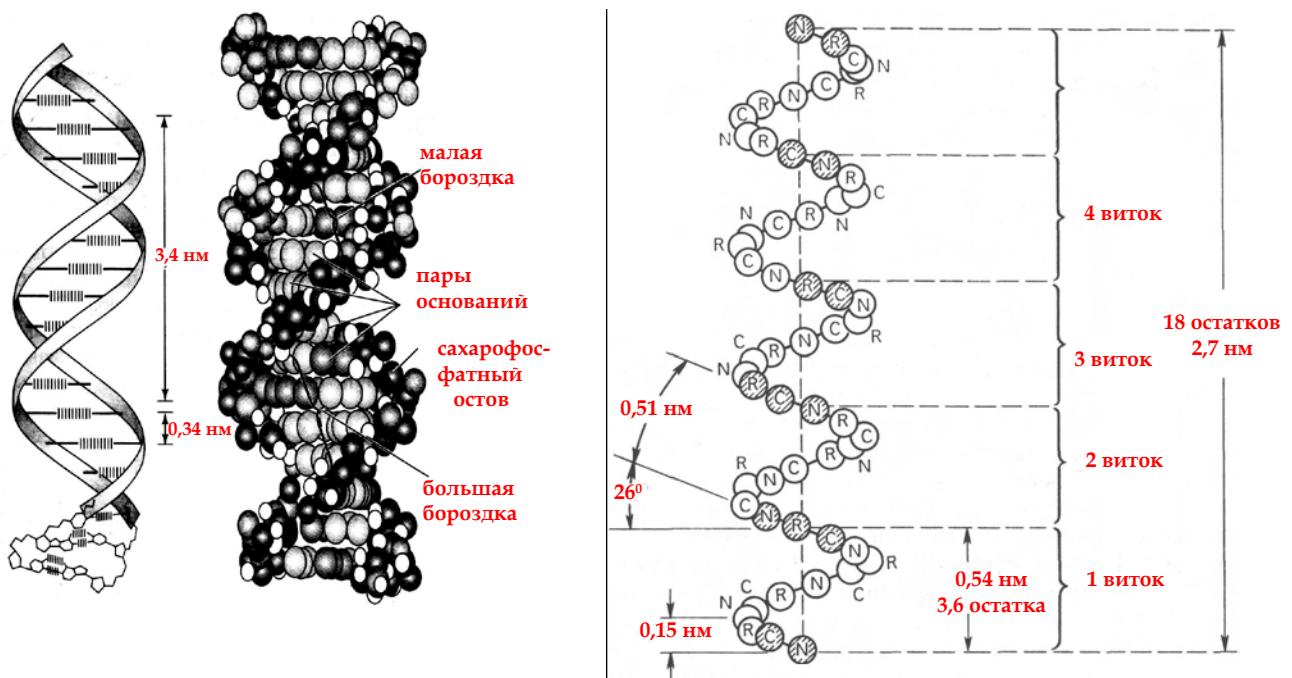


Л. В. КУЗЬМИЧЕВА, Р. В. БОРЧЕНКО,  
О. С. НОВОЖИЛОВА

# БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

(КРАТКИЙ КУРС ЛЕКЦИЙ)



САРАНСК 2010

УДК 577 (075.8)

ББК Е 07

Б 633

Р е ц е н з е н т:

доктор биологических наук О. С. Шубина

доктор биологических наук Е. В. Громова

**Биологическая химия : Краткий курс лекций / Л. В. Кузьмичева,  
Р. В. Борченко, О. С. Новожилова.** – 2-е изд., доп. – Саранск, 2010. – 154 с.

Настоящее учебное пособие представляет собой краткий курс лекций по биологической химии, долгое время читаемый сотрудниками кафедры биохимии для студентов ГОУВПО «Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева». В пособие даны представления о химическом составе живого организма, о строении и свойствах основных классов биомолекул и их участии в биохимических процессах.

Пособие предназначено для учащихся лицеев и гимназий, студентов дневной, вечерней и заочной форм обучения, аспирантов и соискателей медико-биологических и сельскохозяйственных факультетов.

Учебное издание

**КУЗЬМИЧЕВА Лидия Васильевна  
БОРЧЕНКО Руслан Владимирович  
НОВОЖИЛОВА Ольга Сергеевна**

# **БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**

## **Краткий курс лекций**

*Печатается в авторской редакции с готового оригинал макета*

Подписано в печать . .10. Формат 60 × 84 1/16. Бумага офсетная.  
Печать офсетная. Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. . Уч.-изд. л. .  
Тираж 300 экз. Заказ № .

© Коллектив авторов, 2010

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	4
Предисловие	5
<b>Раздел 1. Химический состав организма</b>	6
Глава 1. Элементарный и молекулярный составы живого	6
Вопросы для самоконтроля	8
Глава 2. Строение и свойства основных классов биологических молекул	9
2.1 Аминокислоты. Пептиды. Белки	9
2.2 Ферменты	23
2.2.1 Строение и свойства ферментов	23
2.2.2 Механизм действия ферментов	30
2.3 Углеводы, строение и свойства	36
2.4 Нуклеиновые кислоты, строение и свойства	46
2.4.1 Строение ДНК	48
2.4.2 Строение РНК	51
2.5 Липиды, строение и свойства	54
2.6 Гормоны и витамины	63
Вопросы для самоконтроля	72
<b>Раздел 2. Обмен веществ в живом организме</b>	74
Глава 3. Биосинтез нуклеиновых кислот и белков	74
3.1 Биосинтез ДНК (репликация)	74
3.2 Биосинтез РНК (транскрипция)	76
3.3 Биосинтез белка (трансляция)	78
Вопросы для самоконтроля	85
Глава 4. Метаболизм биомолекул в живом организме	86
4.1 Обмен веществ и энергии	86
4.2 Обмен белков	94
4.2.1 Катаболизм белков и аминокислот	94
4.2.2 Анаболизм аминокислот	96
4.3 Обмен углеводов	98
4.3.1 Основные пути катаболизма углеводов	98
4.3.2 Анаболизм углеводов	109
4.4 Обмен нуклеиновых кислот	112
4.4.1 Катаболизм нуклеиновых кислот	112
4.4.2 Анаболизм нуклеиновых кислот	113
4.5 Обмен липидов	117
4.5.1 Катаболизм липидов	117
4.5.2 Анаболизм липидов	122
4.6 Взаимосвязь метаболизма отдельных классов соединений	126
Вопросы для самоконтроля	129
<b>Раздел 3. Прикладная биохимия</b>	130
Глава 5. Биохимия в технологии	131

Список рекомендуемой литературы  
Предметный указатель

## Список сокращений

<b>dАМФ</b> - дезоксиаденинмонофосфат	<b>МБС</b> - международный биохимический союз
<b>dНДФ</b> - дезоксинуклеозиддифосфат	<b>мРНК</b> - матричная рибонуклеиновая кислота
<b>dНМФ</b> - дезоксинуклеозидмонофосфат	<b>НАД</b> - никотинамидадениннуклеотид
<b>dНТФ</b> - дезоксинуклеозидтрифосфат	<b>НАДФ</b> - никотинамидадениннуклеотид фосфат
<b>dТМФ</b> - дезокситимидинмонофосфат	<b>НДФ</b> - нуклеозиддифосфат
<b>dУМФ</b> - дезоксиуридинфосфат	<b>НМФ</b> - нуклеозидмонофосфат
<i>f</i> - <i>Met</i> - формил-метионин	<b>НТФ</b> - нуклеозидтрифосфат
<b>HS-КоА</b> - коэнзим А	<b>РНК</b> - рибонуклеиновая кислота
<b>Ig</b> - иммуноглобулин	<b>рРНК</b> - рибосомальная рибонуклеиновая кислота
<b>АДФ</b> - аденоzinдифосфат	<b>СЖК</b> - свободные жирные кислоты
<b>АК</b> - аскорбиновая кислота	<b>тРНК</b> - транспортная рибонуклеиновая кислота
<b>АКТГ</b> - адренокортикотропный гормон	<b>УДФ</b> - уридиндифосфат
<b>АМФ</b> - аденоzinмонофосфат	<b>УДФГ</b> - уридиндифосфат-глюкоза
<b>АПБ</b> - ацилпереносящий белок	<b>УМФ</b> - уридинмонофосфат
<b>АТФ</b> - аденоzinтрифосфат	<b>УТФ</b> - уридинтрифосфат
<b>ГМФ</b> - гуанозинмонофосфат	<b>ФАД</b> - флавинадениндинуклеотид
<b>ГТФ</b> - гуанозинтрифосфат	<b>ФМН</b> - флавинмононуклеотид
<b>ДАК</b> - дегидроаскорбиновая кислота	<b>Фн</b> - фосфат
<b>ДНК</b> - дезоксирибонуклеиновая кислота	<b>ФС</b> - фосфатидилсерин
<b>ДФФ</b> - дизопропилфторфосфат	<b>ФХ</b> - фосфатидилхолин
<b>ЖКТ</b> - желудочно-кишечный тракт	<b>ФЭА</b> - фосфатидилэтаноламин
<b>ИМФ</b> - инозинмонофосфат	<b>цАМФ</b> - циклический аденоzinмонофосфат
<b>ИЭТ</b> - изоэлектрическая точка	<b>цГМФ</b> - циклический гуанозинмонофосфат
<b>КрФ</b> - креатинфосфат	<b>ЦНС</b> - центральная нервная система
<b>КФ</b> - классификация ферментов	<b>ЦТК</b> - цикл трикарбоновых кислот
<b>КФК</b> - креатинфосфокиназа	<b>ЦТФ</b> - цитозинтрифосфат
<b>ЛДГ</b> - лактатдегидрогеназа	<b>ЩУК</b> - щавелевоуксусная кислота
<b>ЛФХ</b> - лизофосфатидилхолин	
<b>ЛФЭА</b> - лизофосфатидилэтаноламин	

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Химия, а в частности биохимия, относится к числу естественных наук, т.е. наук, изучающих природу. Природа бесконечно разнообразна, однако это разнообразие представляет единство, которое заключается в ее материальности. Материя является первоосновой, единственным источником и причиной всех процессов, протекающих в природе (абсолютно все состоит из материи и порождено ею).

Биохимия — это наука о веществах, из которых построены живые организмы, и о химических процессах, протекающих в живых организмах. Она является основой для глубокого понимания всего, что происходит на более высоких уровнях организации живой материи и в первую очередь в клетках и живых организмах. Непрерывно возрастает воздействие биохимии на важнейшие связанные с живой природой сферы человеческой деятельности — здравоохранение, сельское хозяйство, биотехнологическую промышленность, охрану окружающей среды. Поэтому без опоры на биохимические знания сегодня немыслимо полноценное биологическое, медицинское, агрономическое, экологическое образование.

В живой природе встречаются многие тысячи различных химических соединений и протекают тысячи разнообразных химических превращений. Многие из них уже достаточно хорошо известны. Часть этих веществ и превращений свойственна всем представителям живой природы, другие встречаются лишь у определенных систематических групп живых организмов. У многоклеточных организмов, в том числе и у человека, многие вещества и превращения характерны для определенных органов или систем — пищеварительной, кровеносной, эндокринной, иммунной и т.д.

Химические превращения, изучаемые биохимией, — это в подавляющем большинстве случаев процессы, катализируемые ферментами. Применительно к реакциям, протекающим с участием ферментов, и системам таких реакций, приводящим в итоге к определенному химическому результату, часто применяют термин биохимическое превращение.

Конечной целью химических процессов, протекающих в живой природе, чаще всего является либо синтез сложных органических молекул из простых, доступных живому организму предшественников, либо деградация таких молекул до простых соединений, выводимых из организма. Важную роль химические превращения играют в обеспечении жизнедеятельности организма энергией, необходимой для совершения различных видов работы.

# РАЗДЕЛ I. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМА

---

## ГЛАВА 1. ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВЫ ЖИВОГО

---

В природе встречается около 80 стабильных химических элементов, однако из них только 15 элементов входят в состав живой материи и еще 8-10 обнаружены только в определенных организмах.

Химические организмы почти на 99 % состоят из четырех химических элементов: водорода (H) (2-3 % сухого вещества), кислорода (O) (25-30 %), углерода (C) (50-60 %) и азота (N) (8-10 %). Водород и кислород – составные элементы воды, на которую приходится до 60-70 % массы клеток. Многие биомолекулы содержат также атомы серы (S) и фосфора (P). Перечисленные макроэлементы входят в состав всех живых организмов.

Химические элементы, относящиеся ко второй важной в биологическом отношении группе и в сумме составляющие примерно 0,5% массы тела животного и человека, присутствуют, за немногими исключениями, в виде ионов. Эта группа включает щелочные металлы (натрий (Na) и калий (K)), щелочноземельные металлы (магний (Mg) и кальций (Ca)), галогены (хлор (Cl)). Другие жизненно важные (эссенциальные) химические элементы присутствуют в столь малых количествах, что их называют следовыми элементами. Эта группа включает переходные металлы: железо (Fe), цинк (Zn), медь (Cu), кобальт (Co) и марганец (Mn). К жизненно важным микроэлементам относятся также некоторые неметаллы, такие, как иод (I) и селен (Se).

Малые размеры атомов водорода, кислорода, углерода и азота обуславливают их особое отличительное свойство, а именно – способность образовывать короткие, прочные химические связи. Молекулы с такими связями более устойчивы к действию химических и физических факторов. Кроме того, большое значение имеет также способность перечисленных элементов образовывать кратные связи (двойные, реже тройные).

Ковалентные связи, обладающие энергией от 50 до 300 кДж/моль, являются основными в биомолекулах, и определяют особенности их строения.

Ионные связи («солевые мостики»), несмотря на небольшие значения энергии (в среднем около 4-5 кДж/моль) важны для поддержания структуры многих биомолекул и для протекания биохимических реакций.

Водородные связи возникают в результате дипольных взаимодействий, особенно между атомами водорода и кислорода или водорода и азота, что объясняется достаточно высокой электроприятельностью этих элементов и малым объемом атома водорода. Величина энергии водородной связи ~13

кДж/моль.

Гидрофобные связи, или точнее взаимодействия, возникают между неполярными частями одной или нескольких молекул. Энергия таких связей невелика и колеблется в пределах от 4 до 8 кДж/моль. Несмотря на низкий энергетический запас такие связи очень важны в поддержании конформации биомолекул и структур надмолекулярных комплексов.

Биомолекулы отличаются сложным составом и содержат разнообразные структуры. Среди многочисленных функциональных групп в биомолекулах важнейшими являются группы наглядно изображенные на рисунке 1.1.

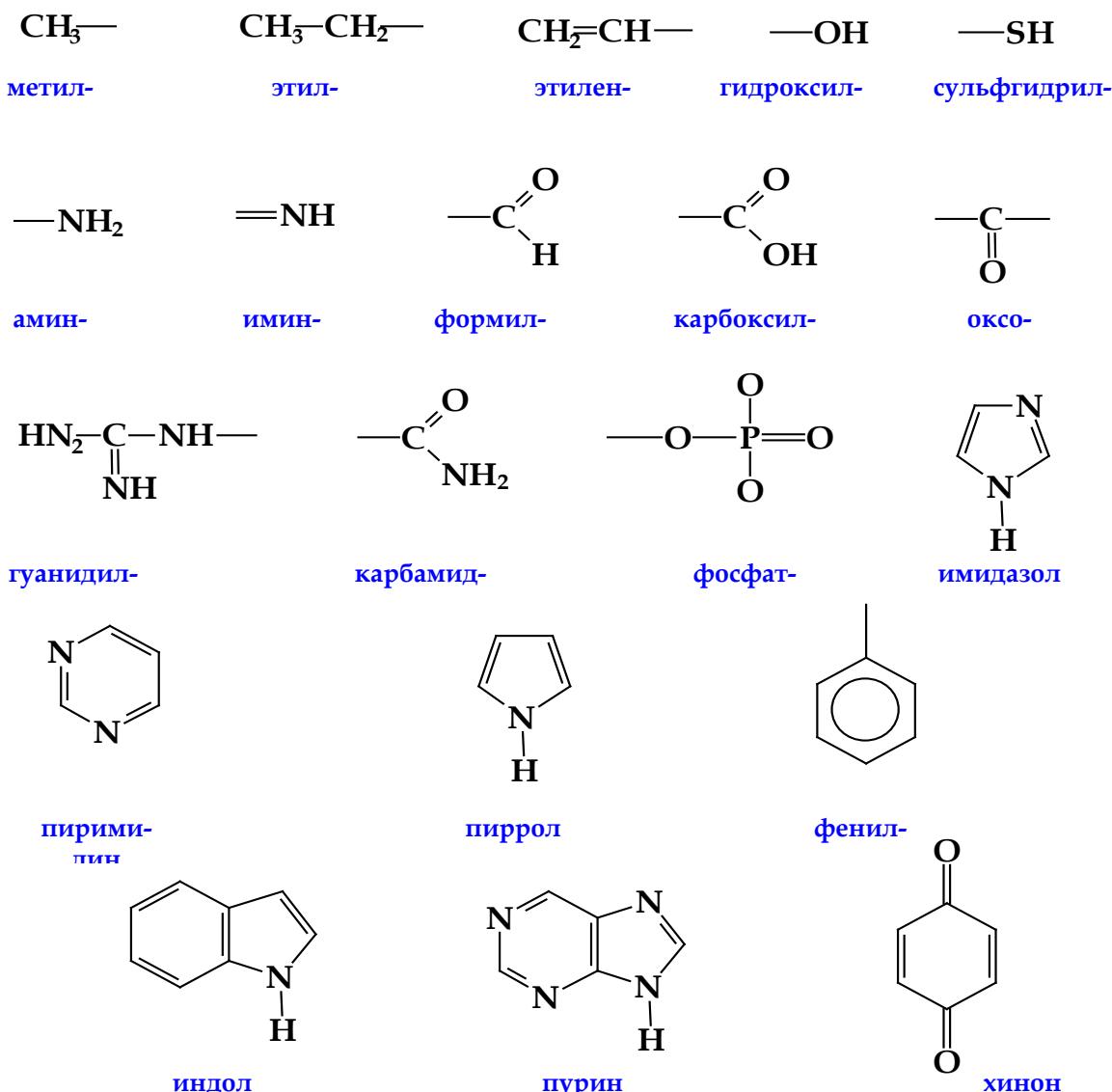


Рисунок 1.1 - Важнейшие функциональные группы и гетероциклы

Условно все молекулы клетки можно разделить на: *малые органические молекулы* с молекулярной массой до 1 кДа и *макромолекулы*, или высокомолекулярные, молекулярная масса которых варьирует в пределах от 1 до 1000 кДа.

