с ферментом, спектр поглощения 404
— соединения 326
— спектр поглощения 320

НАД стереоспецифичность восстановления 182, 183, 241—243, 322
— фосфорилированная форма 324, 532
— число молекул, связываемых ферментами 274, 404—407
НАД-киназа 517
НАД-нуклеозидаза 517
НАД-синтетаза 517
НАД(Ф)-нуклеозидаза 249, 256, 320, 322, 323, 325, 539
НАД(Ф)-трансгидрогеназа 242, 472, 552, 558
НАД·H_2, окисление в митохондриях 333, 476
— определение сродства к ферментам 95, 96
— производные как ингибиторы 324
— спектр поглощения 320
— и НАДФ·H_2 окисление 162, 323, 324, 330, 333, 342, 493, 495, 541
— — — флуоресценция 27
— — — формы А и Б 241, 242
НАД·H_2-цитохром-b_5-редуктаза 242, 245, 324, 342, 358, 542
НАД·H_2-цитохром-*c*-редуктаза 275, 358, 397, 469, 495, 539
— внутриклеточная локализация 542
— кинетика действия 99, 410
— молекулярный вес 397
— реакции 242, 342, 358, 397, 469, 494
НАДФ 319
— гидролиз 320, 488, 516, 517; см. также 3.1.3.1, 3.2.2.6, 3.6.1.9
НАДФ·H_2-диафораза 358
Накопление энергии 533
Насыщение сульфатом аммония, номограмма 42
— фермента субстратом 63
Натрий, содержание в митохондриях 542
Натрия ион как активатор фермента 371, 372
— — — ингибитор фермента 371, 372
α-Нафтилпропионат как конкурентный ингибитор 405
Начальная скорость реакции, определение 16, 17, 55, 57, 100, 101
Неконкурентное торможение с полным эффектом 288
Неорганическая пирофосфатаза 75, 77, 257, 370, 372, 396, 529
Неохимотрипсиноген, образование 463
— структура 462, 463
Непрерывного титрования метод 28
Никель как активатор фермента 371—374
Никотин как ингибитор фермента 313, 314
Никотинамид 319, 367
Никотинамида иодметилат 320, 325
Никотинамидгипоксантиндинуклеотид 325
Никотинамидмононуклеотид, оптические свойства 320; см. также НМН
Никотинамид-фосфорибозилтрансфераза 516, 517
Нисcля тельца 534
Нити веретена, препараты 545
Нитрат, влияние на характер кривой pH α-амилазы 389
— восстановление 163, 275, 277
Нитратредуктаза 388
Нитрофенол, производные как субстраты 26, 58, 261, 389
НМН, образование 488, 517; см. также 2.4.2.12 и 2.7.1.22
— превращение в НАД 488, 517; см. также 2.7.7.1
НМН-аденилилтрансфераза 517, 538, 562
Номенклатура ферментов 10, 148, 154—161
— хинонов 331
— цитохромов 333
Нуклеиновые кислоты, ассоциация полинуклеотидных цепей 421
— — влияние на спектрофотометрическое определение белков 34
— — локализация в клетках 536, 544, 545
— — образование 393, 422—426; см. также 2.7.7.b, 2.7.7.c и 2.7.7.d
— — применение для осаждения ферментов 49
— — роль в биосинтезе белков и ферментов 421—452
Нуклеозидаза 517
Нуклеозиддифосфаткиназа 349, 350, 497, 506, 508, 516, 524, 529
Нуклеозиддифосфаты как переносчики фосфата 347, 349, 350
— синтез РНК 431
— структура 348
Нуклеозидмонофосфаткиназа 516, 524
Нуклеозидтрифосфаты, содержание в тканях 533
— гидролиз АТФ-азой 374
— синтез нуклеиновых кислот 393, 394, 422—426
Нуклеозиды, образование см. 2.4.2.1, 2.4.2.2, 2.4.2.3, 2.4.2.4
— расщепление 170
Нуклеопротеиды, удаление из экстракта 39
5-Нуклеотидаза 372, 517, 539, 550
Нуклеотидазы, колориметрический метод определения 30
Нуклеотидная последовательность 427
Нуклеотидные матрицы, механизм действия 424, 425
Нуклеотид-пирофосфатаза 133, 177, 320, 517
Нуклеотиды, биосинтез 488, 489, 516, 517, 520—524; см. также 2.4.2.5—12
— расщепление 170; см. также 3.1.4.1
— структуры в коферментах 369, 370
Нумерация ферментов, ключ к системе 150—153

Обмен между митохондрией и средой 542
«Один ген — один фермент» (гипотеза) 420, 569
Одноуглеродные группы, переносчики 352, 353
Окисление — восстановление, перенос электронов 237—240, 244, 245
Окислительно-восстановительный потенциал 28, 238, 333
Окислительное фосфорилирование 31, 324, 333, 474, 475, 476, 542, 544, 545
— — внутриядерное 543
— — механизм 531—533
Окись углерода как ингибитор фермента 299, 342, 344—346
Оксалатоксидаза 357
Оксалил-КоА, образование см. 1.2.1.e

Оксалоацетат, декарбоксилирование см. 1.1.1.38, 1.1.1.40 и 4.1.1.3.
— образование см. 1.1.1.37, 1.1.3.3, 1.4.3.1 и 2.6.1.1
Оксалоацетатдекарбоксилаза 372, 373
Оксалосукцинат, декарбоксилирование 481, 495; см. также 1.1.1.42
Оксиацилглутатион-гидролаза 367
Оксибутиратдегидрогеназа 538, 540, 548
Оксигеназы 163, 164
— определение 157
Оксиглутаратдегидрогеназа 328, 365, 471, 498
Оксидазы 162, 163, 359
— *манометрический метод* 27
— определение 157
— D-аминокислот 232, 357, 393, 397, 399, 403, 414, 419, 549, 558
— L-аминокислот 75, 76, 133, 162, 232, 233, 246, 357, 397, 558
— N-метиламинокислот 357
Оксидоредуктазы 157, 158
— реакции 161—163
3-оксиизобутирил-КоА, гидролиз см. 3.1.2.4
Оксиметилглутарил-КоА 352, 487, 510, 511; см. также 4.1.3.5 и 1.1.1.34
Оксиметилглутарил-КоА — редуктаза 511
Оксиметильная группа, перенос тетрагидрофолатом 352
Оксимы как реактивирующие агенты 311
Оксипируват, восстановление см. 1.1.1.26
— декарбоксилирование см. 2.2.1.1
— образование см. 1.1.1.29
3-Оксипропионатдегидрогеназа 548
β-Оксистероид-дегидрогеназа 241, 242
n-Оксифенилпируват-гидроксилаза 504
Оксифенилсерин, декарбоксилирование см. 4.1.1.26
8-Оксихинолин как хелатообразующий агент 274—276
α-Оксиэтилтиаминпирофосфат 364
2-Оксоглутарат как кофермент 347, 470
— образование см. 1.1.1.41, 1.1.1.42, 1.1.99.2, 1.4.1.2 и 1.4.1.4
— реакции см. подгруппу 2.6.1
2-Оксоизовалерат, образование см. 4.1.2.9
Олиго-1,6-глюкозидаза 410
Операторы в оперонах 446
Опероны 445—447, 449
Оптимальная длина цепи в молекуле субстрата 192—194, 231
Оптимум концентрации субстрата 73, 74
— pH, влияние ионов 389
— — *для ферментативных реакций* 109, 110, 115—121, 389, 390
— — изменение с температурой 140
Оптическая инверсия при ферментативных реакциях 166, 170, 185, 186, 255, 257—259, 485, 506
Оптические изомеры, конкурентное торможение 177, 221, 227
— — специфичность 179—197, 221—224, 226—230, 320, 327
Оптическое вращение, изменение 29
Опухоли, энзимология 454, 561—563
Организаторы 547, 562
Организация на основе специфичности 175, 467
Организация ферментов во внутриклеточных частицах 476
Органические растворители, инактивация *ферментов* 19
— — разрушение клеток 37
— — фракционирование ферментов 19, 39, 40
Органоспецифические ферменты в клинической диагностике 557
Орнитин как катализатор в синтезе мочевины 488, 514
— образование см. 2.6.2.1, 3.5.1.d, 3.5.3.1
Орнитиндекарбоксилаза 301, 559
Орнитин-карбамоилтрансфераза 442, 514
Оротат, образование 489, 523; см. также 1.3.3.1
Оротат-фосфорибоилтрансфераза 523
Оротидин-5′-фосфат — декарбоксилаза 524
Осмотическая работа 530, 533, 542
Относительные величины, использование в кинетике ферментов 64, 69, 70, 73, 79, 80, 285, 287, 288