К малым органическим молекулам условно относят: аминокислоты, сахара (моносахариды и олигосахара), нуклеотиды и жирные (карбоновые)

кислоты. К макромолекулам относятся: белки, полисахариды (гомо- и гетерополисахариды), нуклеиновые кислоты, липиды.

Свыше 90 % всей массы клеток приходится на долю воды. В ней растворены многие биологические вещества, активность которых будет определяться свойствами воды как универсального растворителя.

Необходимо также отметить уникальные свойства воды, имеющие огромную роль в протекании всех биохимических реакций:

- вода — универсальный растворитель;
- у воды низкая температура замерзания и высокая температура кипения;
- диэлектрическая проницаемость воды, равная 80, дает возможность удерживать растворенные в ней вещества на расстоянии, способствуя образованию диполей;
- высокая теплота испарения (~540 кал/г) и высокая теплоемкость, равная 1 кал для нагрева 1 г воды на 1 градус, позволяет поддерживать постоянной температуру живых существ;
- плотность воды максимальна при 4 °C и выше, она превышает плотность льда, что позволяет сохранять жизнь от замерзания;
- водородные связи, образующиеся между молекулами воды, важны для поддержания структуры макромолекул и их функционирования.

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Дайте определение ковалентным связям. Опишите характер данных связей.
2. Какие химические элементы, присутствующие в биомолекулах, можно отнести к эссенциальным?
3. Перечислите макроэлементы, входящие в состав всех живых организмов.
4. Какие молекулы клетки можно условно отнести к малым органическим молекулам?
5. Какова роль воды в жизнедеятельности клетки?

## ГЛАВА 2. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ОСНОВНЫХ КЛАССОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

---

### 2.1. АМИНОКИСЛОТЫ. ПЕПТИДЫ. БЕЛКИ

Аминокислоты являются карбоновыми кислотами, содержащими одновременно аминную и карбоксильную группы. В организме человека и животных найдено порядка 70 аминокислот.

$\alpha$ -Аминокислоты представляют собой производные карбоновых (жирных) кислот, у которых один водородный атом, у  $\alpha$ -углерода, замещен на аминогруппу ( $-\text{NH}_2$ ), например:



Все аминокислоты, входящие в состав природных белков, являются  $\alpha$ -аминокислотами (так называемые протеиногенные аминокислоты), хотя аминогруппа в свободных аминокарбоновых кислотах может находиться и в  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -положениях.

Все встречающиеся в природе аминокислоты обладают общим свойством – *амфотерностью* (от греч. «amphoteros» – двусторонний), т.е. каждая аминокислота содержит как минимум одну кислотную и одну основную группы.

Аминокислоты отличаются друг от друга химической природой радикала R, представляющего группу атомов в молекуле аминокислоты, связанную с  $\alpha$ -углеродным атомом и не участвующую в образовании пептидной связи при синтезе белка.

Классификация аминокислот была разработана на основе химического строения радикалов, хотя были предложены и другие принципы. Различают ароматические и алифатические аминокислоты, а также аминокислоты, содержащие серу или гидроксильные группы. Часто классификация основана на природе заряда аминокислоты. Если радикал нейтральный (такие аминокислоты содержат только одну амино- и одну карбоксильную группы), то они называются нейтральными аминокислотами. Если аминокислота содержит избыток амино- или карбоксильных групп, то она называется соответственно основной или кислой аминокислотой.

Современная рациональная классификация аминокислот основана на полярности радикалов (R-групп), т.е. способности их к взаимодействию с водой при физиологических значениях pH (близких к pH 7,0). Различают аминокислоты, содержащие следующие радикалы: 1) неполярные (гидрофобные); 2) полярные (гидрофильные); 3) ароматические (большей частью неполярные); 4) отрицательно заряженные и 5) положительно заряженные.

В представленной классификации аминокислот (таблица 2.1) приведены наименования, сокращенные обозначения и структурные формулы аминокислот.

**Таблица 2.1 – Классификация и структура  $\alpha$ -аминокислот**

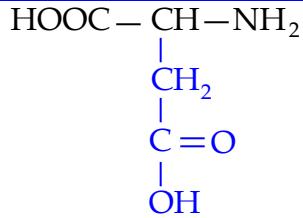
<b>Алифатические аминокислоты (неполярные)</b>	
$\text{HOOC}-\underset{\underset{\text{H}}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-глицин (гли)	$\text{HOOC}-\underset{\underset{\text{CH}_2}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-лейцин (лей)*
$\text{HOOC}-\underset{\underset{\text{CH}_3}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-аланин (ала)	$\text{HOOC}-\underset{\underset{\text{CH}-\text{CH}_3}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-изолейцин (иле)*
$\text{HOOC}-\underset{\underset{\begin{array}{c} \text{CH} \\   \\ \text{HC} \diagup \\ \text{HC} \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-валин (вал)*	
<b>Серосодержащие аминокислоты (полярные незаряженные)</b>	
$\text{HOOC}-\underset{\underset{\text{CH}_2}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-цистеин (цис)	$\text{HOOC}-\underset{\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\   \\ \text{S} \\   \\ \text{S} \end{array}}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-цистин (цин)
$\text{HOOC}-\underset{\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{S}-\text{CH}_3 \end{array}}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-метионин (мет)*	
<b>Гидроксиаминокислоты (полярные незаряженные)</b>	
$\text{HOOC}-\underset{\underset{\text{OH}}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-серин (сер)	$\text{HOOC}-\underset{\underset{\text{CH}-\text{CH}_3}{ }}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ L-трейонин (тре)*

Продолжение таблицы 2.1.

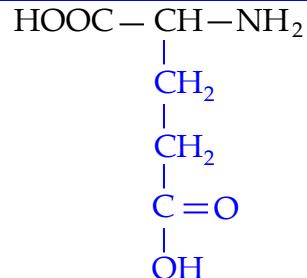
---

**Дикарбоновые аминокислоты (отрицательно заряженные)**

---



L-аспарагиновая кислота (асп)

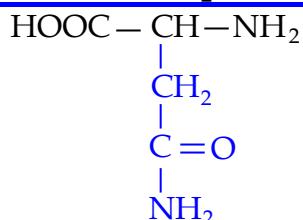


L-глутаминовая кислота (глу)

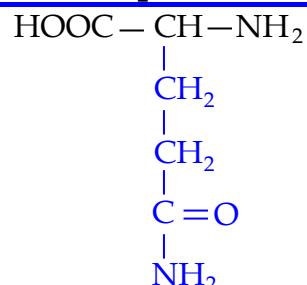
---

**Амиды дикарбоновых кислот (полярные незаряженные)**

---



L-аспарагин (асн)

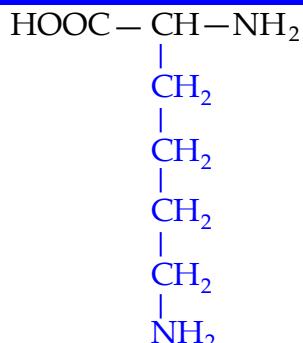


L-глутамин (гли)

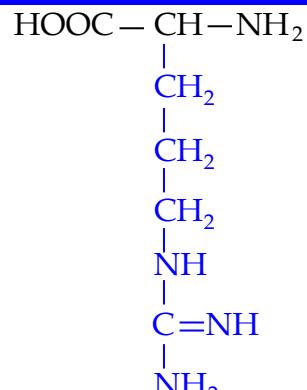
---

**Аминокислоты с катионообразующими группами в боковых цепях  
(положительно заряженные)**

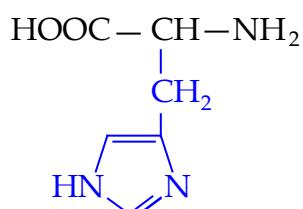
---



L-лизин (лиз)\*

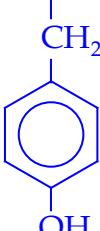
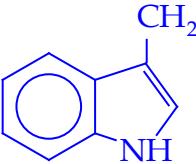
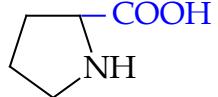


L-аргинин (арг)\*\*



L-гистидин (гис)\*\*

Окончание таблицы 2.1.

Ароматические аминокислоты	
$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)-\text{NH}_2$ 	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)-\text{NH}_2$ 
L-фенилаланин (фен)*	L-тироzin (тир)
$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)-\text{NH}_2$ 	Иминокислота 
L-триптофан (три)*	L-пролин (про)

\* - отмечены незаменимые аминокислоты  
\*\* - отмечены частично незаменимые аминокислоты

Для всех аминокислот, за исключением глицина, характерна оптическая активность. Они могут существовать в водных растворах в виде энантиомеров – D- и L-форм, в связи с наличием хирального атома углерода. Все α-аминокислоты существуют только в L-форме, однако в живой природе отмечено и наличие D-форм аминокислот, входящих в состав короткоцепочных пептидов.

Из 20 аминокислот, входящих в состав белков, только 10 способны синтезироваться в организме человека и млекопитающих. Такие аминокислоты получили название **заменимых**. Остальные 10 аминокислот являются **незаменимыми**, поскольку не могут синтезироваться в организме и должны поступать с пищей (таблица 2.1).

Аргинин и гистидин относятся к полунезаменимым, т.е. они могут синтезироваться в организме, но в количестве, недостаточном для сохранения нормальной жизнедеятельности.

В последние годы значительно повысился интерес к структуре и функциям встречающихся в свободном состоянии в организме низкомолекулярных пептидов. Короткие пептиды, содержащие до 10 аминокислот, принято называть **олигопептидами**.

Природные пептиды, наделенные биологической активностью, в зависимости от характера действия и происхождения принято делить на 4 группы: пептиды, обладающие гормональной активностью (вазопрессин, окситоцин, кортикотропин, глюкагон, кальцитонин, меланоцитстимули-

рующий гормон, рилизинг-факторы гипоталамуса и др.); пептиды, принимающие участие в процессе пищеварения (гастрин, секретин); пептиды, источник которых –  $\alpha_2$ -глобулиновая фракция сыворотки крови (ангиотензин, брадикинин, каллиддин); нейропептиды.

**Белки (полипептиды, протеины)** – это высокомолекулярные азотсодержащие органические вещества, молекулы которых построены из остатков аминокислот. Название «протеины» (от греч. «protos» – первый, важнейший) более точно отражает первостепенное биологическое значение этого класса веществ.

Белки (протеины) составляют основу структуры и функции живых организмов. В природе встречается более  $10^{10}$ – $10^{12}$  различных белков, обеспечивающих существование  $10^6$  видов живых организмов различной сложности организации начиная от вирусов и кончая человеком.

Все природные белки состоят из небольшого числа сравнительно простых структурных блоков, представленных мономерными молекулами –  $\alpha$ -аминокислотами, связанными друг с другом в полипептидные цепи.

Наиболее богаты белковыми веществами ткани и органы животных. Источником белка являются также микроорганизмы и растения. В мышцах, легких, селезенке, почках на долю белков приходится более 70–80% от сухой массы, а во всем теле животного – 45% от сухой массы.

Элементный состав белков в пересчете на сухое вещество представлен 50–54% углерода, 21–23% кислорода, 6,5–7,3% водорода, 15–17% азота и до 0,5% серы. В составе некоторых белков присутствуют в небольших количествах фосфор, железо, марганец, магний, йод и др.

Таким образом, помимо углерода, кислорода и водорода, входящих в состав почти всех органических полимерных молекул, обязательным компонентом белков является азот, в связи с чем белки принято обозначать как азотсодержащие органические вещества.

Благодаря своему многообразию белки выполняют множество самых разнообразных функций, характерных для живых организмов.

**Катализическая функция.** К настоящему времени выделено в чистом виде и идентифицировано более 3500 ферментов. Большинство из известных в настоящее время ферментов является белками (исключением являются рибозимы – ферменты нуклеотидной природы). Эта функция белков, хотя и не оказалась уникальной, однако является определяющей скоростью химических реакций в биологических системах.

**Транспортная функция.** Ряд белков выполняет функции переноса веществ от одного участка клетки к другому, или же от одного органа (клетки) к другому на уровне целого организма. Дыхательная функция крови, в частности перенос кислорода и углекислого газа, осуществляется молекулами гемоглобина – белка эритроцитов. В транспорте липидов, гормонов, токсинов, лекарственных препаратов принимают участие альбумины сыворотки крови. Ряд других сывороточных белков образует комплексы с жирами, медью, железом, тироксином, витамином А и другими соединениями, обеспечивая их доставку в соответствующие органы-мишени. Бел-

ки-каналы в клеточных мембранах обеспечивают транспорт и других ионов внутрь клетки.

**Защитная функция.** Основную функцию защиты в организме выполняет иммунная система, которая обеспечивает синтез специфических защитных белков-антител в ответ на поступление в организм бактерий, токсинов, вирусов или чужеродных белков. Высокая специфичность взаимодействия антител (иммуноглобулинов (Ig)) с антигенами (чужеродными веществами) по типу белок-белковое взаимодействие способствует узнаванию и нейтрализации биологического действия антигенов. Защитная функция белков проявляется и в способности ряда белков плазмы крови, в частности фибриногена и тромбина, к свертыванию. В результате свертывания фибриногена образуется сгусток крови, предохраняющий организм от потери крови при ранениях.

**Сократительная функция.** В акте мышечного сокращения и расслабления участвует множество белковых веществ. Однако главную роль в этих жизненно важных процессах играют актин и миозин – специфические белки мышечной ткани. Сократительная функция тубулина, белка цитоскелета, обеспечивает расхождение хромосом и хроматид в процессах митоза и мейоза.

**Структурная функция.** Белки, выполняющие структурную (опорную) функцию, занимают по количеству первое место среди других белков тела человека и животных. Среди них важнейшую роль играют фибриллярные белки, в частности коллаген в соединительной ткани, кератин в волосах, ногтях, коже, эластин в сосудистой стенке и др. Большое значение имеют комплексы белков с углеводами в формировании ряда секретов: мукоидов, муцина и т.д. В комплексе с липидами (в частности, с фосфолипидами) белки участвуют в образовании биомембран клеток.

**Гормональная (регуляторная) функция.** В организме существует класс белков, выполняющих регуляторные функции, – гормоны пептидно-белковой природы. Некоторые гормоны являются производными аминокислот (тироксин, трийодтиронин).

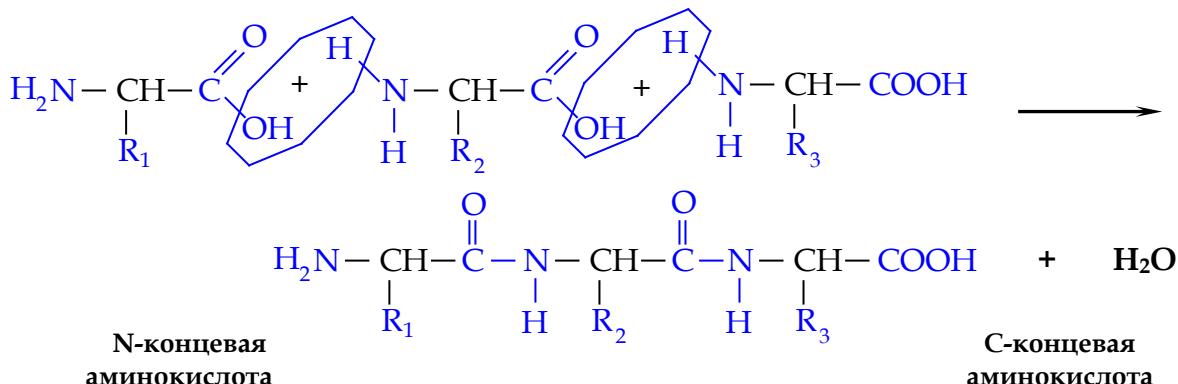
**Питательная (резервная) функция.** Эту функцию выполняют так называемые резервные белки, являющиеся источниками питания для плода, например белки яйца (овальбумины). Основной белок молока (казеин) также выполняет главным образом питательную функцию. К резервным белкам растений следует отнести проламины и глютелины.

**Рецепторная функция.** Рецепторные белки играют важную роль при передаче нервного или гормонального сигнала в клетку и ее отдельные компартменты. Рецепторы локализованы на мембранах, а механизмы передачи сигналов связаны с изменениями конформации белка, поглощением и/или выделением энергии.

**Строение белков.** Впервые А.Я. Данилевский (1888), изучая биуретовую реакцию, высказал предположение о существовании во всех белковых веществах одинаковых групп атомов и связей, аналогичных биурету  $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ . Тем самым он первый указал на связь  $-\text{NH}-\text{CO}-$

(позднее получившую название пептидной связи) как на наиболее вероятный способ соединения аминокислот в белковой молекуле.

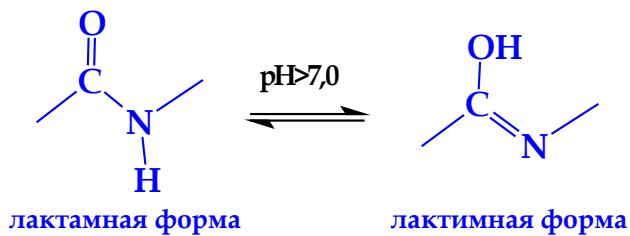
Образование пептидных связей, например, из трех разных аминокислот может быть представлено в виде следующей схемы:



Аналогичным способом образуются ди-, тетра-, пентапептиды и т.д. вплоть до крупной молекулы полипептида (белка).

Полипептидная теория строения не отрицает существования в молекуле белка и других связей, включая ковалентные (например, дисульфидные  $-S-S-$ -связи) и нековалентные (например, водородные связи и др.).

Пептидные связи играют исключительную роль как в «архитектуре», так и в функции белков. Поэтому следует указать на некоторые особенности строения полипептидной цепи. Во-первых, это своеобразие расположения атомов углерода и азота, находящихся примерно в одной плоскости, и атомов водорода и радикалов, направленных к этой плоскости под углом  $109^{\circ}28'$ . Во-вторых, это своеобразие пептидной связи: расстояние между атомами С и N в пептидной связи (равное 0,132 нм) является промежуточным между простой (ординарной) связью (связь  $-C-N-$ , равная 0,147 нм) и двойной связью (связь  $-C=N-$ , равная 0,125 нм). Это создает предпосылки для осуществления по месту двойной связи тautомерных перегруппировок и для образования енольной (лактимной) формы. Последняя в свою очередь дает молекуле белка ряд преимуществ (повышение реакционной способности, возникновение дополнительных возможностей вращения и др.):



Взаимодействуя с окружающими молекулами растворителя ( $\text{H}_2\text{O}$ ), функциональные группы (в частности,  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -группы) ионизируются, что приводит к образованию анионных и катионных центров белковой молекулы. В зависимости от соотношения ионов молекулы белка получают суммарный положительный (+) или отрицательный (-) заряд с определенным значением изоэлектрической точки (ИЭТ).

Изучение пространственной структуры белков показало наличие четырех уровней ее организации, условно названных: первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурой.

Под *первичной структурой белка* подразумеваются порядок или последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Если в состав белка входит несколько полипептидных цепей, объединенных в одну белковую молекулу посредством дисульфидных связей и нековалентных взаимодействий, или если одна полипептидная цепь содержит внутренние дисульфидные связи, то задача определения первичной структуры несколько усложняется, так как необходимо предварительное разъединение этих цепей и связей.

Расшифрованы первичные структуры миоглобина человека (153 аминокислотных остатка),  $\alpha$ -цепи (141) и  $\beta$ -цепи (146) гемоглобина человека, цитохрома С из сердечной мышцы человека (104), лизоцима молока человека (130), химотрипсиногена быка (245), рибонуклеазы (124) и многих других белков, в том числе ферментов и токсинов.

Под *вторичной структурой белка* подразумеваются конформацию полипептидной цепи, т.е. способ свертывания, скручивания (складывание, упаковка) полипептидной цепи в спиральную или какую-либо другую конформацию. Процесс этот протекает не хаотично, а в соответствии с программой, заложенной в первичной структуре белка. Подробно изучены две основные конформации полипептидных цепей, отвечающих структурным требованиям и экспериментальным данным:  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры.

Наиболее вероятным типом строения глобулярных белков принято считать  *$\alpha$ -спираль* (рисунок 2.1). Закручивание полипептидной цепи происходит по часовой стрелке (правый ход спирали), что обусловлено L-аминокислотным составом природных белков.

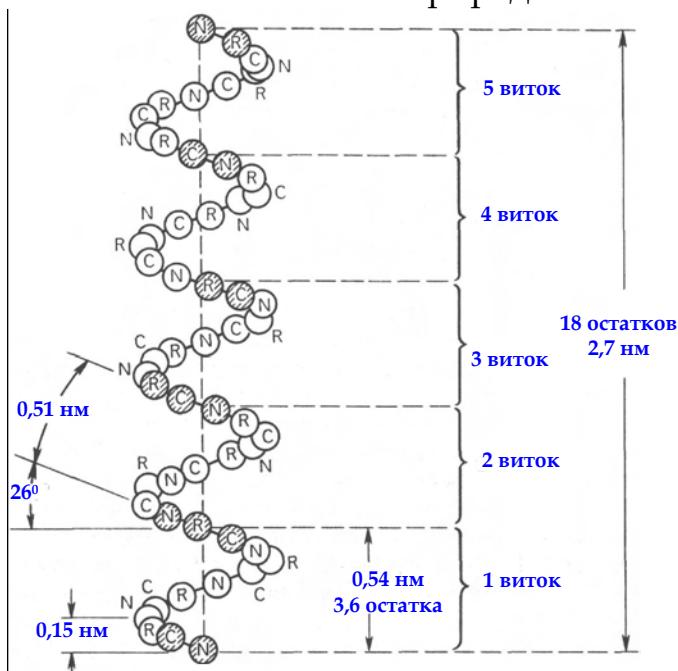


Рисунок 2.1 - Структура и параметры  $\alpha$ -спирали

Движущей силой в возникновении  $\alpha$ -спиралей (так же как и  $\beta$ -структур) является способность аминокислот к образованию водородных связей.

В структуре  $\alpha$ -спиралей открыт ряд закономерностей. На каждый виток (шаг) спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка. Шаг спирали (расстояние вдоль оси) равен 0,54 нм на виток, а на один аминокислотный остаток приходится 0,15 нм. Угол подъема спирали 26°, через 5 витков спи-

рали (18 аминокислотных остатков) структурная конфигурация полипептидной цепи повторяется. Это означает, что период повторяемости (или идентичности)  $\alpha$ -спиральной структуры составляет 2,7 нм.

Другой тип конфигурации полипептидных цепей, обнаруженный в белках волос, шелка, мышц и в других фибриллярных белках, получил название  $\beta$ -структур. В этом случае две или более линейные полипептидные цепи, расположенные параллельно или, чаще, антипараллельно, прочно связываются межцепочечными водородными связями между -NH- и -CO-группами соседних цепей, образуя структуру типа складчатого слоя (рисунок 2.2).

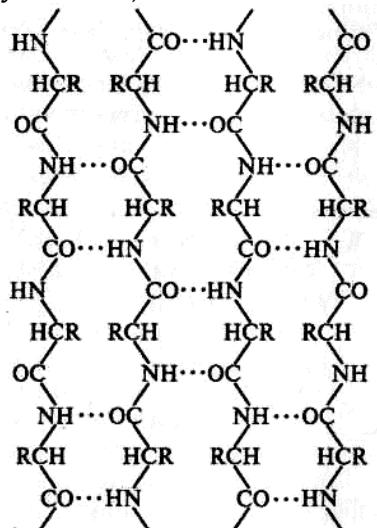


Рисунок 2.2 - Схематическое изображение  $\beta$ -структур полипептидных цепей

В природе существуют белки, строение которых, однако, не соответствует ни  $\beta$ -, ни  $\alpha$ -структуре. Типичным примером таких белков является коллаген – фибриллярный белок, составляющий основную массу соединительной ткани в организме человека и животных.

Методами рентгеноструктурного анализа в настоящее время доказано существование еще двух уровней структурной организации белковой молекулы, оказавшихся промежуточными между вторичной и третичной структурами. Это так называемые надвторичные структуры и структурные домены.

Надвторичные структуры представляют собой агрегаты полипептидных цепей, обладающих собственной вторичной структурой и образующихся в некоторых белках в результате их термодинамической или кинетической стабильности. Так, в глобулярных белках открыты ( $\beta\text{x}\beta$ )-элементы (представлены двумя параллельными  $\beta$ -цепями, связанными сегментом x),  $\beta\alpha\beta$ -элементы (представлены двумя сегментами  $\alpha$ -спирали, вставленными между тремя параллельными  $\beta$ -цепями) и др. (рисунок 2.3).

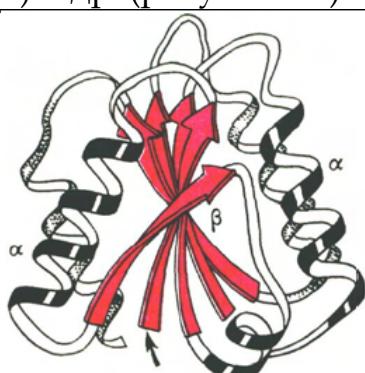


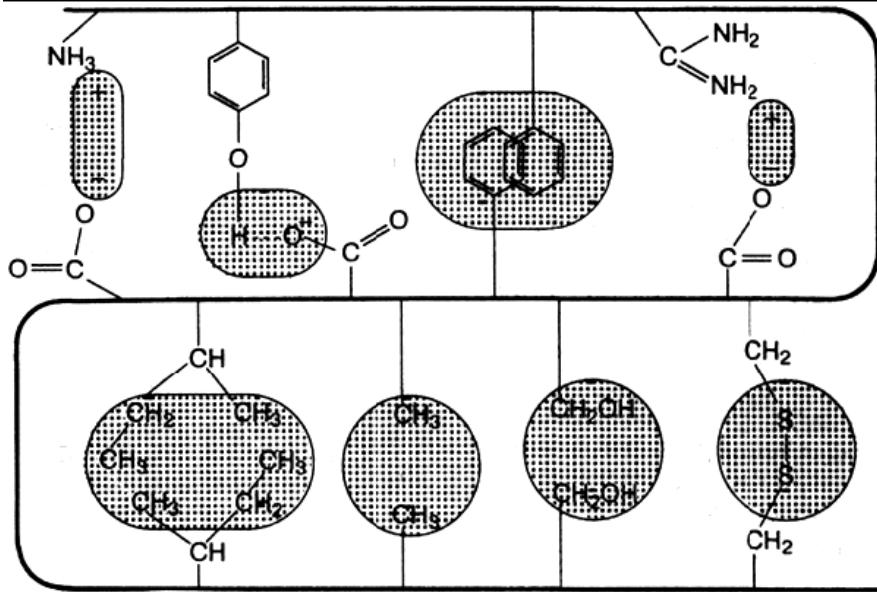
Рисунок 2.3 - Доменное строение глобулярного белка (флаводоксина) (по А. А. Болдыреву)

Домен – это компактная глобулярная структурная единица внутри полипептидной цепи. Домены могут выполнять разные функции и подвергаться складыванию (свертыванию) в независимые компактные глобулярные структурные единицы, соединенные между собой гибкими участками внутри белковой молекулы.

Под третичной структурой

**белка** подразумеваю пространственную ориентацию полипептидной спиралей или способ укладки полипептидной цепи в определенном объеме.

В настоящее время получены доказательства, что в стабилизации пространственной структуры белков, помимо ковалентных связей (пептидные и дисульфидные связи), основную роль играют так называемые нековалентные связи. К этим связям относятся водородные связи, электростатические взаимодействия заряженных групп, межмолекулярные ван-дер-ваальсовы силы, взаимодействия неполярных боковых радикалов аминокислот, так называемые гидрофобные взаимодействия и т.д. (рисунок 2.4).



а - электростатическое взаимодействие; б - водородная связь; в - гидрофобные взаимодействия неполярных групп; г - диполь-дипольные взаимодействия;  
д - дисульфидная (ковалентная) связь

**Рисунок 2.4 - Типы нековалентных связей, стабилизирующих третичную структуру белка**

Основной движущей силой в возникновении трехмерной структуры является взаимодействие радикалов аминокислот с молекулами воды, образуя гидрофильную поверхность.

В какой-то момент возникает термодинамически наиболее выгодная стабильная конформация молекулы. *Конформацией* принято называть пространственное расположение атомов в молекуле белка. Этот термин означает структурное состояние молекулы белка, которое может переходить без разрыва ковалентных связей в другое структурное состояние, вызванное, например, вращением вокруг единственной связи.

В процессе укладки синтезированной полипептидной цепи, получившем название *фолдинга* – формирование нативной пространственной структуры, в клетках происходит отбор из множества стерически возможных состояний одной-единственной стабильной и биологически активной конформации, определяемой первичной структурой.

Высшим уровнем организации белков является четвертичная структу-

ра. Под *четвертичной структурой белка* подразумевают способ укладки в пространстве отдельных полипептидных цепей, обладающих одинаковой (или разной) первичной, вторичной или третичной структурой, и формирование единого в структурном и функциональном отношении макромолекулярного образования. Каждая отдельно взятая полипептидная цепь, получившая название *протомера (мономера или субъединицы)*, чаще всего не обладает биологической активностью. Образовавшуюся молекулу принято называть *олигомером (мультимером)*. Олигомерные белки чаще построены из четного числа протомеров (от 2 до 4, реже от 6 до 8) с одинаковыми или разными молекулярными массами.

Основными силами, стабилизирующими четвертичную структуру, являются нековалентные связи между контактными площадками протомеров, которые взаимодействуют друг с другом по типу комплементарности.

**Классификация белков.** В настоящее время еще не разработана стройная система номенклатуры и классификации белков.

В соответствии с функциональным принципом различают 12 главных классов белков: 1) катализитически активные белки (ферменты); 2) белки-гормоны (хотя есть и стероидные гормоны); 3) белки-регуляторы активности генома; 4) защитные белки (антитела, белки свертывающей и антисвертывающей систем крови); 5) токсические белки; 6) транспортные белки; 7) мембранные белки; 8) сократительные белки; 9) рецепторные белки; 10) белки-ингибиторы ферментов; 11) белки вирусной оболочки; 12) белки с иными функциями.

Были предприняты также попытки классифицировать белки, исходя из особенностей вторичной и третичной структуры. В соответствии с этим различают  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\alpha+\beta$ - и  $\alpha/\beta$ -белки.  $\alpha$ -Белки содержат только  $\alpha$ -спирали (не менее 60%),  $\beta$ -белки – только  $\beta$ -структуры (не менее двух антипараллельных цепей),  $\alpha+\beta$ -белки – те и другие структуры в пределах одной полипептидной цепи (пример – молекулы лизоцима), а класс  $\alpha/\beta$ -белков содержит множество  $\alpha$ - и  $\beta$ -структур, чередующихся вдоль полипептидной цепи или домена (см. рисунок 2.3).

Согласно иной классификации, обширный класс белковых веществ разделяют в зависимости от их химического состава и делят на: простые и сложные белки.

**Простые белки** построены из остатков аминокислот и при гидролизе распадаются соответственно только на свободные аминокислоты.

**Сложные белки** – это двухкомпонентные белки, которые состоят из какого-либо простого белка и небелкового компонента, называемого *простетической группой*. При гидролизе сложных белков, помимо свободных аминокислот, освобождается небелковая часть или продукты ее распада.

Простые белки в свою очередь делятся на основании некоторых условно выбранных критериев на ряд подгрупп: протамины, гистоны, альбумины, глобулины, проламины и др. Классификация сложных белков основана на химической природе входящего в их состав небелкового компонента. В

соответствии с этим различают фосфопротеины (содержат фосфорную кислоту), хромопротеины (в состав их входят пигменты), нуклеопротеины (содержат нуклеиновые кислоты), гликопротеины (содержат углеводы), липопротеины (содержат липиды) и металлопротеины (содержат металлы).

**Физико-химические свойства белков.** Наиболее характерными физико-химическими свойствами белков являются высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое и высокое онкотическое давление, способность к поглощению УФ-лучей при 280 нм (это свойство, обусловленное наличием в белках ароматических аминокислот).

**Заряд белков.** Белки, как и аминокислоты, амфотерны благодаря наличию свободных NH<sub>2</sub>- и COOH-групп. Для них характерны все свойства кислот и оснований.

В зависимости от реакции среды и соотношения кислых и основных аминокислот белки в растворе несут или отрицательный, или положительный заряд, перемещаясь к аноду или катоду.

Основной вклад в формирование кислотно-основных свойств вносят заряженные радикалы аминокислотных остатков, расположенные на поверхности глобуллы. Основные свойства связаны с такими аминокислотами как лизин, аргинин, гистидин; кислые – аспарагиновой и глутаминовой кислотами.

**Растворимость белков.** Белки обладают ярко выраженными гидрофильными свойствами. Растворимость белков зависит от pH, а также от ионной силы раствора.

Растворы белков имеют очень низкое осмотическое давление, высокую вязкость и незначительную способность к диффузии. Белки способны к набуханию в очень больших пределах. С коллоидным состоянием белков связан ряд характерных свойств, а, в частности, явление светорассеяния (эффект Тендаля). Молекулы белка не способны проникать через полупроницаемые искусственные мембранны (целлофан, пергамент, колloidий), а также биомембранны растительных и животных тканей. Вместе с тем белки не являются истинными коллоидами, так как они способны образовывать молекулярные растворы.

**Молекулярная масса белков.** Белки относятся к высокомолекулярным соединениям, в состав которых входят сотни и тысячи аминокислотных остатков, объединенных в макромолекулярную структуру. Молекулярная масса белков колеблется от 6000 до 1000000 и выше.

Молекулярная масса сложных белков определяется кроме белковой части и составом небелкового компонента, а для олигомерных белков – молекулярной массой белковых субъединиц (протомеров) и их количеством в составе комплекса.

**Форма белковых молекул.** Белки по их форме разделяют на глобулярные (шарообразные) и фибриллярные (нитевидные). Форма молекул глобулярных белков динамична и под влиянием pH, температуры или ионной

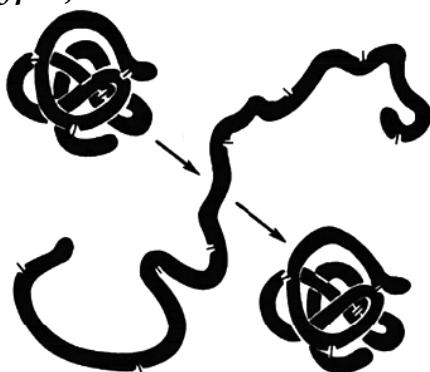
силы раствора может меняться. Глобулярные белки (например, гемоглобин, альбумины и глобулины) являются асимметричными в указанных измерениях.

**Денатурация белков.** Под *денатурацией* понимают нарушение пространственной структуры нативной молекулы белка (преимущественно третичной), приводящее к потере характерных для нее свойств (растворимость, электрофоретическая подвижность, биологическая активность и т.д.).

Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости (особенно в изоэлектрической точке), повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных SH-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря белком его биологической активности (катализической, антигенной или гормональной). При денатурации белка разрушаются в основном нековалентные связи (в частности, гидрофобные взаимодействия и водородные связи), в то время как пептидные связи остова полипептидной цепи не затрагиваются. В этих условиях развертываются глобулы нативных белковых молекул и образуются случайные и беспорядочные структуры.

Денатурирующие агенты делятся на химические и физические. Химические агенты – это органические растворители (ацетон, хлороформ, спирт), концентрированные кислоты, щелочи, ионы тяжелых металлов. В лабораторных условиях в качестве денатурирующих агентов используются мочевина или гуанидинхлорид, легко разрывающие водородные связи третичной структуры белка. К физическим факторам, вызывающим денатурацию относятся температурное воздействие (замораживание или нагревание), давление, ультразвук, облучение и др.

При непродолжительном действии и быстром удалении денатурирующих агентов возможна ренатурация белка с полным восстановлением исходной трехмерной структуры и нативных свойств его молекулы (рисунок 2.5), включая биологическую активность. Такое явление получило название **ренатурации**.



чертежами обозначены нековалентные связи  
в структуре глобулы

**Рисунок 2.5 – Схематическое изображение процесса денатурации и ренатурации белковой глобулы**

**Изоэлектрическая точка белков.** При определенном значении pH раствора суммарный заряд белков, обладающих амфотерными свойствами, равен нулю. В таком состоянии белки не перемещаются в электрическом поле. Это значение pH носит название *изоэлектрической точки (ИЭТ)* и обозначается как  $pI$ . ИЭТ является характерной константой всех белков.

ИЭТ большинства белков жи-

вотных тканей лежит в пределах значений рН от 5,5 до 7,0, что свидетельствует о частичном преобладании кислых аминокислот. Однако в природе имеются исключения – белки, у которых значения ИЭТ лежат в крайних значениях рН среды. В частности, величина ИЭТ пепсина (фермент желудочного сока) составляет 1,4, а сальмина (основной белок из молоки семги) – почти 12.