Пальмитиновая кислота, биосинтез 483
Паноза, гидролиз см. 3.2.1.10
Пантетеин, образование см. 4.1.1.30
Пантетеинкиназа 372
Пантетеин-4′-фосфат 489, 519
Пантетеинфосфат-аденилилтрансфераза 519
Пантоат, превращение в пантотенат 488, 518; см. также 6.3.2.1
Пантотенат, образование 488, 518
Пантотенаткиназа 518
Пантотенатсинтетаза 518
Папаин, антифермент 317
— кинетика действия 107
— неактивное ртутное производное 412
— специфичность 198—217, 223
— структура 396, 400, 401, 402, 412, 413
Парапепсин см. Пепсин B
Пенициллин как индуктор фермента 437
Пенициллиназа 437
Пентозы 486, 508—510
Пепсин, действие на цитохром с 412
— ингибиторы 60, 456, 457
— кинетика действия 59, 132, 141
— образование из предшественников 455—457
— связывание ионов металлов 376
— специфичность 198—219
— структура 396, 400, 401, 410
— B см. 3.4.4.2
Пепсиноген, активация 455—457
Пепсиноген образующая система 561
Пептидазы, активация металлами, механизм 272, 273
— метод формольного титрования 30
— предшественники 455
— протеолитический коэффициент 22
— специфичность 170 171, 197—226, 273, 373, 374
— эндо- и экзоформы 170, 171
Пептидные связи, гидролиз см. подгруппу 3.4
— — свободная энергия гидролиза 575, 576
— цепи 428, 429, 435, 577
— — число в молекуле 399, 456, 458, 462, 464, 564
Пептиды, синтез 435

Пептиды синтетические, специфичность пептидаз 197—226
Первичная структура 402, 434
Переваривание ферментов 412
Перекись водорода, образование 246, 360, 503
— — — при восстановлении O_2 246, 359, 360
— — окисление 277, 341, 361
Перенос водорода 237—246, 319—346, 359, 370, 468—472
— — механизм 336—250
— как реакция замещения 257
— электронов 237
Пероксидаза 163, 184, 300, 346, 393, 396, 401, 553, 567
— кинетика действия 71, 72, 96, 277—279
— комплекс с H_2O_2 278
— образование в митохондриях 532
Пероксидаза — перекись водорода (комплекс) 96—99, 277—279
— специфичность 277
Пилокарпин 315
Пиоцианин как акцептор водорода см. 1.1.99.2, 1.1.99.3
Пипеколиновая кислота, образование см. 1.5.1.1
Пиридин, производные, окисление 179; см. также 1.2.3.1
Пиридин-3-сульфоновая кислота 368, 369
Пиридинферрогемохром 403
Пиридоксаль 361
— чувствительность к цианидам 299
Пиридоксальфосфат 172, 259, 347, 361—363, 394
— механизм действия 261, 361—363
— образование см. 1,4.3.5 и 2.7.1.35
— определение 403, 404
— спектр поглощения 362, 363
— структура 461, 462
Пиридоксальфосфат-оксидаза 357
Пиридоксин 361, 441
— окисление см. 1.4.3.5
— фосфорилирование см. 2.7.1.35
Пиридины, биосинтез 489, 523
Пиридоны 322
Пирофосфат как ингибитор фермента 312
— образование см. 2.4.2.7, 2.5.1.1, 2.5.1.a, 3.6.1.8, погруппу 2.7.7 и группу 6
— — комплекса с металлом 306
Пирофосфатаза(ы), классификация 171
— неорганическая 75, 77, 257, 370, 372, 396, 529
Пирофосфатные связи, гидролиз кислотами 30
— — образование 531
Пирофосфомевалонат-декарбоксилаза 511
Пирофосфорилаза 166, 168
Пирролин-2-карбоксилат, восстановление см. 1.5.1.1
Пирролин-2-карбоксилат-редуктаза 552
Пирролин-5-карбоксилат-редуктаза 442
Пируватдегидрогеназа 172, 357, 364, 398, 471, 480, 493
Пируватдекарбоксилаза 172, 372, 373, 398, 480, 493
Пируват как кофермент 471
Пируваткиназа 187, 256, 260, 371, 397, 421, 492
Пируватоксидаза 357
Пируватоксидазная система 305, 364
Плазмалоген см. 3.1.1.4
Плазмин 307
Пластинчатый альбумин, образование см. 3.4.4.16
Поджелудочная железа, активация ферментов 464, 465
Поливалентная репрессия 452
Полиметафосфатаза 396
Полинуклеотидные матрицы 393, 421—434
Полинуклеотиды синтетические как матрицы 431, 432
Поли-3-оксимасляная кислота, гранулы в клетках 534
Полисахариды, синтез 165, 186, 480, 507
Полифенолы, восстановление цитохромов 342
Полифосфат 167
Положительный галоидный атом 303
Полосы поглощения гемопротеидов 403; см. также Полосы поглощения цитохромов
— — флавопротеидов 403
— — цитохромов 334—339
Полуальдегид янтарной кислоты, образование см. 1.1.1.h и 2.6.1.c
Поляризация как причина активации субстрата 235
Поляриметрические методы 29, 30
Полярографические методы 29
Порфирины цитохромов 338, 403
Последовательная индукция 576; см. также Серийная индукция
Последовательность аминокислот в белках 421, 426, 429, 434, 435, 447
— — — — видовые различия 564—566, 571
— — — ферментах 400, 415, 447, 459, 463, 566
— нуклеотидов в полинуклеотидной цепи 393, 422, 424—426
— — кодирование 432, 433
Последовательные реакции биосинтеза 445, 446
— ферментативные реакции, влияние температуры 141, 142
Правила построения номенклатуры ферментов 154—161
Предшественники ферментов 454—465
Продукт, комплекс с металлом 376
L-пролин, образование см. 1.5.1.1 и 1.5.1.2
— как репрессор 442
Промежуточные продукты, время жизни 479, 530
Пропионат, образование см. 2.7.2.1
Пропионил-КоА — карбоксилаза 265, 269, 398, 399
Пропионил-КоА, образование см. 2.1.3.1, 6.2.1.1
Пропеннин, активация 457
Простетические группы, биосинтез 419
— — как переносчики 356—366
— — молекулярный вес 404
— — отличие от коферментов и субстратов 393, 394
— — соединение с субстратами 261
— — стабилизация белка 134, 398
— — число в молекуле 334—337, 358, 403, 404
Простигмин 314

Прокарбоксипептидазы, активация 464
Протамин как осадитель нуклеиновых кислот 49
Протеолитические ферменты, активация *предшественников* 464
— — внутриклеточная локализация 541
— — предшественники 455—465
Протеолитический коэффициент 22, 197
Протеолитическое частное 22
Протогем в молекуле цитохрома B 338
Протоген см. Липоевая кислота
Протопласт 535, 544
Проэстераза 465
Псевдоуридин в молекуле *s*-РНК 427
Птерины, окисление см. 1.2.3.2
Пуриннуклеозидфосфорилаза 539
Пурины, биосинтез 489, 520, 521
— окисление см. 1.2.3.2
Пуромицин как ингибитор синтеза белков 429
Путресцин, образование см. 4,1.1.17
pH, влияние на активацию предшественников ферментов 455, 456, 458
— — — — ферментов ионами металлов 375, 390, 391
— — — денатурацию белков 133
— — — константу Михаэлиса 121—130, 409, 411
— — — неконкурентное торможение 297, 310
— — — скорость ферментативных реакции 106—130, 411
— — — сродство фермент — ингибитор 122—124, 297, 298
— — — — фермент — субстрат 106—108, 123—130, 407
— — — стабильность коферментов 324
— — — — ферментов 106, 133
— — — *цитохром с* 340
— изменение в ходе ферментативных реакций 28
— *контроль* 19, 38, 41, 43
pH-кривые, влияние торможения или активации 297, 289
— *изменение в зависимости от температуры* 140, 147
— интерпретация 107—109, 116—120, 128—130
— оптимум для действия ферментов 109, 110, 115—121, 389, 390
— — изменение в зависимости от температуры 140
— фракционирование при изменении 39
pH-статы 28
pH-функции 114
— использование 114—130
— логарифмическое уравнение 111, 112, 119—121, 124, 125, 127, 130
— Михаэлиса 108
p*K*, действие температуры 140, 147
— значение величины в ферментах 310, 409
— определение 110, 111, 119, 120, 124, 125, 129, 147
PZ (Пурпурогаллиновое число) 21