В изоэлектрической точке белки наименее устойчивы в растворе, имеют наиболее тонкую гидратную оболочку и легко выпадают в осадок. ИЭТ белка в сильной степени зависит от присутствия в растворе ионов солей; в то же время на ее величину не влияет концентрация белка.

Если в белковом растворе нет никаких ионов, кроме ионизированных аминокислотных остатков, то такие растворы называются *изоионными*. Изоионная точка как и ИЭТ является константой белков.

## 2.2. ФЕРМЕНТЫ

### 2.2.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

**Ферменты, или энзимы**, представляют собой высокоспециализированный класс веществ белковой природы, используемый живыми организмами для осуществления с высокой скоростью многих тысяч взаимосвязанных химических реакций. Учение о ферментах выделено в самостоятельную науку – **энзимологию**.

От неорганических катализаторов ферменты отличаются рядом характерных особенностей. Прежде всего, ферменты чрезвычайно эффективны и проявляют в миллионы и миллиарды раз более высокую катализическую активность в условиях умеренной температуры (температура тела), нормального давления и в области близких к нейтральным значениям рН среды.

Ферменты отличаются высокой специфичностью действия в отношении как химической природы субстрата, так и типа катализируемой реакции. Особенностью ферментов является также то, что их активность в клетках строго контролируется как на генетическом уровне, так и посредством определенных низкомолекулярных соединений, в частности субстратов и продуктов катализируемых реакций, ингибиторов, активаторов и др.

Ферменты, как и все белки, обладают рядом свойств, характерных для высокомолекулярных соединений: амфотерностью; электрофоретической подвижностью, а в изоэлектрической точке не обнаруживают подвижности в электрическом поле. Ферменты неспособны к диализу через полупроницаемые мембранны. Как и белки, они легко осаждаются из водных растворов при низких температурах методами высоливания или осторожным добавлением ацетона, этанола и других веществ и при этом не теряют своих катализических свойств.

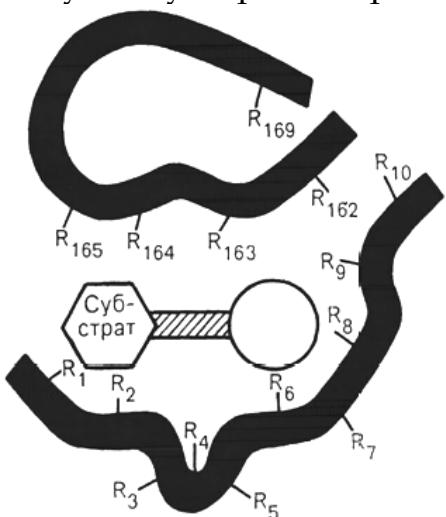
Подобно белкам, ферменты имеют большую молекулярную массу – от десятков тысяч до нескольких миллионов.

В природе существуют как простые, так и сложные ферменты. Первые целиком представлены полипептидными цепями и при гидролизе распадаются исключительно на аминокислоты. Такими ферментами (простые белки) являются гидролитические ферменты, в частности пепсин, трипсин, папаин, уреаза, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза и др. Большинство природных ферментов относится к классу сложных белков, содержащих, помимо полипептидных цепей, какой-либо небелковый компонент (**кофактор**), присутствие которого является абсолютно необходимым для катализической активности. Кофакторы могут иметь различную химическую природу и различаться по прочности связи с полипептидной цепью. Если константа диссоциации сложного фермента настолько мала, что в растворе все полипептидные цепи оказываются связанными со своими кофакторами и не разделяются при выделении и очистке, то такой фермент получает

название **холофермента** (**холоэнзим**), а кофактор – **простетической группы**, рассматривающейся как интегральная часть молекулы фермента. Полипептидную часть фермента принято называть **апоферментом**. Под **коферментом** часто подразумевают дополнительную группу, легко отделяемую от апофермента при диссоциации.

Кофактор, который непосредственно не участвует в акте катализа, не является коэнзимом. В то же время простетическую группу можно назвать коферментом, если она непосредственно участвует в энзиматической реакции. Простетическая группа, которая не вовлечена в акт катализа, но функционально является существенным как для фермента, так и для некаталитического белка, может быть названа кофактором. Наконец, кофактор и кофермент, непрочно связанные (или слабо связанные) с ферментом или белком, тем не менее не классифицируются в качестве простетических групп.

Поскольку участвующие в ферментативных реакциях молекулы субстратов часто имеют небольшие размеры по сравнению с молекулами ферментов, было высказано предположение, что при образовании фермент-субстратных комплексов в непосредственный контакт с молекулой субстрата, вступает ограниченная часть аминокислот пептидной цепи. Отсюда возникло представление об активном центре фермента. Под **активным центром** подразумевают уникальную комбинацию аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающую непосредственное связывание ее с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа (рисунок 2.6).



Темные полосы - участки полипептидной цепи фермента; R - аминокислотные остатки и их порядковые номера (с N-конца)

**Рисунок 2.6 - Схематическое изображение активного центра фермента (по Малеру и Кордесу)**

**аллостерический центр** (или центры) (от греч. *allos* – другой, иной и *st eros* – пространственный, структурный), представляющий собой участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные, вещества (эффекторы, или модификаторы), молекулы которых отличаются

Установлено, что у сложных ферментов в состав активного центра входят также простетические группы.

В активном центре условно различают так называемый **катализический центр**, непосредственно вступающий в химическое взаимодействие с субстратом, и **связывающий центр**, или контактную («якорную») площадку, которая обеспечивает специфическое средство к субстрату и формирование его комплекса с ферментом.

Помимо активного центра, в молекуле фермента может присутствовать также **аллостерический центр** (или центры) (от греч. *allos* – другой, иной и *st eros* – пространственный, структурный), представляющий собой участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные, вещества (эффекторы, или модификаторы), молекулы которых отличаются

по структуре от субстратов. Присоединение эффектора к аллостерическому центру изменяет третичную и часто также четвертичную структуру молекулы фермента и соответственно конфигурацию активного центра, вызывая снижение или повышение энзиматической активности. Ферменты, активность каталитического центра которых подвергается изменению под влиянием аллостерических эффекторов, связывающихся с аллостерическим центром, получили название *аллостерических ферментов*.

Отличительной особенностью ряда аллостерических ферментов является наличие в молекуле олигомерного фермента нескольких активных центров и нескольких аллостерических регуляторных центров, пространственно удаленных друг от друга. В аллостерическом ферменте каждый протомер содержит один активный центр, связывающий субстрат, и один аллостерический центр, связывающий эффектор. Получены доказательства, что для субстрата аллостерические ферменты, помимо активного центра, содержат и так называемые *эффекторные центры*; при связывании с эффекторным центром субстрат не подвергается каталитическому превращению, однако он влияет на каталитическую эффективность активного центра. Подобные взаимодействия между центрами, связывающими лиганды одного типа, принято называть *гомотропными взаимодействиями*, а взаимодействия между центрами, связывающими лиганды разных типов – *гетеротропными взаимодействиями*.

В энзиматическом катализе, как и в реакции связывания субстрата, участвует не ограниченная и небольшая часть фермента, как предполагалось ранее, а значительно большая часть молекулы белка-фермента. Этими обстоятельствами, вероятнее всего, можно объяснить большие размеры и объемность трехмерной структуры молекулы фермента. Эти же обстоятельства следует учитывать в программах создания искусственных низкомолекулярных аналогов ферментов (*синзимов*), обладающих свойствами нативных ферментов.

*Изоферменты (изоэнзимы)* – это группы или семейства ферментов, которые катализируют одну и ту же реакцию, обладают одним и тем же типом субстратной специфичности, но отличаются друг от друга по аминокислотному составу, первичной структуре белка, молекулярной массе, а также по некоторым физико-химическим свойствам (электрофоретической подвижности, оптимуму pH, термостабильности, сродству к субстрату, чувствительности к ингибитору).

Изоферменты являются олигомерными белками, построенными из нескольких протомеров. Между собой изоферменты различаются на уровне четвертичной структуры. К энзимам, имеющим несколько молекулярных форм, относятся лактатдегидрогеназа (ЛДГ), креатинфосфокиназа (КФК), альдолаза, малатдегидрогеназа, холинэстераза и мн. др. Например, КФК является димером и имеет три изофермента: КФК<sub>1</sub> (ВВ) – изофермент, характерный для мозга; КФК<sub>2</sub> (МВ) – для миокарда; КФК<sub>3</sub> (ММ) – для скелетной мышцы.

*Мультимолекулярные ферментные системы (мультиферменты)*

включают несколько ферментов, каждый из которых катализирует отдельную стадию многостадийного процесса в организме. Пространственное объединение нескольких последовательных реакций в мультиферментном комплексе имеет ряд преимуществ по сравнению с катализом отдельными ферментами: предотвращаются конкурентные реакции; последовательные реакции согласованы; промежуточные продукты не выделяются в цитоплазму; реакция протекает эффективно благодаря высокой концентрации субстрата при незначительных потерях за счет диффузии.

Примером мультиферментной системы является пируватдегидрогеназный комплекс, катализирующий превращение пирувата в ацетил-КоА. Он включает три фермента (пируватдегидрогеназу, дигидролипоилацетилтрансферазу, дигидролипоилдегидрогеназу) и пять коферментов (тиаминпирофосфат, амид липоевой кислоты, НС-КоА, ФАД<sup>+</sup>, НАД<sup>+</sup>).

**Классификация ферментов.** Современные классификация и номенклатура ферментов были разработаны Комиссией по ферментам Международного биохимического союза и утверждены на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 г. в Москве. Комиссией были рассмотрены 3 принципа, которые могли служить основой для классификации ферментов и их обозначения.

Первый принцип – химическая природа фермента, т.е. принадлежность к флавопротеинам, пиридоксальфосфатпротеинам, гемопротеинам, металлопротеинам и т. д. Однако этот принцип не мог служить общей основой для классификации, так как только лишь для небольшого числа ферментов известны простетические группы, доступные идентификации и прямому определению.

Второй принцип – химическая природа субстрата, на который действует фермент. По этому принципу трудно классифицировать фермент, так как в качестве субстрата могут служить разнообразные соединения внутри определенного класса веществ (белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты) и огромное количество промежуточных продуктов обмена.

В основу принятой классификации положен третий принцип – тип катализируемой реакции, который является специфичным для действия любого фермента.

Таким образом, тип катализируемой химической реакции в сочетании с названием субстрата (субстратов) служит основой для систематического наименования ферментов. Согласно Международной классификации, ферменты делят на шесть главных классов, в каждом из которых несколько подклассов: 1) оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидrolазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы (синтетазы) (таблица 2.2).

**Оксидоредуктазы.** К классу оксидоредуктаз относят ферменты, катализирующие с участием двух субстратов окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Систематические названия их составляют по форме «донор: акцептор оксидоредуктаза». Например, лактат: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза для лактатдегидрогеназы.

**Таблица 2.2 – Основные классы ферментов и типы катализируемых ими реакций**

Класс ферментов	Тип катализируемой реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции всех типов
Трансферазы	Перенос отдельных атомов или групп атомов от донора к акцептору
Гидролазы	Гидролитическое расщепление химических связей
Лиазы	Негидролитическое расщепление двойных связей или их образование
Изомеразы	Реакции взаимопревращения изомеров
Лигазы (синтетазы)	Соединение двух молекул и образование связей C–C, C–O, C–S и C–N, сопряженных с разрывом пи-рофосфатной связи АТФ

Различают следующие основные оксидоредуктазы: аэробные дегидрогеназы или оксидазы, катализирующие перенос протонов (электронов) непосредственно на кислород; анаэробные дегидрогеназы, ускоряющие перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород; цитохромы, катализирующие перенос только электронов. К этому классу относят также гемсодержащие ферменты каталазу и пероксидазу, катализирующие реакции с участием перекиси водорода.

**Трансферазы.** К классу трансфераз относят ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса различных атомов, групп атомов и радикалов. Наименование их составляется по форме «донор: транспортируемая группа – трансфераза».

Различают трансферазы, катализирующие перенос одноуглеродных, ацильных, гликозильных, альдегидных или кетонных, нуклеотидных остатков, азотистых групп, остатков фосфорной и серной кислот и др.

Например: метил- и формилтрансферазы, ацетилтрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы и др.

**Гидролазы.** В класс гидролаз входит большая группа ферментов, катализирующих расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекулы воды. Наименование их составляют по форме «субстрат-гидролаза». К ним относятся: эстеразы – ферменты, катализирующие реакции гидролиза и синтеза сложных эфиров; гликозидазы, ускоряющие разрыв гликозидных связей; фосфатазы и пептидгидролазы, катализирующие гидролиз фосфоангидридных и пептидных связей; амидазы, ускоряющие разрыв амидных связей, отличных от пептидных, и др.

**Лиазы.** К классу лиаз относят ферменты, катализирующие разрыв связей C–O, C–C, C–N и других, а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов не гидролитическим путем. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту разрыва двойной связи. Ферменты обозначают термином «субстрат-

лиазы». Например, фумарат-гидратаза (систематическое название «L-малат-гидролаза») катализирует обратимое отщепление молекулы воды от яблочной кислоты с образованием фумаровой кислоты. В эту же группу входят декарбоксилазы (карбокси-лиазы), амидин-лиазы и др.

**Изомеразы.** К классу изомераз относят ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических и геометрических изомеров. Систематическое название их составляют с учетом типа реакции: «субстрат – цис-транс-изомераза». Если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, фермент получает название «мутаза».

К этому же классу относят рацемазы и эпимеразы, действующие на амино- и оксикислоты, углеводы и их производные; внутримолекулярные оксидоредуктазы, катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз; внутримолекулярные трансферазы, переносящие ацильные, фосфорильные и другие группы, и т.д.

**Лигазы (синтетазы).** К классу лигаз относят ферменты, катализирующие синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ (или другого нуклеозидтрифосфата). Систематическое название их составляют по форме «Х : У лигаза», где Х и У обозначают исходные вещества (например, L-глутамат: аммиак лигаза или глутаминсингтаза, катализирующая синтез глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака в присутствии АТФ).

Код каждого ферmenta содержит четыре цифры, разделенные точками, и составляется по определенному принципу. Первая цифра указывает номер одного из шести главных классов ферментов. Вторая цифра означает подкласс, характеризующий основные виды субстратов, участвующих в данном типе химических превращений. Например, у трансфераз вторая цифра указывает на природу той группы, которая подвергается переносу, у гидролаз – на тип гидролизуемой связи и т.д. Эти подклассы в свою очередь делятся на более частные подгруппы (подподклассы), отличающиеся природой химических соединений доноров или акцепторов, участвующих в данной подгруппе реакций. Номер (цифру) подподкласса ставят на 3-е место в шифре ферmenta. У гидролаз, например, эта цифра уточняет тип гидролизуемой связи, а у лиаз – тип отщепляемой группы и т.д. Первые 3 цифры кода точно определяют тип ферmenta. Наконец, все ферменты, относящиеся к данному подподклассу, получают порядковый номер в алфавитном порядке, который ставят на 4-е место в шифре.

**Свойства ферментов.** К ферментам применимы три основных критерия, характерных и для неорганических катализаторов. Во-первых, они остаются неизмененными после реакции, т.е. освобождаясь, могут вновь реагировать с новыми молекулами субстрата. Во-вторых, ферменты способны оказывать действие в очень малых концентрациях. И, наконец, наличие либо отсутствие ферmenta или любого другого катализатора не оказывает влияния на величину константы равновесия и свободной энергии ( $\Delta G$ ). Катализаторы лишь повышают скорость, с которой система приближается к термодинамическому равновесию, не сдвигая точки равновесия. Химиче-

ские реакции с высокой константой равновесия и отрицательной величиной  $\Delta G$  принято называть *экзергоническими*. Реакции с низкой константой равновесия и соответственно положительной величиной  $\Delta G$  (они обычно не протекают спонтанно) называются *эндергоническими*. Для начала и завершения этих реакций необходим приток энергии извне.

Поскольку ферменты являются макромолекулами белковой природы, важное значение для их функций имеет первичная структура, определяющая тип катализируемых реакций. Для проявления каталитического действия большое значение имеет также нативность высших белковых структур. Обратимая денатурация является фактором подавления или восстановления ферментативной активности. Молекулярные массы ферментов лежат в пределах от 10 до 1000 кДа и более.

**Специфичность действия.** Способность того или иного фермента катализировать превращение определенного вещества (субстрата) зависит от природы как фермента, так и субстрата. Высокая *стереоспецифичность* ряда ферментов обусловлена комплементарным присоединением субстрата к ферменту в процессе каталитической реакции. Это особенно ярко проявляется в процессе реакций, характерных для L- или D-форм субстрата.

Кроме стереохимической, выделяют абсолютную и относительную специфичность действия ферментов.

Фермент, обладающий *абсолютной субстратной специфичностью*, имеет лишь один субстрат и катализирует его превращение (например, реакция образования мочевины при участии фермента аргиназы).

На скорость ферментативной реакции влияет не только природа атакуемой связи, но и ее окружение, а также длина углеродной цепи субстрата. Это особенно характерно для ферментов, проявляющих относительную, или групповую, специфичность.

Фермент, обладающий *групповой специфичностью*, может катализировать один и тот же тип реакции с разными субстратами. Ферменты класса гидролаз обладают групповой субстратной специфичностью. Так, например, протеазы осуществляют гидролиз пептидных связей в белках (пепсин, трипсин), липазы — гидролиз сложноэфирных связей в липидах (фосфолипазы), гликозидазы — гидролиз гликозидных связей в углеводах.

**Термолабильность ферментов.** Скорость химических реакций зависит от температуры, поэтому катализируемые ферментами реакции также чувствительны к изменениям температуры. Установлено, что скорость большинства биохимических реакций повышается в 2 раза при повышении температуры на 10 °C и, наоборот, снижается в 2 раза при понижении температуры на 10°C. Этот показатель получил название *температурного коэффициента*. Вследствие белковой природы фермента тепловая денатурация при повышении температуры будет снижать эффективную концентрацию фермента с соответствующим снижением скорости реакции. Так, при температуре, не превышающей 45–50 °C, скорость реакции увеличивается согласно теории химической кинетики. При температуре выше 50 °C на скорость реакции большое влияние начинает оказывать тепловая дена-

турация белка-фермента, приводящая к полному прекращению ферментативного процесса (рисунок 2.7).



Рисунок 2.7 - Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

При температуре 100 °C почти все ферменты утрачивают свою активность (исключение составляет миокиназа, которая выдерживает нагревание до 100 °C). При низких температурах (0 °C и ниже) ферменты, как правило, не разрушаются, однако активность их падает почти до нуля.

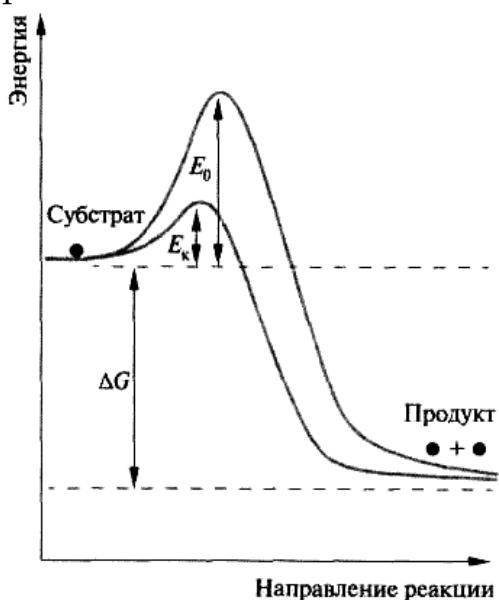
**Зависимость активности ферментов от pH среды.** Ферменты обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей в основном выработанным в процессе эволюции физиологическим значениям pH среды 6,0–8,0. При графическом изображении на кривой колоколообразной формы имеется определенная точка, в которой фермент проявляет максимальную активность. Эту точку называют оптимумом pH среды для действия данного фермента.

Согласно современным представлениям, влияние изменений pH среды на молекулу фермента заключается в воздействии на состояние и степень ионизации кислотных и основных групп (в частности, COOH-группы дикарбоновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гистидина, NH<sub>2</sub>-группы лизина и др.). При резких сдвигах от оптимума pH среды ферменты могут подвергаться конформационным изменениям, приводящим к потере активности вследствие денатурации или изменения заряда молекулы фермента, ионизации или деионизации активного центра, что сказывается на третичной структуре белка и соответственно на формировании активного фермент-субстратного комплекса.

## 2.2.2. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Любая каталитическая реакция предполагает изменение скоростей как прямой, так и обратной реакции за счет снижения ее энергетики. Если химическая реакция протекает с выделением энергии, то она должна начинаться спонтанно. Однако этого не происходит, потому что компоненты

реакции должны быть переведены в активированное (переходное) состояние. Энергия, необходимая для перевода реагирующих молекул в активированное состояние, называется *энергией активации*. Переходное состояние характеризуется непрерывным образованием и разрывом химических связей, причем между переходным и основным состояниями существует термодинамическое равновесие. Скорость прямой реакции зависит от температуры и разности значений свободной энергии для субстрата в переходном и основном состояниях. Эта разность называется *свободной энергией* реакции.



Е<sub>о</sub>, Е<sub>к</sub> – энергия активации реакции без и в присутствии катализатора; ΔG – разность свободной энергии реакции

**Рисунок 2.8 - Основное и переходное состояния реагирующих веществ**

несколько более низких барьеров, преодолеть которые реагирующие молекулы могут гораздо быстрее, чем основной.

Механизм ферментативной реакции можно представить следующим образом:

- 1) соединение фермента (Е) и субстрата (S) с образованием нестабильного фермент-субстратного комплекса (ES):  $E + S \rightarrow E-S$ ;
- 2) образование активированного переходного состояния:  $E-S \rightarrow (ES)^*$ ;
- 3) высвобождение продуктов реакции (P) и регенерация фермента (Е):  $(ES)^* \rightarrow P + E$ .

Для объяснения высокой эффективности действия энзимов было предложено несколько теорий механизма ферментативного катализа. Наиболее ранней является *теория Э. Фишера* (теория «шаблона» или «жесткой матрицы»). Согласно этой теории фермент является жесткой структурой, активный центр которой представляет собой «слепок» субстрата. Если субстрат подойдет к активному центру фермента как «ключ к замку», то произойдет химическая реакция. Эта теория хорошо объясняет два

Достижение переходного состояния субстрата возможно двумя путями: за счет передачи реагирующими молекулам избыточной энергии (например, за счет увеличения температуры) или снижения энергии активации соответствующей химической реакции (рисунок 2.8).

Ферменты «помогают» субстратам принять переходное состояние за счет энергии связывания при образовании фермент-субстратного комплекса. Снижение энергии активации при ферментативном катализе обусловлено увеличением числа стадий химического процесса. Индуцирование ряда промежуточных реакций приводит к тому, что исходный активационный барьер дробится на не-

типа субстратной специфичности ферментов – абсолютную и стереоспецифичность, но оказывается несостоятельной при объяснении групповой (относительной) специфичности ферментов.

**Теория «дыбы»** основана на представлениях Г. К. Эйлера, изучавшего действие гидролитических ферментов. По этой теории фермент связывает с молекулой субстрата в двух точках, при этом происходит растяжение химической связи, перераспределение электронной плотности и разрыв химической связи, сопровождающийся присоединением воды. Субстрат до присоединения к ферменту имеет «расслабленную» конформацию. После связывания с активным центром молекула субстрата подвергается растяжению и деформации (располагается в активном центре как на дыбе). Чем больше длина химических связей в субстрате, тем легче они разрушаются и тем меньше энергия активации химической реакции.

В последнее время нашла широкое распространение **теория «индуцированного соответствия»** Д. Кошланда, которая допускает высокую конформационную лабильность молекулы фермента, гибкость и подвижность активного центра. Субстрат индуцирует конформационные изменения молекулы фермента таким образом, что активный центр принимает необходимую для связывания субстрата пространственную ориентацию, т. е. субстрат подходит к активному центру как «рука к перчатке».

Согласно теории индуцированного соответствия механизм взаимодействия фермента и субстрата следующий:

1. фермент по принципу комплементарности распознает и «ловит» молекулу субстрата. В этом процессе белковой молекуле помогает тепловое движение ее атомов;
2. аминокислотные остатки активного центра смещаются и подстраиваются по отношению к субстрату;
3. химические группировки ковалентно присоединяются в активном центре - **ковалентный катализ**.

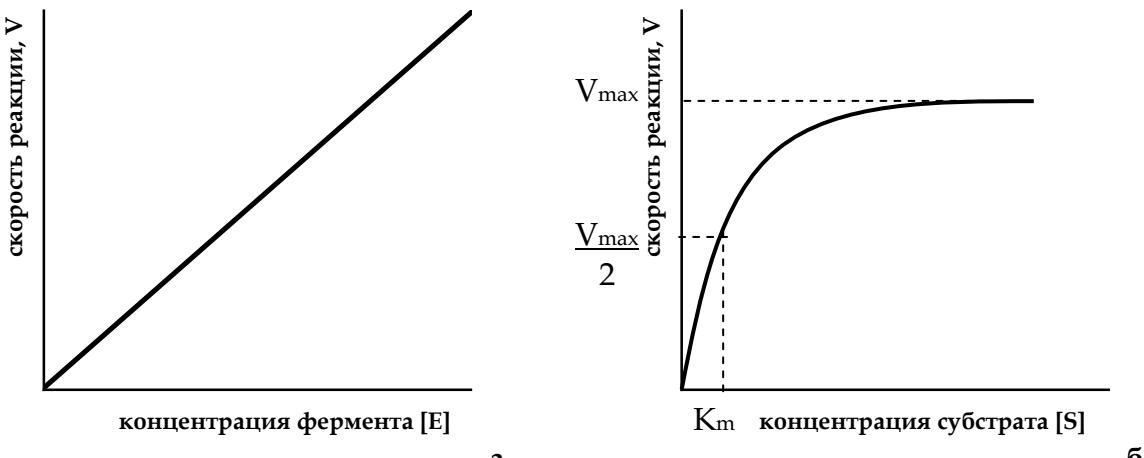
**Кинетика ферментативных реакций.** Кинетика изучает скорости, механизмы реакций и влияние на них таких факторов, как концентрации ферментов и субстратов, температура, pH среды, присутствие ингибиторов или активаторов.

При постоянной концентрации субстрата скорость реакции прямо пропорциональна концентрации фермента (рисунок 2.9, а). График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата имеет вид равнобочной гиперболы (рисунок 2.9, б).

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса – Ментен:

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]},$$

где  $V$  – стационарная скорость биохимической реакции;  $V_{\max}$  – максимальная скорость;  $K_m$  – константа Михаэлиса;  $[S]$  – концентрация субстрата.



**Рисунок 2.9 - Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента (а) и субстрата (б)**

Если концентрация субстрата низкая, т. е.  $[S] \ll K_m$ , то  $[S]$  в знаменателе можно пренебречь.

$$\text{Тогда } V = \frac{V_{\max}}{K_m} [S].$$

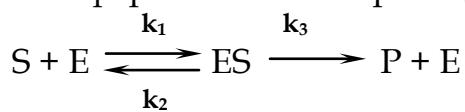
Таким образом, при низких концентрациях субстрата скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата и описывается уравнением первого порядка. Это соответствует начальному прямолинейному участку кривой  $V = f[S]$  (рисунок 2.9, б).

При высоких концентрациях субстрата  $[S] \gg K_m$ , когда  $K_m$  можно пренебречь, уравнение Михаэлиса – Ментен приобретает вид

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}, \text{ т.е. } V = V_{\max}.$$

Таким образом, при высоких концентрациях субстрата скорость реакции становится максимальной и описывается уравнением нулевого порядка. Это соответствует участку кривой  $V = f[S]$ , параллельному оси абсцисс.

При концентрациях субстрата, численно сравнимых с константой Михаэлиса, скорость реакции возрастает постепенно. Это вполне согласуется с представлениями о механизме ферментативной реакции:



где  $S$  – субстрат;  $E$  – фермент;  $ES$  – фермент-субстратный комплекс;  $P$  – продукт;  $k_1$  – константа скорости образования фермент-субстратного комплекса;  $k_2$  – константа скорости распада фермент-субстратного комплекса с образованием исходных реагентов;  $k_3$  – константа скорости распада фермент-субстратного комплекса с образованием продукта.

Скорость превращения субстрата с образованием продукта ( $P$ ) пропорциональна концентрации фермент-субстратного комплекса  $[ES]$ . При малых концентрациях субстрата в растворе имеется некоторое число свободных молекул фермента ( $E$ ), не связанных в комплекс ( $ES$ ). Поэтому при

увеличении концентрации субстрата концентрация комплексов растет, следовательно, растет и скорость образования продукта. При больших концентрациях субстрата все молекулы фермента связаны в комплекс ES (явление насыщения фермента), поэтому дальнейшее повышение концентрации субстрата практически не увеличивает концентрацию комплексов и скорость образования продукта остается постоянной.

Таким образом, становится ясен физический смысл *максимальной скорости ферментативной реакции*.  $V_{max}$  – это скорость, с которой реагирует фермент, полностью существующий в виде фермент-субстратного комплекса.

*Константа Михаэлиса* численно соответствует такой концентрации субстрата, при которой стационарная скорость равна половине максимальной (см. рисунок 2.9, б). Данная константа характеризует константу диссоциации фермент-субстратного комплекса:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}.$$

Физический смысл константы Михаэлиса в том, что она характеризует сродство фермента к субстрату.  $K_m$  имеет малые значения, когда  $k_1 > (k_2 + k_3)$ , т.е. процесс образования комплекса ES преобладает над процессами диссоциации ES. Следовательно, чем меньше значения  $K_m$ , тем сродство фермента к субстрату больше. И, наоборот, если  $K_m$  имеет большое значение, то  $(k_2 + k_3) > k_1$  и процессы диссоциации ES преобладают. В этом случае сродство фермента к субстрату небольшое.

**Ингибиторы и активаторы ферментов.** *Ингибиторами* ферментов называются вещества, снижающие активность ферментов. Любые денатурирующие агенты (например, соли тяжелых металлов, кислоты) являются неспецифическими ингибиторами ферментов.

*Обратимые ингибиторы* – это соединения, которые нековалентно взаимодействуют с ферментом. *Необратимые ингибиторы* – это соединения, специфически связывающие функциональные группы активного центра и образующие ковалентные связи с ферментом.

Обратимое ингибирование разделяют на конкурентное и неконкурентное. *Конкурентное ингибирование* предполагает структурное сходство ингибитора и субстрата. Ингибитор занимает место в активном центре фермента, и значительное количество молекул фермента оказывается блокировано. Конкурентное ингибирование можно снять, если повысить концентрацию субстрата. В этом случае субстрат вытесняет конкурентный ингибитор из активного центра.

Обратимое ингибирование может быть *неконкурентным* в отношении субстрата. В этом случае ингибитор не конкурирует за место присоединения к ферменту. Субстрат и ингибитор связываются с разными центрами, поэтому появляется возможность образования комплекса IE, а также и тройного комплекса IES, который может распадаться с освобождением продукта, но с меньшей скоростью, чем комплекс ES.

По характеру своего действия ингибиторы подразделяются на специфические и неспецифические.

*Специфические ингибиторы* оказывают свое действие на фермент, присоединяясь ковалентной связью в активном центре фермента и выключая его из сферы действия.

*Неспецифическое ингибирование* предполагает воздействие на фермент денатурирующих агентов (солей тяжелых металлов, мочевины и др.). В этом случае в результате разрушения четвертичной и третичной структуры белка происходит потеря биологической активности фермента.

*Активаторы ферментов* – это вещества, увеличивающие скорость ферментативной реакции. Чаще всего в качестве активаторов выступают ионы металлов ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и т.д.). Различают металлы, находящиеся в составе металлоферментов, являющиеся кофакторами, и выступающие в качестве активаторов ферментов. Кофакторы могут прочно связываться с белковой частью фермента, что же касается активаторов, то они легко отделяются от апофермента. Такие металлы являются обязательными участниками каталитического акта, определяющими активность фермента. Активаторы усиливают каталитическое действие, но их отсутствие не препятствует протеканию ферментативной реакции. Как правило, металл-кофактор взаимодействует с отрицательно заряженными группировками субстрата. Металл с переменной валентностью принимает участие в обмене электронов между субстратом и ферментом. Кроме того, они принимают участие в образовании стабильной переходной конформации фермента, что способствует более быстрому образованию ES комплекса.

**Регуляция активности ферментов.** Одним из основных механизмов регуляции метаболизма служит регуляция активности ферментов. Одним из примеров является аллостерическая регуляция, регуляция посредством активаторов и ингибиторов. Часто бывает так, что конечный продукт метаболического пути является ингибитором регуляторного фермента. Такой тип ингибирования называется *ретроингибированием*, или ингибированием по принципу отрицательной обратной связи.

Многие ферменты вырабатываются в виде неактивных предшественников-проферментов, а затем в нужный момент активируются за счет частичного протеолиза. *Частичный протеолиз* – отщепление части молекулы, которое приводит к изменению третичной структуры белка и формированию активного центра фермента.

Некоторые ферменты-олигомеры могут изменять свою активность за счет ассоциации - диссоциации субъединиц, входящих в их состав.

Многие ферменты могут находиться в двух формах: в виде простого белка и в виде фосфопротеида. Переход из одной формы в другую сопровождается изменением каталитической активности.

Скорость ферментативной реакции зависит от количества фермента, которое в клетке определяется соотношением скоростей его синтеза и распада. Этот способ регуляции скорости ферментативной реакции является более медленным процессом, чем регуляция активности фермента.

## 2.3. УГЛЕВОДЫ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА

Углеводы — важный класс природных веществ — встречаются повсеместно в растительных, животных и бактериальных организмах.

В биосфере на долю углеводов приходится больше, чем всех других органических соединений вместе взятых. В растениях они составляют 80—90% из расчета на сухое вещество; в животном организме на их долю приходится 2-3 % массы тела.

Для большинства организмов природные углеводы выполняют множество функций:

— углеводы являются источником углерода, который необходим для синтеза белков, нуклеиновых кислот, липидов и др.;

— энергетическая. Углеводы обеспечивают до 70% потребности организма в энергии. При окислении 1 г углеводов выделяется 16,9 кДж энергии;

— резервная. Некоторые углеводы (крахмал и гликоген) представляют собой форму хранения питательных веществ (в основном в виде глюкозы).

— строительная. Целлюлоза и другие полисахариды образуют прочный каркас клеточных стенок; в комплексе с белками и липидами они входят в состав биомембран всех клеток.

— защитная. Кислые гетерополисахариды выполняют роль биологического смазочного материала, выстилая трещищиеся поверхности суставов, слизистой пищеварительных путей, носа, бронхов, трахеи и др.

— углеводы участвуют в образовании комплексных молекул, а именно гликопротеинов и гликолипидов. Гликопротеины служат маркерами в процессах узнавания молекулами и клетками друг друга, определяют антигенную специфичность, обуславливают различия групп крови, выполняют рецепторную, каталитическую и другие функции.

Углеводы включают соединения, начиная от низкомолекулярных, содержащих всего несколько атомов углерода, до веществ, молекулярная масса которых достигает нескольких сот тысяч и даже миллионов. Все углеводы делят на три класса в зависимости от числа остатков сахаров: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды, или простые сахара, содержат только одну структурную единицу и при гидролизе не распадаются. **Моносахариды** — это полигидроксиальдегиды или полигидроксикетоны.

**Олигосахариды** состоят из нескольких (от 2 до 10) остатков моносахаридов, соединенных О-гликозидными связями. Наиболее распространеными являются дисахариды («di» - от греческого «два»), состоящие из двух остатков моносахаридов.

**Полисахариды** являются высокомолекулярными веществами, состоящими из остатков моносахаридов, соединенных О-гликозидными связями, со степенью полимеризации выше 10.

### **Моносахариды.**

Существует несколько принципов классификации моносахаридов:

1. по числу углеродных атомов, входящих в состав молекулы ( $C_3$  – триозы,  $C_4$  – тетрозы,  $C_5$  – пентозы,  $C_6$  – гексозы,  $C_7$  – гептозы,  $C_8$  – октозы и т. д.);
2. по характеру карбонильной группы: альдегидной – альдозы или кетонной групп – кетозы;
3. по наличию других групп, кроме карбонильной и гидроксильной:
  - нейтральные сахара, содержащие только карбонильную и гидроксильную группы;
  - аминосахара (основные), содержащие вместо гидроксигруппы аминогруппу;
  - кислые сахара, содержащие помимо карбонильных и гидроксильных групп еще и карбоксильную.

Формулы некоторых из моносахаридов приведены на рисунках 2.10 и 2.11.