Равновесия константа, влияние ионов металлов 376, 386—388
Размеры субклеточных частиц 535
Разобщающие агенты 311, 532
Разрушение внутриклеточных частиц 474, 475, 540, 545
— клеток 536
Рамнулокиназа 191
Растворимость белков в растворах солей 42
— как тест на гомогенность ферментов 51—53
— ферментов 564
— — митохондрий 37, 474, 475
Рацемазы 173, 181; см. также подгруппу 5.1
Рацемические смеси, разделение 179, 181
Реактивация ферментов 281, 304, 307—311
Реакции замещения 257, 258
— переноса с участием двух субстратов 68—72
Регистрирующие приборы 18, 25, 28
Редуктазы 157, 357
Резонанс, стабилизация 276
Ренин 219, 396
— аминокислотный состав 401
Репрессибельные ферменты 441
Репрессия 442—445, 467, 478
— в системе биосинтеза с многими путями 451, 452
— кинетика 437, 443
— координированная 444, 446, 449
— некоординированная 446, 449
— нуклеотидами 442
— образования ферментов 420, 436—445, 560, 562
— *поливалентная* 452
— последовательная 445
— специфичность 437, 441—445
Репрессор цитоплазматический 447, 448
Репрессорная РНК 448—451
Ретикуло-эндотелиальные клетки, *разделение* 558
Рецептор, отличие от активного центра 438, 441
Рецессивный признак 570
Рибитол, образование см. 3.5.99.1
— фосфорилирование см. 2.7.1.16
Рибозиламинглицид-5′-фосфат, образование 520; см. также 6.3.1.3
Рибозиламин-5-фосфат 520
D-рибозо-5-пирофосфат, гидролиз см. 3.6.1.6
— изомеризация см. 5.3.1.6
Рибозофосфат-изомераза 502, 508, 527
D-рибозо-1-фосфат, образование см. 2.4.2.1, 2.4.2.2 и 2.4.2.3
Рибозо-5-фосфат как катализатор в окислении глюкозофосфата 483, 484, 500, 502
D-рибозо-5-фосфат, образование см. 2.2.1.1, 2.7.1.15, 3.2.2.4, 4.1.2.3 и 5.3.1.6
— фосфорилирование см. 2.7.1.18
Рибозофосфат-пирофосфокиназа 516, 520
D-рибозо-5-фосфат, изомеризация см. 5.3.1.6
Рибокиназа 508, 516, 520
Рибонуклеаза, антифермент 317
— видовые различия 566
— как реагент на РНК 536
— образование 419
— распространение 538, 540, 554, 557, 562
— реакции 168, 169
— структура 396, 398, 400—402, 412, 567
— торможение 413

Рибонуклеаза ферментативная активность фрагментов 412
— *Aspergillus oryzae* 396
Рибонуклеиновая кислота и синтез ферментов 421, 425—434, 446—451
— — информационная 421, 425, 426
— — — как матрица 421, 428
— — — образование 425, 426, 446, 447, 449
— — конфигурация 422
— — локализация в клетках 536, 544, 545
— — растворимая, соединение с аминокислотами 271, 421, 426, 427
— — — специфичность 427
— — — структура 422, 426, 427
— — — функции 426—430, 450
Рибосомы, образование белков 421, 428—430
— размер 537
— структура 428, 534, 545
Рибофлавин, действие недостатка на флавопротеидные ферменты 419
— образование хелатных комплексов с металлами 274
— фосфорилирование см. 2.7.1.26 и 2.7.1.42
Рибофлавинкиназа 372
D-рибулоза, образование см. 1.1.1.с и 5.3.1.3
L-рибулоза, образование см. 5.3.1.4
Рибулозодифосфат-карбоксилаза 524
D-рибулозофосфат, изомеризация 486, 490, 500, 502, 508, 527
L-рибулозофосфат, образование 486, 509; см. также 2.7.1.16
Рибулозо-5-фосфат, образование 484, 486, 490, 500, 508, 509, 524, 527
D-рибулозо-5-фосфат, фосфорилирование 527; см. также 2.7.1.19
Рибулозофосфат-3-эпимераза 484, 500, 508, 527
Рибулозофосфат-4-эпимераза 409
Рибулокиназа 191, 509
РНК-нуклеотидилтрансфераза 425
Ртути ион как активатор фермента 370
— — как ингибитор фермента 370, 372
Ртуть, органические соединения как ингибиторы ферментов 304
Рубидия ион как активатор фермента 371, 372

Самопереваривание пепсина, влияние на активность 411
Саркозин, образование см. 3.5.3.3
Саркосомы 545
Сахара как индукторы ферментов 439, 440
— — конкурентные ингибиторы 316
— мутаротация 230
— фосфорилирование 167, 187—191
— эпимеризация 181
Сахароза, биосинтез 350, 490, 524—529
— гидролиз 71, 72, 251, 252
— среда для выделения митохондрий 474, 536
Сахарозо-глюкозилтрансфераза 187, 253, 254, 258
Сахарозофосфат, синтез 350
Свертывание крови, ферменты 465
Свет, восстановление гемоцианидов 299
— — ферредоксина 490
Свет, обратимость подавления окисью углерода 299, 344—346
— циркулярно поляризованный; действие на фотохимические реакции 574
Свинца ион как ингибитор фермента 306
Свободная энергия активации образования и распада комплекса ES 139
— — — процесса денатурации 132
— — гидролиза 164, 531, 575
— — соединения фермента с субстратом 139
Свободные радикалы 276, 278, 279
Связь С—О, вовлечение в реакцию, идентификация 251—253
Седогептулозо-1,7-дифосфат 526
Седогептулозо-7-фосфат 484, 490, 501, 526
Секреторные гранулы 534
Секреция, энергия 349, 530, 533
Селенат как активатор фермента 275, 390
Семихиноны 246, 275, 276, 359
Сера, гранулы в клетках 534
Серебра ион как активатор фермента 370
— — — ингибитор фермента 306, 370, 406
Серийная индукция 444, 466
Серин в активных центрах 415, 417
— как переносчик фосфата 415
L-сериндегидратаза 301, 362, 507
Серин, образование см. 4.2.1.20, 4.2.1.21, 4.2.1.22 и 4.2.1.23
Сероводород как ингибитор фермента 298, 344
Серотонин, ацетилирование см. 2.3.1.5
Серповидноклеточная анемия 571
Сетчатка глаза, локализация ферментов 558
Сефадекс, концентрирование растворов ферментов 50
— обессоливание растворов 48
— разделение ферментов 46
Силикат как активатор фермента 275
Силикомолибдат как активатор фермента 275
Симметрические двухосновные кислоты, ионизация 108
— молекулы, стереоспецифичность 181, 182
Синтаза 173
— отличие от синтетаз 159
Синтез несимметрический 180, 574, 575
— нуклеиновых кислот 393, 394
Синтетазные реакции, механизм 174, 265—271
Синтетазы 3 9, 533
— определение 30, 149
Система(ы) глиоксалазы 329, 366, 367, 485, 505
— дегидрогеназ 242, 469—472
— окисления глюкозо-6-фосфата 499
— ферментов 12, 318, 466—529
— — гликолиза 419
— — локализация в частицах 541, 542
Сквален, биосинтез 487, 513
Сквален-циклогидроксилаза 513
Скорость реакции 477—478
— — влияние концентрации воды 72, 74
— — — — субстрата 62—106
— — — — фермента 55—62
— — — строения субстрата 176, 189, 221, 223
— — — температуры 139—144
— — — pH 107, 116—120, 409, 411
— — измерение 15—17, 24—30