В основу номенклатуры сахаров положены тривиальные названия моносахаридов состава  $C_nH_{2n}O_n$  с прямой цепью углеродных атомов: ксилоза, рибоза, глюкоза, фруктоза и др. Наименованиям кетоз придается окончание **-улоза**, например кетоза  $C_5$  – пентулоза. Всем моносахарам присуща конфигурационная (оптическая) изомерия, т. е. они существуют в двух энантиомерных формах – D и L. Принадлежность моносахаридов к D- или L-ряду определяется по расположению OH-группы у последнего (считая от альдегидной или кетогруппы) хирального (ассимметричного) атома углерода. В качестве стандарта сравнения конфигурации асимметрического атома углерода предложено использовать изомер глицеринового альдегида. Названный D-глицериновым альдегидом изомер вращает плоскость поляризованного света вправо, а его зеркальное отражение антипод – L-глицериновый альдегид – влево.

Некоторые моносахариды, например фруктоза, отнесенные к D-ряду, являются левовращающими, а представители L-ряда – правовращающими. Чтобы указать и принадлежность сахара к D- или L-ряду, и направление вращения плоскости поляризации, после символов D или L перед названием моносахарида в скобках ставят знак (+) или (-), обозначающий соответственно правое или левое вращение.

В живых организмах моносахариды присутствуют преимущественно в D-конфигурации, которую называют природной. Исключение составляет L-арabinоза бактерий, L-рамноза и L-сорбоза растений.

У альдоз, начиная с  $n = 4$ , и кетоз – с  $n = 5$  имеется несколько хиральных центров, т. е. существует ряд диастереомеров, представляющих собой разные по химическим свойствам соединения, причем каждый из диастереомеров может существовать в L- и D- конфигурации.

Карбонильные группы моносахаридов с длиной цепи  $n = 5$  и более могут вступать во взаимодействие со спиртовыми группами с образованием циклической **полуацетали**, или **полукетали**, которые называются соответственно **фуранозными** или **пиранозными** по аналогии с известными соединениями – фураном или пираном:

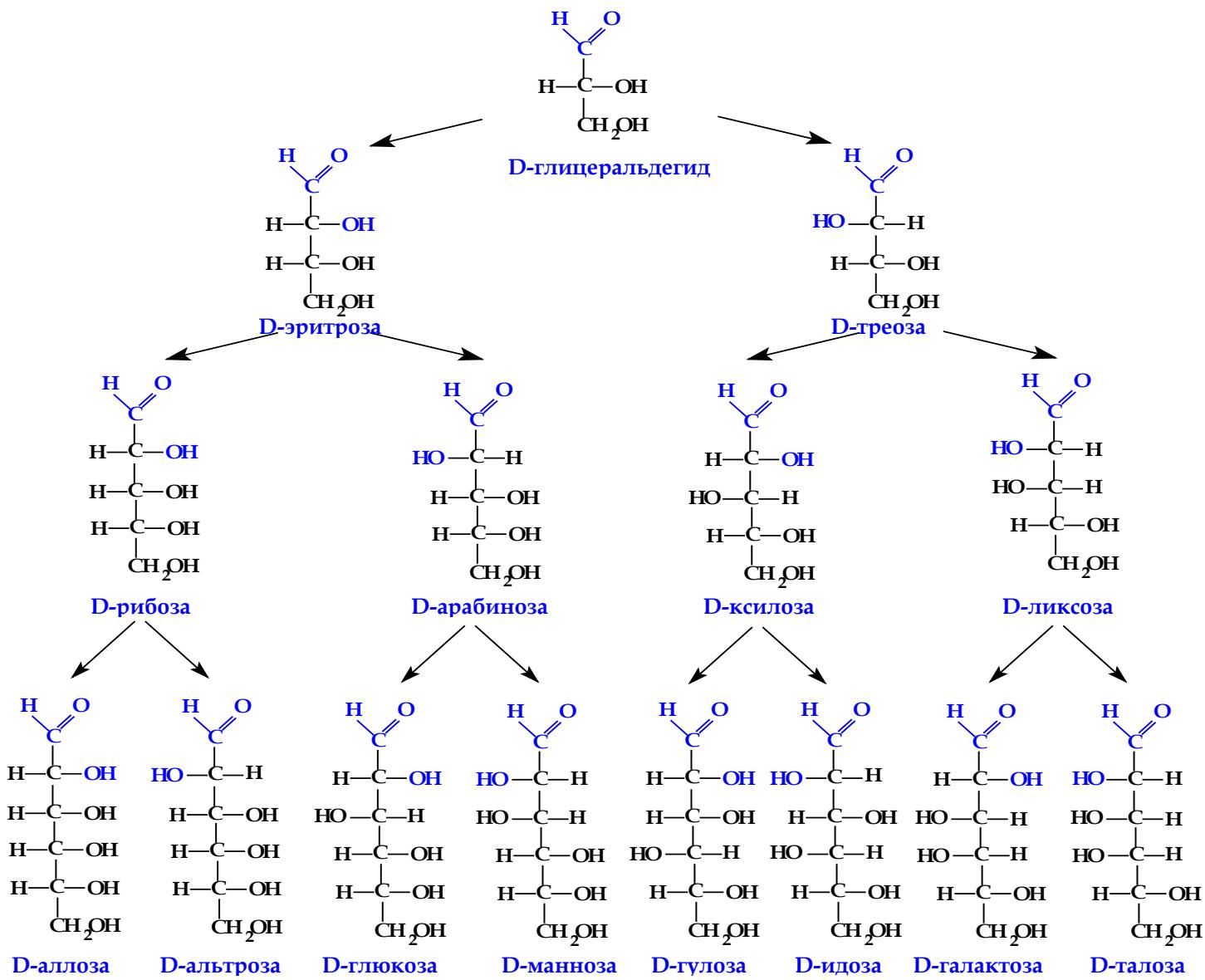


Рисунок 2.10 - Стереохимические соотношения D-альдоз с разным числом атомов углерода в цепи

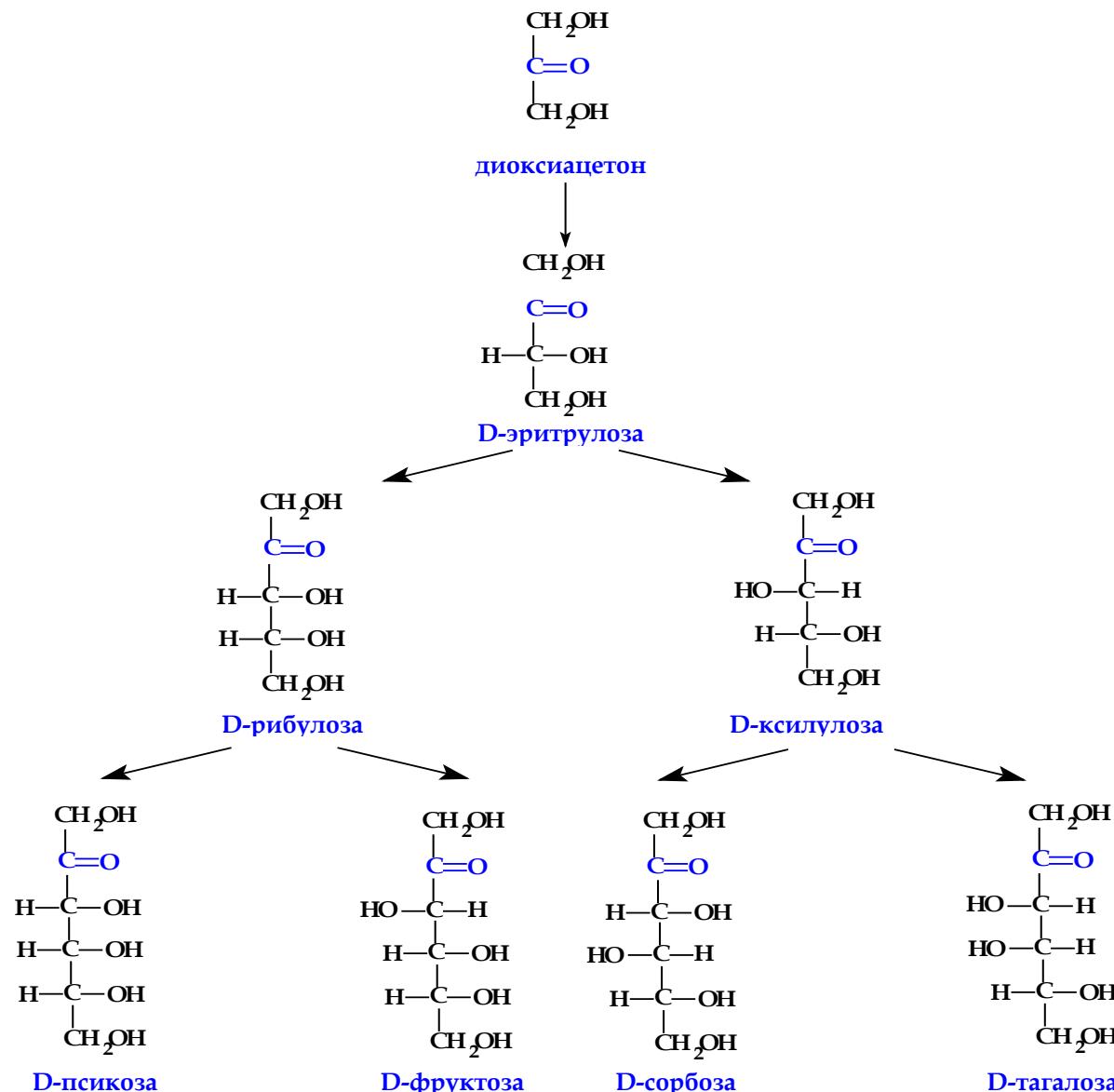
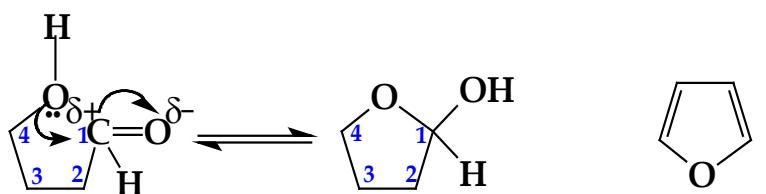
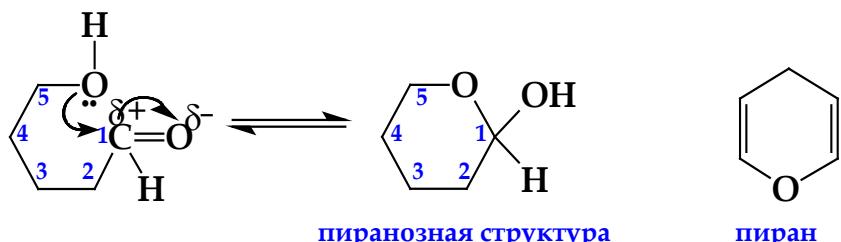


Рисунок 2.11 - Стереохимические соотношения D-кетоз с разным числом атомов углерода в цепи



фуранозная структура

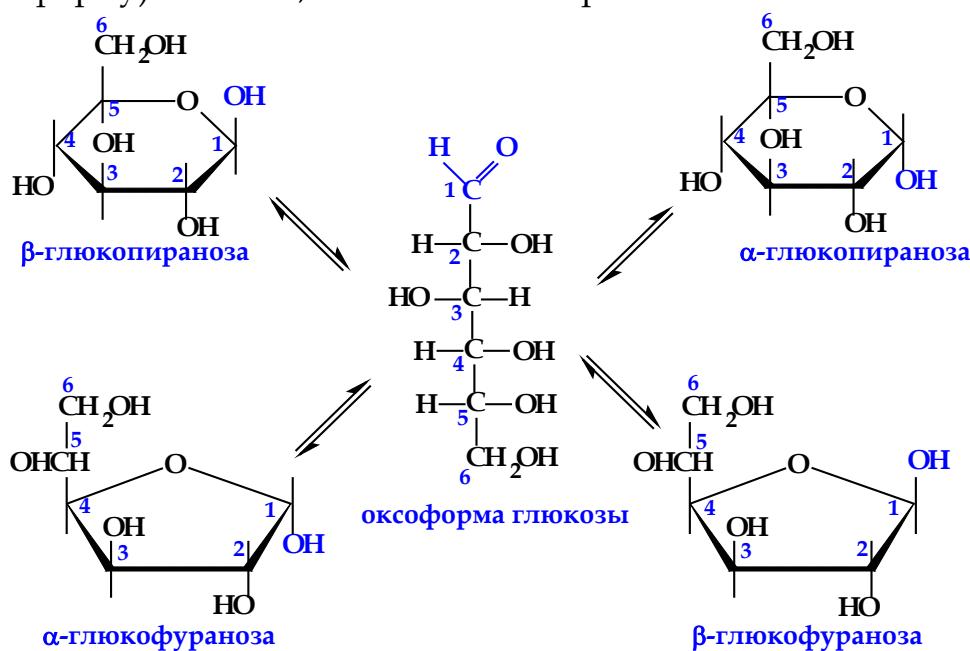
фуран



пиранозная структура

пиран

При этом в молекуле пентоз или гексоз появляется еще один хиральный центр и новая пара изомеров —  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеры, отличающиеся расположением гидроксильной группы при полуацетальном атоме углерода относительно плоскости кольца: у  $\alpha$ -аномера гидроксильная и  $\text{CH}_2\text{OH}$ -группы находятся по разные плоскости кольца, а у  $\beta$ -аномера — по одну его сторону. Таким образом, гексоза образует четыре циклические формы ( $\alpha$ - и  $\beta$ -фуранозную и  $\alpha$ - и  $\beta$ -пиранозную), находящиеся в растворе в динамическом равновесии с ациклической формой. В водном растворе все эти формы способны взаимно превращаться друг в друга через оксоформу (нециклическую форму) глюкозы, количество которой составляет менее 1%.



Пиранозные формы гексоз и пентоз значительно более устойчивы, чем фуранозные, поэтому в растворе всегда существенно преобладают первые.  $\alpha$ - и  $\beta$ -Формы моносахаридов, обладающие разной величиной оптического вращения, в процессе растворения в воде взаимно переходят друг в друга, поэтому удельное вращение  $[\alpha]D$  в свежеприготовленных растворах моно-

сахаридов изменяется в течение времени до определенной величины. Это явление получило название *мутаротации* (от лат. «*multirotatio*» — много вращений).

### Олигосахариды.

Как и для моносахаридов, в классификацию олигосахаридов положено несколько принципов. Их классифицируют:

1. в зависимости от числа моносахаридных фрагментов, входящих в состав олигосахаридов: ди-, три-, тетрасахариды и т. д.;
2. по составу моносахаридных остатков:
  - гомоолигосахариды, состоящие из остатков одного вида моносахарida;
  - гетероолигосахариды, состоящие из остатков разных сахаров;
3. в зависимости от порядка соединения мономеров:
  - линейные сахара;
  - разветвленные сахара;
4. восстановывающие и невосстановывающие сахара.

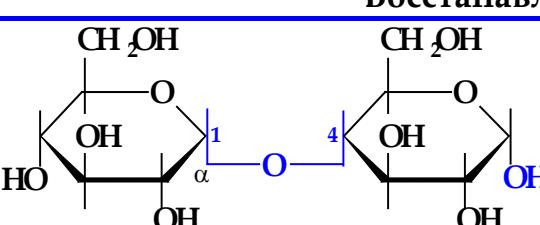
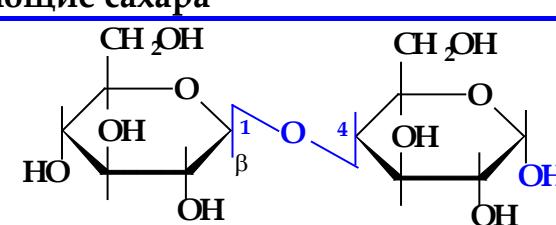
У *восстановывающих* олигосахаридов связь между мономерами осуществляется за счет спиртового и полуацетального гидроксилов. Потому, одно из моносахаридных звеньев сохраняет свободный полуацетальный гидроксил, который определяет восстановывающие свойства (способность сахара окисляться) и все реакции, свойственные моносахаридам.

У *невосстановывающих* олигосахаридов гликозидная связь образована за счет полуацетальных гидроксилов моносахаридов. Они не содержат свободного полуацетального гидроксила и не проявляют характерных реакций альдегидной группы. Примеры восстановывающих и невосстановывающих дисахаридов, а также характер положения связи между моносахарами приведены в таблице 2.3.

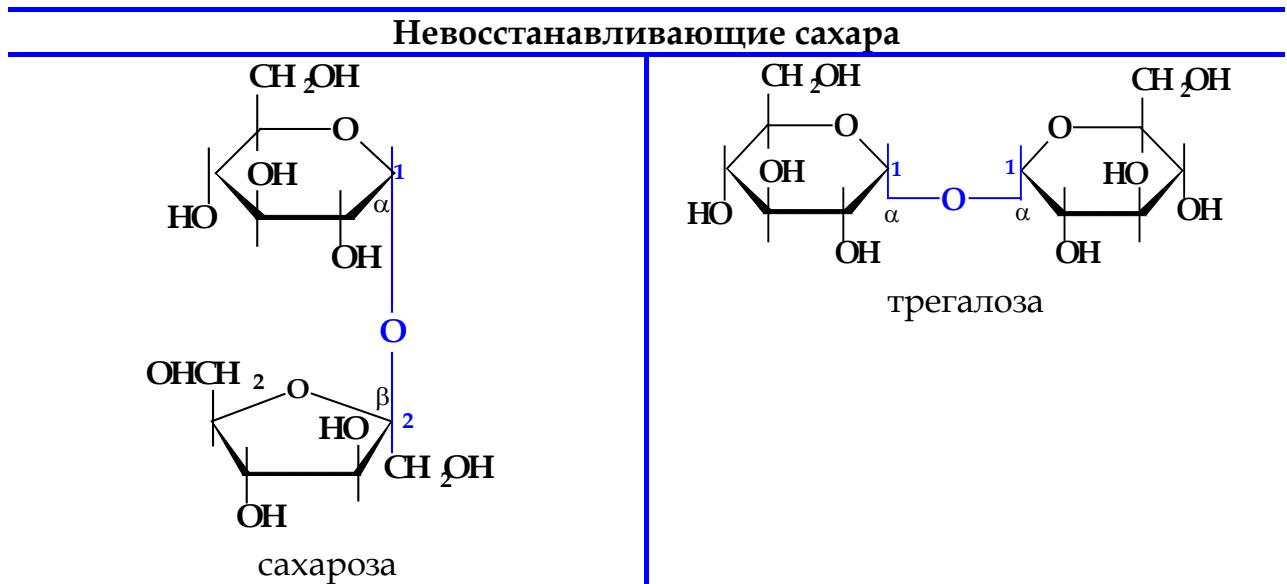
Из дисахаридов наибольшее распространение в природе получили мальтоза, лактоза и сахароза.