Скорость реакции максимальная, влияние неконкурентных ингибиторов 63, 281—293, 279
— — — — структуры субстрата 176, 189, 223
— — — — температуры 139—144
— — — выражение 81, 87, 90, 92, 118, 289, 389—390
— — — графическое определение 64—68, 289—291
— — начальная 16, 17, 55
— — относительная, определение 64
— — при необратимом торможении 281, 296, 309, 310
— — уравнение 92
Слезотечение 280, 303, 304
Смещение электронов при активации молекулы субстрата 235, 243
Смолы ионообменные, разделение ферментов 46
Согласованная атака бифункциональными катализаторами 235
Согласованное замещение, механизм 243
Соединения с двумя асимметрическими центрами 181, 312
Соли, очистка ферментов 41, 42, 48
— удаление на колонках из сефадекса 48
— — — ультрафильтре 50
Сорбиновая кислота как субстрат 26
D-сорбоза, образование см. 1.1.1.15
— фосфорилирование см. 2.7.1.3
L-сорбоза как акцептор гликозила 187
— образование см. 1.1.1.14
Состав ферментов 400, 401
Спектр поглощения липоевой кислоты 328
— — НАД и НАД·H_2 320
— — — изменение при соединении с ферментом 404
— — пиридоксальфосфата 362, 363
— — производных тетрагидрофолата 352, 353
— — убихинона 332
— — флавиннуклеотидов 403
— фотохимический 344—346
Спектрофотометрические методы 24—27, 55, 332, 339, 340, 359, 362, 363
— — определения белков 34
Спермин, окисление см. 1.5.3.3
Специфичность индукторов ферментов 437—445
— конкурентных ингибиторов 311—316
— ферментов 175—234
— — видовые различия 191, 194, 457, 563—569
— — влияние ионов 178, 373, 374
— — изомеры 179—181, 221—223
— — по отношению к активирующим ионам 371, 373
— — природа 10—12, 175—234
— — степень 175—179
— — трудности изучения 176, 177
Спирт в рационе, влияние на содержание ферментов 420
— инактивирование ферментов 19
— окисление 277, 278; см. также подгруппу 1.1
— фосфорилирование см. подгруппу 2.7.1
— фракционирование ферментов 19, 39, 40
Спиртовое брожение 469, 481, 491, 492
Сравнительная биохимия ферментов 546—569
Сродство активатора к субстрату 380—388
— влияние структуры 176, 177, 189, 192
— фермента к активатору 377—384
— — — двум субстратам 81, 82
— — — ингибитору 123, 177, 281, 286, 294—298, 315
— — — индуктору 438—440
— — — металл-субстратному комплексу 380—384
— — — реагирующим веществам 23, 24
— — — субстрату 23, 64, 123, 124, 125, 177
— — — — определение 93, 101
Стабилизация ферментов солями 20
— — субстратами 39, 133, 134, 398, 409
Стабильность ферментов в клетках 418, 419
— — влияние pH 106, 133
Стационарное состояние, кинетика 87—100, 126, 127, 283, 288, 378
— — концентрация субстрата 478
Стеариновая кислота, окисление см. 1.11.1.3
— — синтез 483
Стереоспецифичность ферментов 179—183, 185—190, 196, 221, 227—229, 312, 316, 574
Стереохимия живого вещества 574
Стерические препятствия, создаваемые ингибиторами 414
Стероид-Δ-изомераза 264, 396
Стрихнин 314
Строение ферментов 396, 417
Структурные белки митохондрий 475, 476, 545
— гены 447
Субклеточные частицы 537, 543, 544
Субмитохондриальные частицы 534, 537, 544
Субстрат(ы), индукция 437—441
— ионизация 107, 116—130, 177, 178
— как активатор фермента 70, 79
— концентрация, влияние на скорость реакции 62—106
— — относительная, определение 64
— нерастворимые 85, 86
— — кинетика реакции 85, 86
— определение понятия 13
— соединение с ингибиторами 293
— — — простетическими группами 261
— стабилизация ферментов 39, 133, 134, 398, 409
— торможение избытком 72—77
Субстратная константа 24
Субстратсвязывающие участки, число в молекуле 404—406
Субтилопептидаза А 412, 416
Субъединицы в ферментах 398, 399, 569
Сукцинатдегидрогеназа 162, 312, 342, 343, 475, 496, 542
— распространение 538
— содержание железа 275, 357
— торможение 281, 299, 312
Сукцинатоксидазные системы 333, 342, 343, 475, 544
Сукцинилгидролипоат, образование 328, 496, 531; см. также 1.2.4.2
Сукцинил-КоА, изомеризация см. 5.4.99.2

Сукцинил-КоА, метаболизм 481, 495
— образование см. 6.2.1.4
Сукцинил-КоА — гидролаза 496
Сукцинил-КоА — синтетаза 269, 497
Сульфат «активный» 169
— аммония 19, 33, 41—43, 306
— восстановление 335
— как активатор фермента 275, 390
— превращение в аденилилсульфат см. 2.7.7.4 и 2.7.7.5
Сульфгидрильные группы см. Тиоловые группы
— — ионизация 129
Сульфид- и сульфотрансферазы 169; см. также подгруппу 2.8
Сульфинаты см. 2.8.1.2
Сульфит, соединение с НАД 326
Сульфосалициловая кислота как осадитель белков 34
Сульфоэфиры см. подгруппу 3.1.6
Сфингомиелин, гидролиз см. 3.1.4.1
— образование см. 2.7.8.a
Сывороточный альбумин, взаимодействия аминокислот 566
Сэнгера метод определения концевых групп 219, 399, 400, 456

Табун 310
D-тагатоза, образование см. 1.1.1.16
— фосфорилирование см. 2.7.1.3
D-тагатозо-6-фосфат, фосфорилирование см. 2.7.1.11
D-тагатуронат, изомеризация см. 5.3.1.12
Таннин, очистка ферментов 49
Таутомеризация 173, 362, 363
— катализа см. 5.3.2.1, 5.3.3.1, 5.3.3.2 и 5.3.3.3
ТГФ, участие в метаболических реакциях 353, 354
Тейхоевая кислота, синтез см. 6.1.1.8
Теллурат как активатор фермента 275
Температура, влияние на константу Михаэлиса 139
— — — ферментативные реакции 130—147
— изменение pK 147
Температурный коэффициент денатурации 39, 131—133
— — ферментативных реакций 140, 141
— оптимум ферментативных реакций 131, 132
Теорелла — Чанса механизм 247
Тепловая денатурация обратимая 133
— инактивация ферментов 132—134
— — фракционирование ферментов 39
Теплота активации 136
— — процесса денатурации 132, 133
— денатурации 133
— ионизации групп в белках 129
— — компонентов ферментных систем 140, 147
Термодинамические параметры инактивации ферментов 133
— — ферментативных реакций 134—147
Термостабильность ферментов 132, 398
Тестостерон окисление см. 1.1.1.j, 1.1.1.k и 1.1.1.51
Тестостерон-17-β-дегидрогеназа 105
Тесты на активность ферментов 25—30, 32, 33, 55
Тесты на чистоту ферментов 50—53
Тетрагидрофолат 352—354, 367, 473
— производные, строение 353
Тетраэтилпирофосфат как ингибитор фермента 310
Тиазол, образование из тиамина см. 2.5.1.2
Тиамин, неферментативное восстановление 245
— образование см. 2.5.1.a
Тиаминпирофосфат, действие 164, 172, 328, 364, 481, 493, 496
— образование см. 2.7.6.2
— определение 403
— структура и свойства 364, 367
Тизелиуса аппарат для электрофореза 49
Тимин, образование см. 2.4.2.4
— окисление см. 1.2.99.1
Тиоацетат, образование см. 2.8.1.1 и 2.8.1.2
Тиогалактозиды, ацетилирование см. 2.3.1.b
— как индукторы 437
Тиогликолат, реакция с иодацетатом 302
Тиоктовая кислота 327
α-Тиолактат, реакция с иодацетатом 302
Тиоловые группы в ферментах 247, 329, 407, 413, 564
— — — — соединения с коферментами 247, 407
— — реагенты 302—306, 407, 413, 414
— соединения, активация протеиназ 62
— эфиры 351, 531
— — гидролиз см. подгруппу 3.1.2
Тиосульфат-сульфидтрансфераза 302, 396, 538, 540
Тиоцианат как ингибитор ферментов 147, 275
— образование см. 2.8.1.1 и 2.8.1.2
Тиоэфирные связи в молекуле цитохрома c 339
— — значение в обмене ацильных групп 164, 169, 351, 483
— — энергия 532, 533
Тирамин, образование см. 4.1.1.25
Тирозин-аминотрансфераза 504
Тирозин как репрессор 442
— обмен 485, 504
— образование из фенилаланина см. 1.99.1.2
Тирозиндекарбоксилаза 301, 361, 441, 559
Тирозиноз 572
Ткани, гомогенизация 558
— механическое разрушение 36, 474, 536, 537
— различия в содержании ферментов 36, 546—559, 566
Торможение антителами 317
— бесконкурентное 282
— избытком активатора 373, 383
— — субстрата 72—77
— — фермента 53, 56
— конкурентное, взаимодействие субстратов 74, 75, 259, 260
— — действия одних индукторов другими 438
— — ионами металлов 371
— — с частичным эффектом 288
— неконкурентное 287
— необратимое, влияние pH 297, 310
— полный эффект 283, 285

Торможение по принципу обратной связи 452—454
— частичный эффект 285
ТПН см. НАДФ
Трансальдолаза 164, 185, 186, 261, 484, 501
Трансгликозилазы, хроматографические методы определения 30
Транскетолаза 164, 185, 261, 365, 397, 484, 500, 501, 526, 527
Трансляция 421
Транспептидирование 226
Трансрибозилазы 166
Трансферазы 158, 159, 250—261
Трансфосфорилирование 167, 168, 347
транс-Циннамат, образование см. 4.3.1.a
Трегалозофосфат, синтез 350; см. также 2.4.1.15
D-трегало-2,4-дифосфат как ингибитор 313
Треонин как репрессор 451
Треонинальдолаза 180
Треониндегидратаза 362, 419
Треонин-синтаза 363
Трехстадийный перенос, механизм 266—268
Триметафосфатаза 372
Триозофосфат-изомераза 264, 470, 491, 502, 525
Трипсин 396, 400, 406, 410, 416
— *активация предшественников ферментов* 458—461, 464, 465
— инактивация и денатурация 132, 133
— ингибиторы 59, 464, 465
— кинетика действия 59, 102, 133, 141, 147
— образование из предшественников 458, 459
— специфичность 198—217, 219
— торможение 307, 310, 406, 416
Трипсиноген, активация 458, 459, 465
Триптамин, образование см. 4.1.1.27
Триптофан как репрессор 442
— сериная индукция 445
Триптофандекарбоксилаза 559
Триптофанил-*s*-РНК — синтетаза 271
Триптофаноксигеназа 300, 419, 560, 561
Триптофан-синтаза 301, 442
Трифосфопиридиннуклеотид см. НАДФ
Трихлоруксусная кислота как осадитель белков 33, 34, 60
Тромбин 307, 416
Тропинэстераза 549, 570
Тунберга метод 27, 28
Турбидиметрические методы определения общего белка 34
Тушители флуоресценции 27
Тяжелые металлы как ингибиторы ферментов 306
— — очистка ферментов 48

Убихинон как переносчик водорода 331, 332, 342, 343, 475
— свойства 331, 332
— структура 331
— торможение окисления и восстановления 311
Углеводородная цепь, длина, влияние на специфичность 192—194, 229, 231, 233, 316
Углекислота как кофермент 470
Углекислота, образование 171, 172, 469—471, 483, 484, 487, 493, 495, 496, 499, 500, 504, 511, 524
— фиксация при фотосинтезе 490, 524
Углерод радиоактивный (C^{14}) 255, 265, 365
Удельная активность, единицы 20—23
— — максимальная как критерий чистоты 53
— — определение 23, 33
УДФ-АМ 435
УДФ-АМ-L-Ала-D-Глу 435
УДФ-АМ-L-Ала-D-Глу-L-Лиз 435
УДФ-АМ-L-Ала-D-Глу-L-Лиз-D-Ала-D-Ала 435
УДФ, гидролиз см. 3.6.1.6
— как переносчик 350, 506
УДФ-глюкоза, образование см. 2.7.7.9, 2.7.7.20, 2.7.7.11 и 2.7.7.12
УДФ-глюкозо-эпимераза 444, 506
УДФ-глюкуронат, образование см. 1.1.1.22
УДФ-производные 485, 506; см. также 2.7.7.12 и 5.1.3.2
— роль в метаболизме 485
Ультрафильтрация, концентрирование ферментов 50
Ультрафиолетовые лучи, влияние на синтез и распад 576
— — — — *частоту мутаций* 572
Ультрацентрифугирование как тест на гомогенность 50, 398
— методы определения K_s 405
— — — молекулярного веса 396
— — — числа субстратсвязывающих участков 405
УМФ как репрессор 442, 444
УМФ, образование 489, 524; см. также 2.4.2.9, 2.7.1.1 и 4.1.1.23
Уоринга гомогенизатор 36, 474
Уран как активатор фермента 275
Урат, образование см. 1.2.3.2
Уратоксидаза 300, 397, 538, 540, 557
Урацил, образование см. 1.3.1.1, 1.3.1.2, 3.2.2.3 и 3.5.4.1
Уреаза из различных источников 564
— кинетика действия 142, 143, 411
— манометрический метод определения 27
— *торможение* 317, 406
— структура 398, 406, 411
Уредосукциназа 442
Уретан как ингибитор дыхания 311, 342
Уридинди(три)фосфат 348
Уроканат, образование см. 4.3.1.3
Устойчивость к лекарственным веществам 478
УТФ в реакциях нуклеотидилтрансферазы 349
— гидролиз 374, см. 3.6.1.3
— превращение в ЦТФ см. 6.3.4.2
— содержание в тканях 533
— фосфорилирование см. 2.7.2.11, 2.7.2.30, 2.7.2.d и 2.7.2.40

Фагоциты 534
ФАД см. Флавинаденинди нуклеотид
— *гидролиз* см. 3.6.1.9
Фактор, заменяющий ацетат 327
— окисления пирувата см. Липоевая кислота