Мальтоза состоит из двух остатков  $\alpha$ -D-глюкозы, соединенных 1 $\rightarrow$ 4 О-гликозидной связью. Целлобиоза также состоит из двух остатков глюкозы, однако уже  $\beta$ -формы, соединенных также связью 1 $\rightarrow$ 4.

**Таблица 2.3 - Восстановывающие и невосстановывающие дисахариды**

Восстановывающие сахара	
 мальтоза	
 целлобиоза	

Окончание таблицы 2.3.



Сахарозу, или обычный сахар, синтезируют многие растения. У высших животных она не образуется. В состав сахарозы входят  $\alpha$ -D-глюкоза и  $\beta$ -D-фруктоза.

Среди природных трисахаридов важное значение имеют рафиноза, состоящая из остатков D-фруктозы, D-галактозы и D-глюкозы, а также генцианоза, состоящая из двух остатков D-глюкозы и одного остатка D-фруктозы.

#### Полисахариды (гликаны).

Основная масса всех углеводов, встречающихся в природе, существует в виде полисахаридов. С точки зрения их функционального назначения полисахариды можно разделить на две основные группы. Первая группа, в которую входит, например, целлюлоза, несет главным образом структурную функцию. Вторая группа, представителем которой является, в частности, гликоген, выполняет функции, связанные с питанием. Эти молекулы играют в основном роль депо и могут быть легко мобилизованы путем превращения в моносахариды.

С точки зрения общих принципов строения полисахариды характеризуются тремя особенностями:

- природой составляющих их мономеров;
- природой гликозидной связи между мономерами;
- последовательностью расположения моносахаридных остатков в цепи.

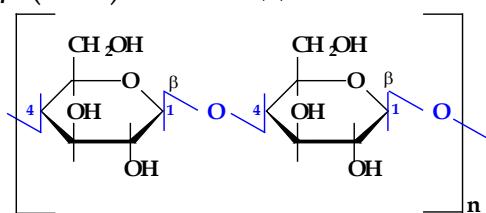
В зависимости от природы мономеров полисахариды делятся на *гомополисахариды*, если все входящие в состав мономеры одинаковы, и *гетерополисахариды*, если мономеры различны.

Названия гомополисахаридов слагаются из названий входящих в их состав редуцирующих моносахаридов, в которых суффикс *-оза* меняется на суффикс *-ан* (глюкан или аубазидан, декстран, маннан или родэксплан, ара-

бан и т. д.). Разветвленный гетерополисахарид, в основной цепи которого находятся остатки глюкозы, а в боковой — остатки маннозы, называют манноглюканом, а в случае обратного распределения моноз — глюкоманнаном. Иногда полисахариды называют по продуценту, сохраняя суффикс -ан, например ксанбан (продуцент — *Xanthomonas campestris*).

**Гомополисахариды.** Самым распространенным на Земле органическим соединением и важнейшим гомополисахаридом является целлюлоза. Она входит в состав клеточных стенок практически всех растений, тем самым служит основным строительным элементом. **Целлюлоза** — совокупность очень длинных неразветвленных цепей, состоящих из  $\beta$ -глюкозы, молекулы которой соединены связями 1→4, а повторяющимся звеном является дисахарид целлобиоза (рисунок 2.12).

Основная биологическая функция целлюлозы — структурная. Питательная ценность целлюлозы для высших животных и человека ограничена, поскольку в их организме нет ферментов (целлюлаз), способных разорвать  $\beta$ -(1→4)-гликозидные связи глюкозы.



в скобках указан мономерный участок  
- целлобиоза

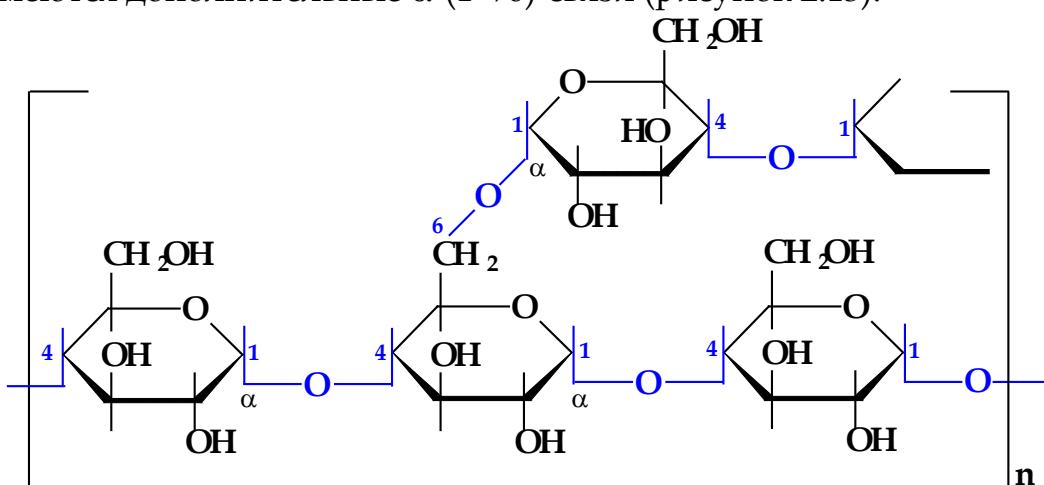
**Рисунок 2.12 - Строение молекулы целлюлозы**

Другим ярким представителем гомополисахаридов является основной резервный полисахарид растений — крахмал.

**Крахмал** представляет собой смесь полисахаридов — амилозы и амилопектина.

**Амилоза** — линейный полимер с  $\alpha$ -(1→4)-гликозидными связями между остатками D-глюкопиранозы.

**Амилопектин** отличается от амилозы высокоразветвленным строением. Остатки D-глюкозы в линейных участках полисахарида связаны  $\alpha$ -(1→4)-гликозидными связями, а в точках ветвления имеются дополнительные  $\alpha$ -(1→6)-связи (рисунок 2.13).



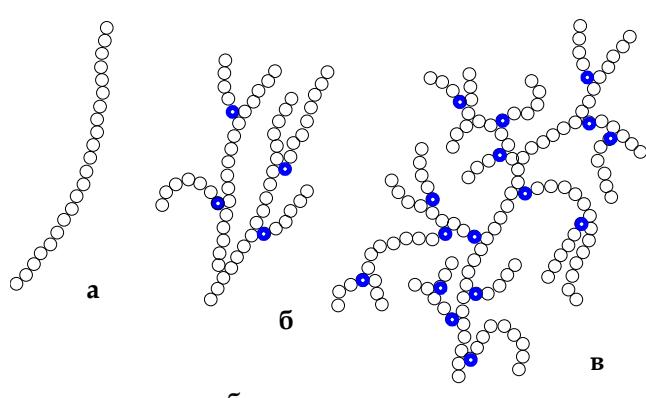
**Рисунок 2.13 - Строение амилопектина растительного крахмала**

Биологическая роль крахмала состоит в том, что он является запасным питательным веществом в растениях, и когда возникает потребность в энергии и источнике углерода, крахмал гидролизуется ферментами — амилаза-

ми. Последние расщепляют  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи, что приводит к образованию смеси глюкозы и мальтозы. В результате действия амилаз происходит полное расщепление амилозы, однако амилопектин расщепляется лишь частично, и для разрыва 1 $\rightarrow$ 6 гликозидных связей необходимо действие еще одних ферментов – мальтаз, разрывающих связи в точках ветвления.

**Гликоген** (животный крахмал) – разветвленный полисахарид животных организмов, а также некоторых бактерий и дрожжей. Структура гликогена подобна амилопектину –  $\alpha$ -(1→4)-глюкан с  $\alpha$ -(1→6)-связями в точках ветвления.

Гликоген отличается от амилопектина лишь большей разветвленностью и более жесткой упаковкой молекулы. Если в амилопектине крахмала точки ветвления встречаются через каждые 25-30 остатков глюкозы, то в молекуле гликогена – через 8-10 остатков вдоль  $\alpha$ -(1→4)-цепи (рисунок 2.14).



**Рисунок 2.14 - Структура молекул амилозы (а), амилопектина (б) и гликогена (в)**

туроновой кислоты с преобладающей связью 1→4), хитин (полимер  $\beta$ -(1→4)-ацетил-глюказамина) и многие другие.

## *Гетерополисахариды.*

К ярко выраженным гетерополисахаридам относятся гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, кератосульфаты. Поскольку водные растворы этих соединений гелеобразны, их называют мукополисахаридами (от лат. «mucus» — слизь).

*Гиалуроновая кислота* состоит из эквимолярных количеств D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, которые чередуются друг с другом в молекуле полисахарида. Аминосахар соединен с кислотой  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связью, а кислота — с аминосахаром  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) гликозидной связью (рисунок 2.15).

Этот полисахарид присутствует в соединительных тканях животных, а также в стекловидном теле глаза и в синовиальной жидкости. Кроме того, он синтезируется также различными штаммами бактерий.

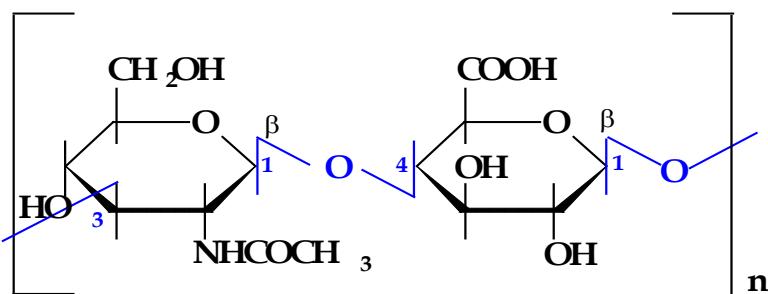


Рисунок 2.15 - Фрагмент молекулы гиалуроновой кислоты

Предполагают, что функция гиалуроновой кислоты заключается в том, чтобы связывать воду в интерстициальных пространствах и удерживать клетки вместе в желеподобном матриксе. Кроме того, она придает синовиальной жидкости

смазочные свойства и способность смягчать удары.

**Хондроитинсульфаты.** К ним относится, в частности, хондроитин – полисахарид, сходный с гиалуроновой кислотой, в котором D-глюказамин замещен D-галактозамином.

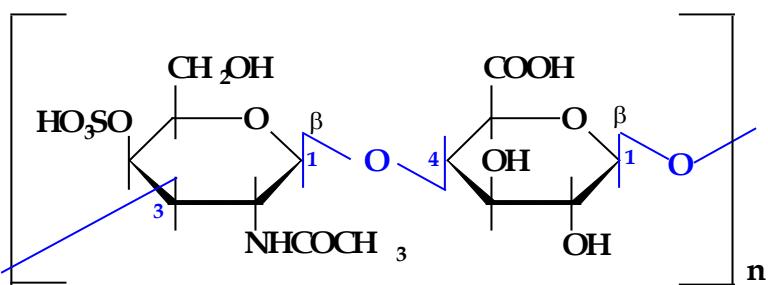


Рисунок 2.16 - Фрагмент молекулы хондроитинсульфата

Хондроитинсульфаты состоят из эквимолярных количеств D-глюкуроновой кислоты, N-ацетил-D-галактозамина и сульфата (рисунок 2.16). Их структуры различаются только по положению сульфатных

остатков. В хондроитинсульфате находится L-идуроновая кислота. Во всех случаях находятся  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи.

**Кератосульфаты.** Они сходны с хондроитинсульфатами как в структурном отношении, так и по своему распространению. Кератосульфат является одним из главных полисахаридов соединительной ткани.

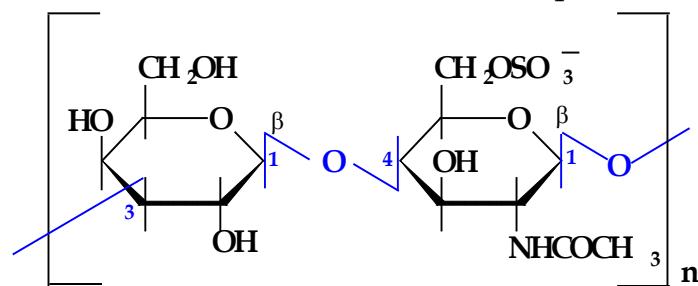


Рисунок 2.17 - Фрагмент молекулы кератосульфата

Кератосульфат состоит из чередующихся остатков D-галактозы и N-ацетил-D-глюказаминсульфата, соединенных между собой чередующимися связями  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-типа (рисунок 2.17).

Среди других природных образований, содержащих гетерополисахариды, стоит назвать: гепарин – полимер сульфатированных глюказамина и идуроновой кислоты, соединенных  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидной связью; камеди (вишневый клей, гуммиарбик) – смесь солей гексуроновых кислот и пентоз; лигнин – смесь, содержащая неорганические кислоты, фенольные соединения, вещества ароматического ряда. В состав этих гетерополисахаридов входят остатки маннозы, галактозы, ксилоэзы, глюкуроновой кислоты.

## 2.4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные линейные гетерополимеры с молекулярной массой от  $2 \cdot 10^4$  до  $1,2 \cdot 10^8$  Да, а иногда и более. Мономерными звеньями нуклеиновых кислот являются **нуклеотиды** – сложные органические молекулы, состоящие из азотистых оснований, остатка пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. В зависимости от типа пентозы нуклеиновые кислоты подразделяются на **дезоксирибонуклеиновые (ДНК)** и **рибонуклеиновые (РНК)**. Молекулы нуклеиновых кислот имеют самую различную длину, величина которой составляет от 10 нм до 10-50 мкм, причем число нуклеотидов колеблется от 5000 до 5 млн.

Основным местом локализации ДНК являются структуры клеточного ядра – хромосомы, в которых ДНК находится в виде комплексов с белками (гистонами) – хроматина. ДНК (около 1% от общего его количества) также обнаружена в митохондриях всех типов эукариотических клеток и в хлоропластах растительных клеток. В структуре ядерной ДНК заложена информация о видовых специфических признаках, которые определяют характер данной клетки и всего организма и передаются по наследству. В цитоплазме клеток имеются значительные количества РНК, участвующие в реализации генетической информации путем трансляции.

Нуклеиновые кислоты являются многоосновными кислотами, которые при мягком гидролизе щелочами распадаются на мононуклеотиды. При полном гидролизе нуклеиновых кислот образуются азотистые основания, моносахарид пентоза (рибоза или дезоксирибоза) и фосфорная кислота.

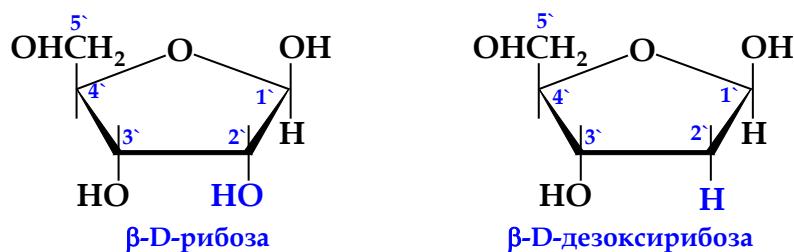
**Азотистые основания**, входящие в состав нуклеиновых кислот, являются производными ароматических гетероциклических соединений – пурина и пиримидина (рисунок 2.18).

Среди пуриновых азотистых оснований в гидролизатах обоих классов нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) преимущественно встречаются аденин и гуанин.

Кроме перечисленных пуриновых оснований, в клетках обнаруживают гипоксантин (6-оксопурин) и ксантин (2,6-диоксопурин), которые образуются в результате дезаминирования аденина и гуанина и играют существенную роль в процессах обмена нуклеиновых кислот. Гипоксантин и ксантин в небольших количествах найдены в составе некоторых РНК.

Среди пиримидиновых оснований основное значение имеют цитозин (входит в состав ДНК и РНК), урацил (входит в состав РНК) и тимин (входит в состав ДНК) (рисунок 2.18).

**Углеводная часть** нуклеотидов, входящих в РНК, представлена рибозой, а входящих в ДНК, – дезоксирибозой. Пентозы в нуклеиновых кислотах всегда присутствуют в  $\beta$ -D-фuranозной форме:



Углеродные атомы пентоз в нуклеотидах нумеруются со знаком «штрих», чтобы их можно было отличить от атомов азотистых оснований.

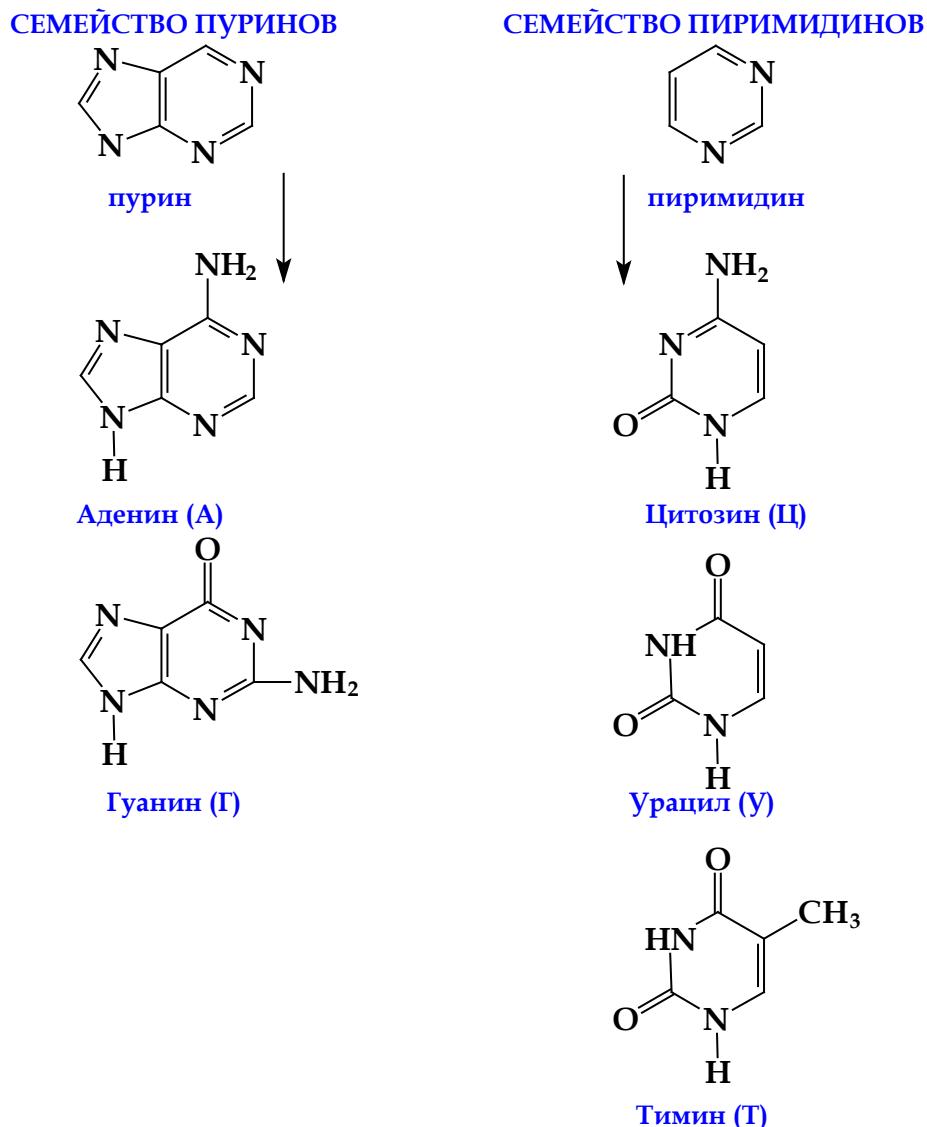


Рисунок 2.18 - Строение пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований

Соединения азотистых оснований с пентозой называют **нуклеозидами**. Нуклеозиды (аденозин, гуанозин, цитидин, тимидин, уридин), выделяемые из нуклеиновых кислот, представляют собой N-гликозиды. Нуклеозиды, содержащие в качестве углеводной части D-рибозу, называют рибонуклеозидами, а содержащие 2-дезокси-D-рибозу – дезоксирибонуклеозидами.