С-фактор в фосфорилировании 531
Факторы сопряжения 531
Феназины, окисление см. 1.1.99.2, 1.1.99.4 и 1.3.99.1
1,10-фенантролин, комплекс с металлами 302
Фенилаланин-4-гидроксилаза 442, 504
Фенилаланин, метаболизм 485, 504
Фенилаланиндекарбоксилаза 559
Фенилглиоксаль, превращение в миндальную кислоту 367
n-Фенилендиамин 343
β-Фенилпропионат 461
Фенил-β-тиогалактозид как ингибитор β-галактозидазы 316
Фенольные группы, ионизация 129
Фенотип 569
Фермент — антифермент (комплекс) 317
Фермент — ингибитор (комплекс), сродство 285, 289—291
— — — влияние pH 123—125, 297, 298
Фермент — индуктор (комплекс), сродство 438—440
Фермент — продукт (комплекс), лимитирование реакции распадом 93, 247
— — — термодинамические параметры распада 137—140
Фермент — субстрат (комплекс) 10, 96—98, 100, 180, 182, 226, 227, 231—233, 316, 408
— — — ионизация 107, 116—130, 297, 409
— — — сродство, влияние pH 123—127
— — — — — температуры 137
— — — — определение 93—101
— — — теория Михаэлиса 13, 62—64, 278, 279
— — — термодинамические параметры образования 137—139, 147
— — — — — распада 139, 140, 147
— — — участвующие группы 177, 181, 182, 231, 310, 375, 376, 408
Фермент — субстрат — ингибитор (комплекс) 282—287, 297, 375, 376, 378—392
Фермент — субстрат — кофермент (комплекс) 243
Ферментные системы 466—529
— — структурная организация 473—477
Ферменты, активирующие аминокислоты 426
— аминокислотная последовательность 421, 426
— влияние концентрации на скорость реакции 55—62, 473
— внутриклеточные 11
— две формы, влияние температуры на переход 142
— — — равновесие между ними 142, 143, 377, 398
— ионизация 107, 108, 116—130, 140, 147, 297, 310, 409
— как основа жизни 9, 530—533
— классификация 148—173
— концентрация абсолютная, определение 295, 296
— лизосом 540
— локализация внутриклеточная 535—546
— молекулярный вес 396—398
Ферменты, направляющая функция 175, 467, 479
— небелковой природы 12
— нерастворимые 473
— номенклатура 148, 149, 579
— — правила 154—161
— образование 418—465, 553
— — генный контроль 419—434, 445—449
— — контролирующая роль индукторов 420, 436—442, 448—451
— — — — репрессоров 420, 436, 441—444, 448—452
— определение аминокислот 172
— — понятия 12
— организованные и неорганизованные 10
— очистка 11, 31—53, 341
— — методы фракционирования 37—49
— переносящие азотистые группы 166
— — водород 162, 163
— — фосфатные группы 167
— происхождение 574—579
— — термина 10
— распределительная функция 472, 473
— распространение 547—562
— расщепление, влияние на активность 412
— с двойственной специфичностью 179
— система нумерации 149, 150
— содержание в различных тканях 548—556
— сроки хранения 375
— типы реакций 149, 236
— чистые, определение активности 23
Ферредоксин, восстановление см. 1.98.1.1
— действие 490
Феррицианид, восстановление, манометрический метод 27
— — спектрофотометрический метод 25
— — электродный метод 29
— как окислитель 321, 322, 326, 328, 341, 361
Физико-химическое изучение ферментов 11, 19, 20
Физостигмин 313, 314
Фильтрующие средства 19, 41
Фиске — Суббароу метод определения фосфатов 30
Фицин 102, 410
Флавинадениндинуклеотид (ФАД), внутриклеточная локализация 541
— диссоциация флавопротеидов 393, 394
— образование см. 2.7.7.2
— определение 403
— структура и свойства 356—361
Флавинмононуклеотид (ФМН), превращение в ФАД, см. 2.7.7.2
— структура и свойства 356—361
Флавиновые простетические группы 237, 249, 276, 277, 356—361, 395
— — — число на молекулу 357, 358
Флавины и флавопротеиды 246, 275, 276, 359, 403
— окисление и восстановление 343, 359
— флуоресценция 27, 358
Флавопротеид — O_2 (комплекс) 246
Флавопротеиды 357, 358
— активность каталитического центра 357, 358
— атомы металла 274—277, 361
— диссоциация 393, 394, 399

Флавопротеиды, механизм восстановления 245, 249, 359
— окисление 245, 277, 359, 360
— перенос водорода 342, 343, 359, 469
Флуоресценция 27, 358
ФМН см. Флавинаденинмононуклеотид
ФМН-аденилилтрансфераза, распространение 539
Фолевая кислота как кофермент 367—369
— — производные 352
Фолина — Чикальто метод определения белка 34
Формальдегид, образование см. 4.1.2.2
— соединение с тетрагидрофолатом 353
Формальдегиддегидрогеназа 329, 367
Формиат, взаимодействие с тетрагидрофолатом 353
Формиат, образование см. 1.2.1.1, 3.5.1.8, 4.1.1.2 и 4.1.1.8
Формиатдегидрогеназа 301
Формиласпартат, образование см. 3.5.3.5
Формилглутатион 367
Формилкинуренин, гидролиз см. 3.5.1.9
Формилпорфирин в молекуле цитохрома А 338
Формил-ТГФ 353
Формилтетрагидрофолат-синтетаза 269, 354
Формилтрансфераза 354, 521
Формильная группировка, перенос тетрагидрофолатом 352—354
Формиминоглутамат, образование см. 3.5.2.a
Формимино-ТГФ 353
5-Формимино-ТГФ 354
Формольного титрования метод 30
Фосфат как активатор фермента 275, 389, 392
— — акцептор гликозильных групп 165, 186
— — репрессор 442
— неорганический, колориметрическое определение 30
— переносчики 347, 349, 350
— торможение арилсульфатазы 58
Фосфатазы кислая и щелочная см. Кислая фосфатаза и Щелочная фосфатаза
— колориметрический метод определения 30
— механизм действия 252, 257—259
— специфичность 169, 170, 179, 195, 196
Фосфат-ацетилтрансфераза 164, 372, 497, 533
Фосфатидатфосфатаза 516, 550
Фосфатидилинозит 392
Фосфатидилхолин, образование см. 2.7.8.2
Фосфатидилэтаноламин, гидролиз см. 3.1.1.4
— образование см. 2.7.8.1
Фосфатиды, биосинтез 350, 488
Фосфатные группы, перенос фосфатазами 252, 256, 259
Фосфатов акцепторы, количество в тканях 533
3′-Фосфоаденилилсульфат, гидролиз см. 3.1.3.7
3′-Фосфоаденилилсульфат, образование см. 2.7.1.25
— реакции см. подгруппу 2.8.2
— как предшественник органического сульфата 169
Фосфоамидные связи, образование 531, 532
2-Фосфо-D-глицерат, образование 490; см. также 2.7.5.3, 4.2.1.11
Фосфоглицераткиназа 253, 256, 259, 492, 525
Фосфоглицерат-фосфомутаза 168, 396
Фосфоглицеромутаза 191, 261, 396, 399, 492, 554
Фосфоглюкомутаза, внутриклеточная локализация 539, 558
— кофакторы 261
— образование 421
— реакции 168, 470, 507, 528
— структура 261, 396, 408, 415
Фосфоглюконатдегидрогеназа 45, 162, 242, 500
О-фосфогомосерин, образование см. 2.7.1.39
— превращение в треонин 363; см. также 4.2.99.2
Фосфогуанидинацетат, образование см. 2.7.3.1
Фосфодиэстераза 253
— действие 169, 170
Фосфокетолаза 398, 510
Фосфокиназы, колориметрический метод 30
Фосфокофермент см. НАДФ
Фосфолипиды во внутриклеточных частицах 341, 537, 545
— роль в окислительных процессах 332, 341
Фосфолипазы, специфичность 179
Фосфомевалонат, образование 511; см. также 2.7.1.36
Фосфомевалонаткиназа 511
Фосфомолибдат как активатор фермента 275
Фосфомутазы 158, 168, 191
— коферменты 366
Фосфопантотенат, образование 488, 518; см. также 2.7.1.33
Фосфопантотеноилцистеин-декарбоксилаза 518
Фосфопируват, образование 492; см. также 2.7.1.40, 4.1.1.31 и 4.2.1.11
Фосфопируват-гидратаза 227, 372, 377, 396, 412, 492
— спектрофотометрический метод определения 25
Фосфопротеинфосфатаза 377
Фосфор, перенос рибонуклеазами 168—170
— радиоактивный 167, 255, 406, 414, 415, 531
Фосфорибоазил-аминоимидазол-карбоксилаза 521
Фосфорибозил-аминоимидазол — синтетаза 520
Фосфорибозил-аминоимидазолсукцинокарбоксамид — синтетаза 521
N-1-(5′-фосфорибозил)-АТФ 453
Фосфорибозилглицинамид — синтетаза 269, 520
Фосфорибозилпирофосфат, образование 516, 520; см. также 2.7.6.1
— роль в образовании нуклеотидов 516, 520, 523; см. также 2.4.2.7
Фосфорибозил-формилглицинамидин — синтетаза 520
Фосфорибулокиназа 527
Фосфорилазы 158, 165
— *a* и *b* 399
— и киназы, совместное действие 265 533

Фосфорилазы колориметрический метод определения 30
— механизм действия 252, 255, 258
— специфичность 186, 187
Фосфорилирование 31, 324, 333, 474—476, 542, 544, 545
— окислительное, механизм 531—533
— при помощи АТФ см. погруппы 2.7.1, 2.7.2, 2.7.3 и 2.7.4
— факторы сопряжения 531
Фосфорилированная форма гистидина 532
Фосфорорганические ингибиторы 307—311, 406, 414, 415, 572
Фосфотрансферазы, специфичность 187—191
Фосфофруктокиназа, спектрофотометрический метод определения 26
Фотовосстановление коферментов 490, 524
Фотоокисление гистидина и триптофана 407
Фотосинтез 524—529
— образование АТФ из АДФ и фосфата 490, 524
— участие цитохромов 335—337, 543
— ферменты 543
— фиксация CO_2 490, 524
Фотохимические реакции 574, 576
Фотохимический спектр 344—346
Фракционирование внутриклеточных включений 474, 475, 535—540, 544
D-фруктоза, мутаротация 230; см. также 5.1.3.3
— образование см. 1.1.1.14, 1.1.2.2 и 5.3.1.7
— фосфорилирование см. 2.7.1.1, 2.7.1.3 и 2.7.1.4
L-фруктоза, образование см. 1.1.1.15
Фруктозодифосфат, образование 491; см. также 2.7.1.11 и 4.1.2.7
D-фруктозодифосфат, гидролиз см. 3.1.3.11
Фруктозо-1-фосфат см. 2.7.1.3
D-фруктозо-6-фосфат, образование см. 1.1.1.17, 2.2.1.2, 2.7.1.4, 3.1.3.11 и 5.3.1.8
— фосфорилирование см. 2.7.1.11
β-Фруктофуранозидаза 72, 128, 252, 306, 406, 410
D-фруктуронат, изомеризация см. 5.3.1.12
Фторацетат, токсичность 312
Фтординитробензол 399, 400
Фторцитрат как ингибитор фермента 312
L-фукоза, изомеризация см. 5.3.1.3
Фумараза, поляриметрический метод определения 29
Фумарат, образование из аденилосукцината см. 4.3.2.2
— — — аргининосукцината см. 4.3.2.1
— — — L-аспартата см. 4.3.1.1
— — — малата см. 4.2.1.2
— — — малеата см. 5.2.1.1
— — — фумарилацетоацетата см. 3.7.1.2
Фумаратгидратаза, активация анионами 78, 121, 312, 370, 389, 392
— действие температуры 142, 144—146
— ионизация групп 107, 120, 298, 411
— конкурентные ингибиторы 226, 227
— механизм действия 261, 262
— молекулярный вес 397
— распространение 539, 544, 556
— специфичность 181, 226, 227
Фумаратгидратаза, термодинамические характеристики 146
Фумарилацетоацетаза 505
Фумарилацетоацетат, образование 485, 505; см. также 5.2.1.2
Фумарилпируват, изомеризация см. 5.2.1.a

Хартриджа — Рафтона проточный метод 96
Хелатные комплексы металлов с ферментом и субстратом 272, 273, 274, 376
Химопапаин 396
Химотрипсин В 396, 464
— кинетика действия 102, 103
— механизм действия 257
— образование из предшественников 459—463
— специфичность 180, 198—217, 219—222
— торможение фосфорорганическими соединениями 307, 310
α-Химотрипсин 396, 398, 400, 405, 406, 460—464
β-Химотрипсин 396, 460, 461
γ-Химотрипсин 396, 460, 461
Химотрипсиноген 414, 459, 462
— активация 459—463
— В 460
Хинин 314
— окисление 179
Хинолинметподид, механизм восстановления 244
Хиноны как акцепторы водорода 275, 276, 361
— — переносчики водорода 330—378
Хитин, образование 350; см. также 2.4.1.16
Хлор, связывание белков 406
Хлора ион, действие на pH-кривую α-амилазы 389
— — как ингибитор фумаратгидратазы 389
Хлорамфеникол 448
Хлорацетофенол как ингибитор фермента 303, 304
Хлорин в молекуле цитохрома 339
Хлористый натрий, активация арилсульфатазы 61, 62
Хлормеркурибензоат 399, 407, 414
Хлоропласты, локализация в цитоплазме 534, 537
— содержание цитохромов 334, 336
— строение 545
— ферменты 543
Хлорофилл 543, 546
Хлороформ, денатурация белков 49
Хлорпромазин как ингибитор дыхания 311
Холат, экстракция ферментов 37, 341, 343, 475
Холдейна соотношение 104, 146
Холестеролэстераза 538
Холинкиназа 516
Холинфосфат, образование 488, 516
Холинфосфотрансфераза 516
Холинфосфат-цитидилилтрансфераза 516
Холинэстераза 295, 296, 306—311, 313—316, 559
— активность каталитического центра 295, 296
— активный центр 416
— ионизация групп 107, 121, 410

Холинэстераза, манометрический метод 27
— механизм действия 279, 343—346
— мутантная форма 572
— распространение 193, 538, 540, 555, 557
— специфичность 193—195
— сродство к субстрату 100
— типы 193
— торможение 281, 295, 296, 307, 308, 310, 313—316
Холоил-КоА — синтетаза 538
Хроматографические методы 30, 44
— —разделения ферментов 44—46
Хромаффиновые гранулы 534
Хромосомы, препараты 545
— структура 445, 535
— число в разных клетках 559

ЦДФ и синтез фосфатидов 350, 516
Цезий как активатор фермента 371, 372
Целлюлаза, молекулярный вес 396
Целлюлоза, образование 350; см. также 2.4.1.12
Центрифуга с охлаждением 19, 40
Центросома 534
Цепи реакций 12, 453, 466, 467, 478—529, 576
Цианид, активация протеиназ 62
— как ингибитор фермента 275, 279, 280, 281, 298, 299, 311, 342, 344, 346
— — реактиватор 306
— соединение с НАД 326
Циклические декстрины, образование см. 2.4.1.19
— спирты, окисление см. 1.1.1.1
— *фосфаты, образование* 169
Цинк в молекулах ферментов 247, 272, 274, 302, 371, 399, 406
Цинка гидроокись фракционирование ферментов 43
— ион как активатор фермента 371—373
— — — ингибитор фермента 371, 372
цис-цис-Муконат, изомеризация см. 5.5.1.1
Цистатионин 487, 507
Цистеин, восстановление цитохрома 342, 343
Цистеинат, декарбоксилирование см. 4.1.1.15
— образование комплексов с металлами 306
— реакция с иодацетатом 302
Цистинилдиглицин 411
Цистинурия 572
Цитидин, фосфорилирование см. 2.7.1
Цитидинди(три)фосфат, структура 348
Цитоплазма, структура 534, 535
Цитохром(ы), внутриклеточная локализация 341, 474, 475, 541, 542
— восстановление 239, 339—341
— — спектрофотометрический метод определения 25
— изменение спектра при восстановлении 238, 333—337, 339
— история открытия и номенклатура 333—338
— молекулярный вес 334—337
— окисление 237—240, 279
— очищенные 340, 475
— полосы поглощения 333, 339, 340, 344, 345
Цитохром(ы), распространение 340, 341, 541, 543
— структура простетических групп 338, 339
— типы 333—338
— *a* 333—336, 475, 541, 543
— a_1 334, 346
— a_2 см. Цитохром CD
— a_3 334, 340—346, 543
— *b* 334, 340—343, 475, 541, 543
— b_1 334
— b_2 279, 334, 340, 342
— b_3 334, 340, 543
— b_4 см. Цитохром C (554, галотолерантные бактерии)
— b_5 334, 340—342, 477
— b_6 334, 543
— b_7 334, 543
— B (559, *Streptomyces*) 335
— *c* 335, 340—342
— — восстановление 275, 279, 328, 341—343 см. также 1.6.2.1, 1.1.2.3, 1.3.2.1, 1.3.2.2, 1.3.2.3
— — как переносчик 13, 342, 344, 345, 469, 473, 474, 475
— — кристаллический 340
— — окисление 341, 343—346, см. также 1.9.3.1, 1.11.1.5
— — растворимый в липидах 341
— — строение 239, 340, 341, 565
— c_1 330, 334, 340—343, 475, 541, 543
— c_2 335, 340
— c_3 335, 340
— c_4 335, 340, 346
— c_5 335, 340
— C (554, галотолерантные бактерии) 336
— — (556, гепатопанкреас *Helix pomatia*) 336, 337, 340
— — (555, хлоропласты растений) 336, 340, 543
— — (553, *Chlorobium*) 336, 340
— — (552, *Chromatium*) 336, 340
— — (552, *Euglena*) 336
— — (551, *Pseudomonas*) 335, 340, 341
— — (*Chromatium*) 337
— CD (625, 554, 549, *Pseudomonas aeruginosa*) 337, 340, 344, 346
— *f* см. Цитохром C (555, хлоропласты растений)
— *h* см. Цитохром C (556 гепатопанкреас *Helix pomatia*)
— *o* 344, 346
Цитохромоид C (*Rhodospirillum rubrum*) 377
Цитохромоксидаза бактерий 344, 346, 544
— распространение 475, 538, 542, 553, 562
— реакции 341, 343—346, 394, 395, 398, 386
— торможение 279, 281, 298, 311
Цитрат как активатор фермента 389
Цитрат, образование 495
Цитрат-синтаза, колориметрический метод 30
Цитруллин, образование 488, 514; см. также 2.1.3.3 и 3.5.3.6
— превращение в аргининосукцинат 488, 514
ЦТФ, гидролиз см. 3.6.1.3
— участие в реакциях нуклеотидилтрансферазы 349, 564, 516

ЦТФ, фосфорилирование см. 2.7.1.11, 2.7.1.g и 2.7.1.40
Цучихаши метод 49

Четверной комплекс 269

Швайна и Брауна механизм «согласованного замещения» 243
Шиффовы основания 261, 362, 363
Шютца закон 59, 456

Щелочная фосфатаза, активация 372
— — молекулярный вес 397
— — механизм 253, 257—259
— — распространение 538, 543, 546, 549, 557, 561, 566
— — реакции 26, 323, 517
— — репрессия 442, 450
— — специфичность 195, 196
— — торможение 301, 317
— — экстракция 35, 37
— — pK_m 128, 410

Эверин 313, 314
Экзоамилаза 170
Экзопептидазы 171
Экстракция ферментов 36, 37, 341, 343, 475, 544, 545
Электродные методы 28, 29
Электрокинетический потенциал белков 376, 393
Электролиты как активаторы ферментов 370—392
Электронная микроскопия 534, 535, 545, 546
Электронного парамагнитного резонанса метод 275
Электроноакцепторная сила замещающей группы 195, 197
Электрофорез в гелях, разделение изоферментов 53, 567—569
— как тест на гомогенность 49—51, 53
Электронпереносящие частицы 475
Электрофоретическая подвижность белков 51, 563, 564 567
Эмиссионный анализ 404
Эндоамилаза 170
Эндопептидазы 170, 171
Эндоплазматический ретикулум 534, 537, 545
— — пузырьки 534
Энергия активации 13, 135, 136, 139—144
Энергия, необходимая для биосинтеза 349, 530, 533
— перенос 164, 165, 166, 173, 268, 347, 351, 530—533
Энзимологическая генетика 569—573
Энзимология опухолей 561—563
— развития 560—562, 569
— сравнительная 546—569
Энтеропептидаза 458, 459, 464
Энтропия активации образования и распада ES-комплекса 136, 137
— — процесса денатурации 133
— — — инактивации 133
— денатурации 133
— инактивации 133
— образования ES-комплекса 135
Эпимеразы 173, 181
— механизм действия 263
— отличие от рацемаз 160
— специфичность 196
Эритритол, окисление см. 1.1.2.2
Эритрозофосфат 484, 490, 501, 526
Эритрозо-4-фосфат, образование см. 2.2.1.1, 2.2.1.2 и 4.1.2.d
L-эритрулоза, восстановление см. 1.1.1.9
Эритрулозо-1-фосфат, образование см 4.1.2.2, 4.1.2.3
Эстеразы 169, 170, 191
— манометрический метод определения 27
— специфичность 169, 179, 191—195
— торможение фосфорорганическими соединениями 307—311, 406, 407, 414—417
Эстрадиол-17-β-дегидрогеназа 242
Эстриол, гидроксилирование см. 1.99.1.a
Эстрон, образование см. 1.1.1.i
Этаноламин, фосфорилирование см. 2.7.1.32
Этаноламинфосфат см. 2.7.7.14
Этилакрилат как ингибитор фермента 303, 304
Этилиодацетат 303, 304
Эфиры, гидролиз 219, 221, 251, 252

Яблочная кислота 30
Ядерная мембрана 534, 544
Ядро бактерии 535, 544
— препараты 537, 542, 543
— размер 537
— синтез белков 543
— структура 534, 535
— ферменты 538, 539, 542, 543
Ядрышко 535, 536, 545
Яды как ингибиторы ферментов 280, 300—302, 478
Яичный альбумин, действие пепсина 219

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ 5

ИЗ ПРЕДИСЛОВИЯ АВТОРОВ 7

ГЛАВА I. ВВЕДЕНИЕ 9

ГЛАВА II. МЕТОДИКА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ 15

Измерение скорости ферментативных реакций . 15
Типы методов, используемых при изучении ферментативных реакций 17
Некоторые практические соображения . . . 18
Общие принципы работы с ферментами . . 18
Исследование фермента 20
Удельная и молекулярная активности . . . 21
Сродство фермента к реагирующим веществам . . 23
Методы количественного изучения ферментативных реакций 24

ГЛАВА III. ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ 31

Значение очистки ферментов 31
Методы очистки 32
Методы фракционирования 37
Критерий чистоты ферментов 50
Затруднения, встречающиеся при работе с чистыми ферментами 53

ГЛАВА IV. КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ . . 54

Значение изучения кинетики действия ферментов 54
Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций 54

ГЛАВА V. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ . . . 148

Система нумерации ферментов, предложенная Комиссией 149
Правила систематической и тривиальной номенклатуры 154
Ферментативные реакции 161

ГЛАВА VI. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ 175

Изучение специфичности действия ферментов . 176
Общие замечания о специфичности 179
Примеры, иллюстрирующие специфичность ферментов 183
Общие выводы 231

ГЛАВА VII. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ 235

Механизм реакций переноса водорода 236
Механизм действия трансфераз (или гидролаз) 250
Механизм действия лиаз 261
Механизм действия изомераз 263
Механизм действия лигаз 265
Механизм действия металлоферментов . . . 271

ГЛАВА VIII. ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ 280

Типы ингибиторов 281
Влияние pH на торможение 297
Некоторые важные ингибиторы 298

ГЛАВА IX. КОФАКТОРЫ ФЕРМЕНТОВ 318

Специфичные коферменты 318
Активаторы ферментов 370
Полинуклеотидные матрицы 393
Различие между простетической группой, коферментом и субстратом 393

ГЛАВА X. СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ 395

Молекулярный вес 395
Строение белка 399
Химия активного центра 403

ГЛАВА XI. ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ 418

Биосинтез ферментов 418
Образование ферментов из предшественников . . 454

ГЛАВА XII. ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ 466

Биологическое значение ферментных систем . . 466
Взаимосвязь ферментов 467
Системы дегидрогеназ, связанные с коферментом 469
Распределительная функция ферментов переноса 472
Время переноса 473
Структурная организация ферментных систем . . 473
Некоторые свойства полиферментных систем . . 477
Пояснения к таблицам 480

ГЛАВА XIII. БИОЛОГИЯ ФЕРМЕНТОВ . . . . .

Ферменты как основа жизни 530
Ферменты и структурные компоненты клетки . . 534
Сравнительная биохимия ферментов 546
Энзимологическая генетика 569
Происхождение ферментов 574

СПИСОК ФЕРМЕНТОВ 579

УКАЗАТЕЛЬ К СПИСКУ ФЕРМЕНТОВ 694

ЛИТЕРАТУРА 718

АТЛАС КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ 773

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ 789

М. Диксон и Э. Уэбб

ФЕРМЕНТЫ

Редактор М. Г. Дунина Художник Б. И. Астафьев
Художественный редактор Ю. Л. Максимов Технический редактор М. А. Белева

Сдано в производство 25/V 1966 г. Подписано к печати 9/IX 1966 г.
Бумага 70×108 1/16=25,5 бум. л. 71,4 усл. печ. л. в т/ч 8 вкл.
Уч.-изд. л. 73,2. Изд. № 4/3358 Цена 5 р. 48 к. Зак. 316
(Темплан 1966 г. изд-ва «Мир», пор. № 144)

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
Москва, 1-й Рижский пер., 2

Московская типография № 16
Главполиграфпрома Комитета по печати при Совете Министров СССР
Москва, Трехпрудный пер., 9