**Нуклеотиды** – мономерные звенья нуклеиновых кислот – представляют собойmonoфосфорные эфиры нуклеозидов.

У рибонуклеотидов остаток фосфорной кислоты может находиться в положениях 2', 3' и 5'. В случае дезоксирибонуклеотидов остаток фосфорной кислоты может находиться только в положениях 3' и 5':

Основными фрагментами, полученными из РНК и ДНК, являются следующие мононуклеотиды.

Мононуклеотиды РНК: аденоzin-3'- и 5'-фосфаты (адениловые кислоты), гуанозин-3'- и 5'-фосфаты (гуаниловые кислоты), цитидин-3'- и 5'-фосфаты (цитидиловые кислоты), уридин-3'- и 5'-фосфаты (уридиловые кислоты).

Мононуклеотиды ДНК: 2'-дезоксиаденоzin-3'- и 5'-фосфаты (дезоксиадениловые кислоты); 2'-дезоксигуанозин-3'- и 5'-фосфаты (дезоксигуаниловые кислоты); 2'-дезоксицитидин-3'- и 5'-фосфаты (дезоксицитидиловые кислоты); 2'-дезокситимидин-3'- и 5'-фосфаты (тимидиловые кислоты).

Исходя из принятого сокращенного обозначения нуклеозидов (А, Г, Ц, Т, У), монофосфаты принято обозначать АМФ, ГМФ, дАМФ («d» - от дезокси-) и т. д., если фосфат присоединен к углероду 5'-рибозы или дезоксирибозы. Соответствующие монофосфаты с фосфатной группой, присоединенной к третьему атому углерода, обозначаются А-3'-МФ, дА-3'-МФ.

Помимо нуклеотидмонофосфатов, в живых организмах встречаются нуклеотиддифосфаты (например АДФ, УТФ) и нуклеотидтрифосфаты (АТФ, ГТФ), а также циклические нуклеотиды (цАМФ, цГМФ), являющиеся внутриклеточными посредниками различных внеклеточных сигналов (гормонов, нейромедиаторов и т. д.). Особое место занимают нуклеотиды в составе коферментов, являющиеся производными аденоzinмонофосфата: никотинамидадениндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>), никотинамидадениннуклеотидфосфат (НАДФ<sup>+</sup>), флавинадениндинуклеотид (ФАД<sup>+</sup>), коэнзим А (КоА) и др.

#### 2.4.1. СТРОЕНИЕ ДНК

Молекулы нуклеиновых кислот всех типов живых организмов – это длинные неразветвленные полимеры мононуклеотидов. Роль мостика между нуклеотидами выполняет 3',5'-фосфодиэфирная связь, соединяющая 5'-фосфат одного нуклеотида и 3'-гидроксильный остаток рибозы (или дезоксирибозы) следующего. В связи с этим полинуклеотидная цепь оказывается полярной. На одном ее конце остается свободной 5'-фосфатная группа, на другом 3'-ОН-группа.

ДНК, подобно белкам, имеет первичную, вторичную и третичную структуры.

*Первичная структура ДНК.* Данная структура определяет закодированную в ней информацию, представляя собой последовательность чередования дезоксирибонуклеотидов в полинуклеотидной цепи.

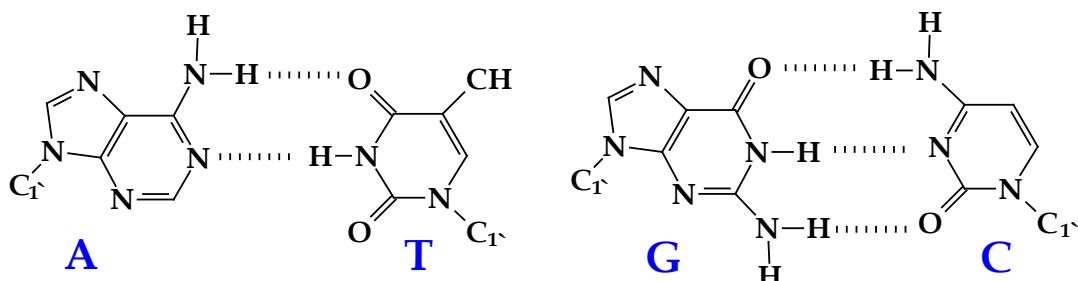
Молекула ДНК состоит из двух спиралей, имеющих одну и ту же ось и противоположные направления. Сахарофосфатный остов располагается по периферии двойной спирали, а азотистые основания находятся внутри.

Остов содержит ковалентные фосфодиэфирные связи, а обе спирали между основаниями соединены водородными связями и гидрофобными взаимодействиями.

Эти связи впервые были открыты и изучены Э.Чаргаффом в 1945 г. и получили название принципа комплементарности, а особенности образования водородных связей между основаниями называются правилами Чаргаффа:

- пуриновое основание всегда связывается с пиримидиновым: аденин - с тимином ( $A \rightarrow T$ ), гуанин - с цитозином ( $G \rightarrow C$ );
- молярное соотношение аденина к тимину и гуанина к цитозину равно 1 ( $A=T$ , или  $A/T=1$  и  $G=C$ , или  $G/C=1$ );
- сумма остатков  $A$  и  $G$  равно сумме остатков  $T$  и  $C$ , т.е.  $A+G=T+C$ ;
- в ДНК, выделенных из разных источников, отношение  $(G+C)/(A+T)$ , называемое *коэффициентом специфичности*, неодинаково.

Правила Чаргаффа основаны на том, что аденин образует две связи с тимином, а гуанин образует три связи с цитозином:



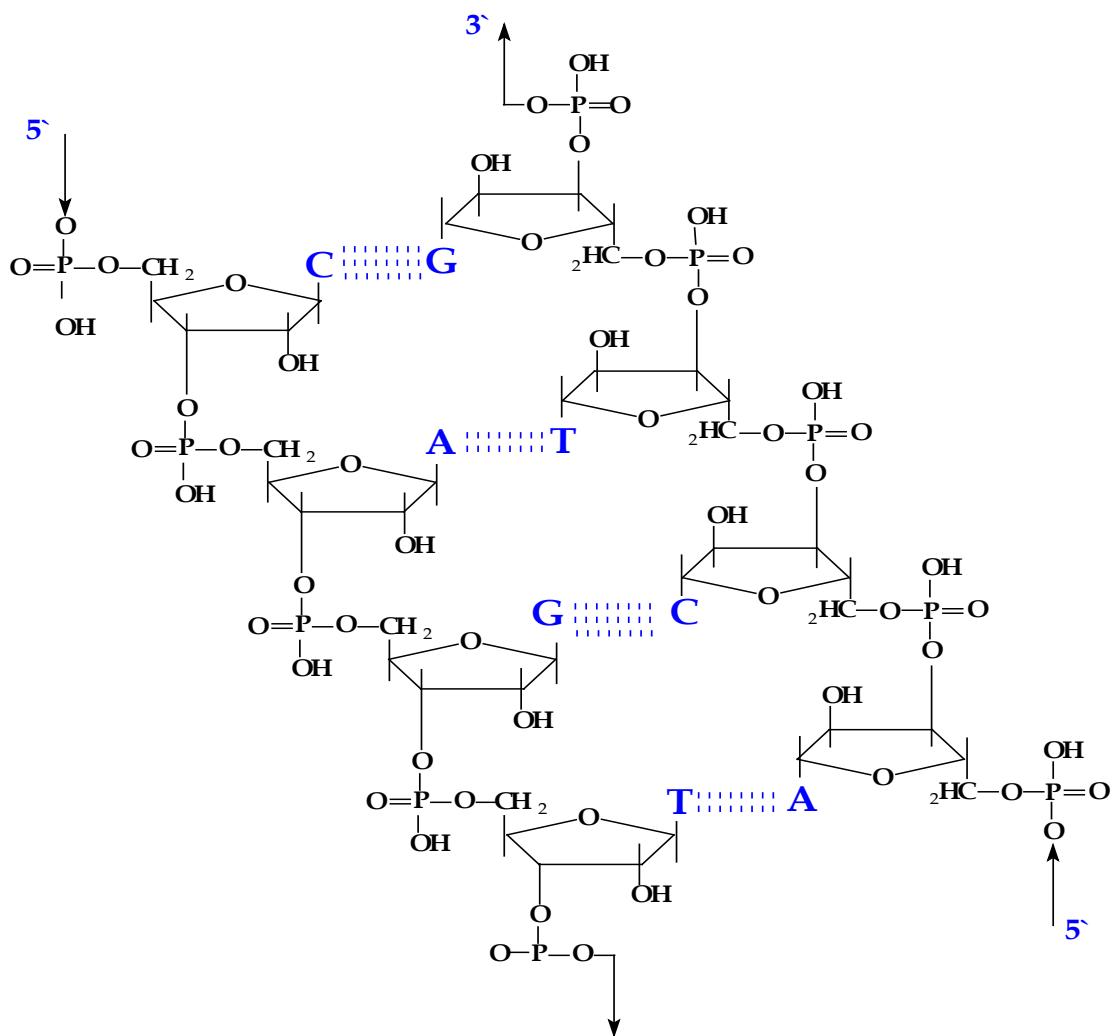
На основании правил Чаргаффа можно представить двусpirальную структуру ДНК, которая приведена на рисунке 2.19.

*Вторичная структура ДНК.* В соответствии с моделью, предложенной в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком, вторичная структура ДНК представляет собой двухцепочечную правозакрученную спираль из комплементарных друг другу антипараллельных полинуклеотидных цепей.

Для вторичной структуры ДНК решающим являются две особенности строения азотистых оснований нуклеотидов. Первая заключается в наличии групп, способных образовывать водородные связи. Вторая особенность заключается в том, что пары комплементарных оснований  $A-T$  и  $G-C$  оказываются одинаковыми не только по размеру, но и по форме.

Благодаря способности нуклеотидов к спариванию, образуется жесткая, хорошо стабилизированная двухцепочечная структура. Основные элементы и параметрические характеристики такой структуры наглядно изображены на рисунке 2.20.

На основе тщательного анализа рентгенограмм выделенных ДНК установлено, что двойная спираль ДНК может существовать в виде нескольких форм (A, B, C, Z и др.). Указанные формы ДНК различаются диаметром и шагом спирали, числом пар оснований в витке, углом наклона плоскости оснований по отношению к оси молекулы (рисунок 2.21).



П р и м е ч а н и е: А-аденин, Г-гуанин, С-цитозин, Т-тимин

Рисунок 2.19 - Схематическое изображение двусpirальной молекулы ДНК

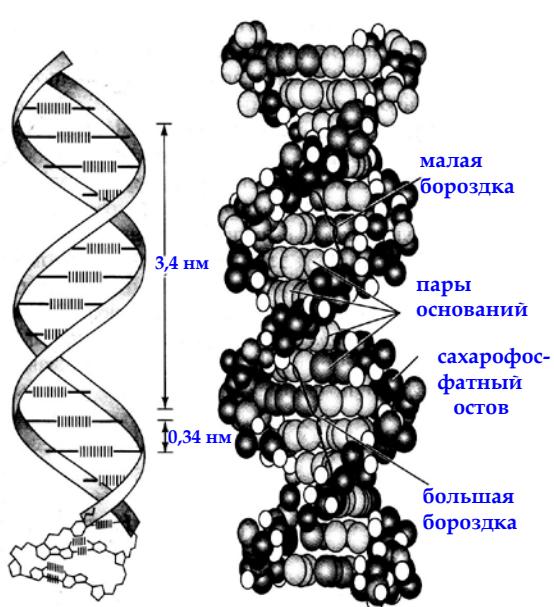


Рисунок 2.20 - Модель двуцепочной спирали ДНК

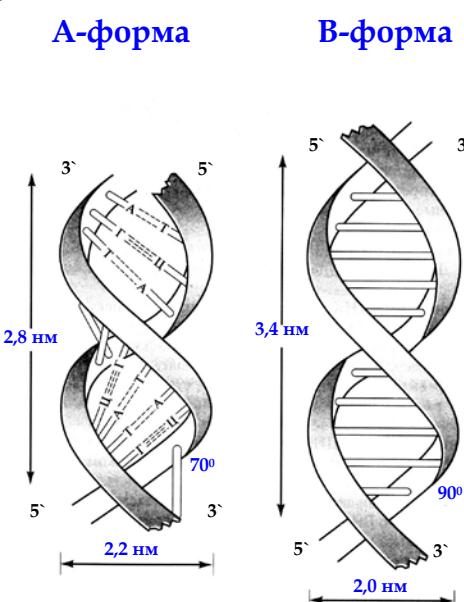


Рисунок 2.21 - Схематическое изображение А- и В-форм двойной спирали ДНК

**Третичная структура ДНК.** У всех живых организмов двухспиральные молекулы ДНК плотно упакованы с образованием сложных трехмерных структур.

Двухцепочные ДНК прокариот, имеющие кольцевую ковалентно-замкнутую форму, образуют левые (–) суперспирали. Третичная структура ДНК эукариотических клеток также образуется путем суперспирализации, но не свободной ДНК, а ее комплексов с белками хромосом (белки-гистоны классов H1, H2, H3, H4 и H5) (рисунок 2.22).

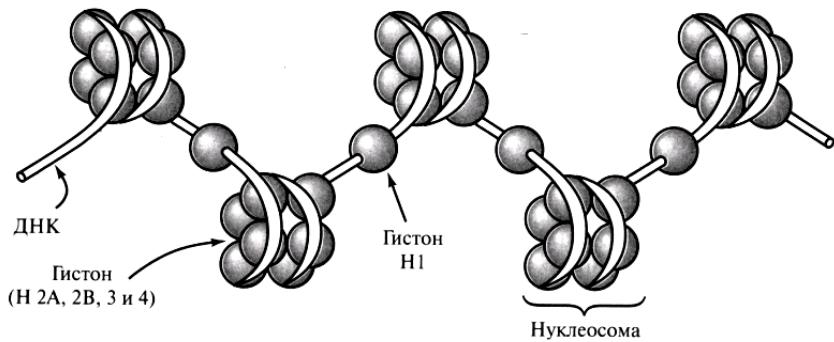


Рисунок 2.22 – Схематическое изображение третичной структуры ДНК

В пространственной организации хромосом можно выделить несколько уровней. Первый уровень – нуклеосомный. В результате нуклеосомной организации хроматина двойная спираль ДНК диаметром 2 нм приобретает диаметр 10–11 нм и укорачивается примерно в 7 раз.

Вторым уровнем пространственной организации хромосом является образование из нуклеосомной нити хроматиновой фибриллы диаметром 20–30 нм (уменьшение линейных размеров ДНК еще в 6–7 раз).

Третичный уровень организации хромосом обусловлен укладкой хроматиновой фибриллы в петли. В образовании петель принимают участие негистоновые белки. Участок ДНК, соответствующий одной петле, содержит от 20 000 до 80 000 пар нуклеотидов. В результате такой упаковки линейные размеры ДНК уменьшаются примерно в 200 раз. Петлеобразная доменная организация ДНК, называемая *интерфазной хромонемой*, может подвергаться дальнейшей компактизации, степень которой меняется в зависимости от фазы клеточного цикла.

#### 2.4.2. СТРОЕНИЕ РНК

В цитоплазме клеток содержатся три основных функциональных вида РНК: матричные РНК (мРНК), выполняющие функции матриц белкового синтеза; рибосомные РНК (рРНК), выполняющие роль структурных компонентов рибосом; и транспортные РНК (тРНК), участвующие в трансляции (переводе) информации мРНК в последовательность аминокислот молекулы белка.

В ядре клеток обнаруживают ядерную РНК, составляющую от 4 до 10% от суммарной клеточной РНК. Основная масса ядерной РНК представлена высокомолекулярными предшественниками рибосомных и транспортных

РНК. Предшественники высокомолекулярных рРНК (28 S, 18 S и 5 S РНК) в основном локализуются в ядрышке.

РНК является основным генетическим материалом у некоторых вирусов животных и растений (геномные РНК). Для большинства РНК вирусов характерна обратная транскрипция их РНК генома, направляемая обратной транскриптазой.

Все рибонуклеиновые кислоты представляют собой полимеры рибонуклеотидов, соединенных, как в молекуле ДНК, 3',5'-фосфородиэфирными связями. В отличие от ДНК, имеющей двухцепочечную структуру, РНК представляет собой одноцепочечные линейные полимерные молекулы.

**Строение мРНК.** мРНК – наиболее гетерогенный в отношении размеров и стабильности класс РНК. Содержание мРНК в клетках составляет 2–6% от общего количества РНК. мРНК состоят из участков – *цистронов*, определяющих последовательность аминокислот в кодируемых ими белках.

**Строение тРНК.** Транспортные РНК выполняют функции посредников (адаптеров) в ходе трансляции мРНК. На них долю приходится примерно 15% суммарной клеточной РНК. Каждой из 20 протеиногенных аминокислот соответствует своя тРНК. Для некоторых аминокислот, кодируемых двумя и более кодонами, существуют несколько тРНК.

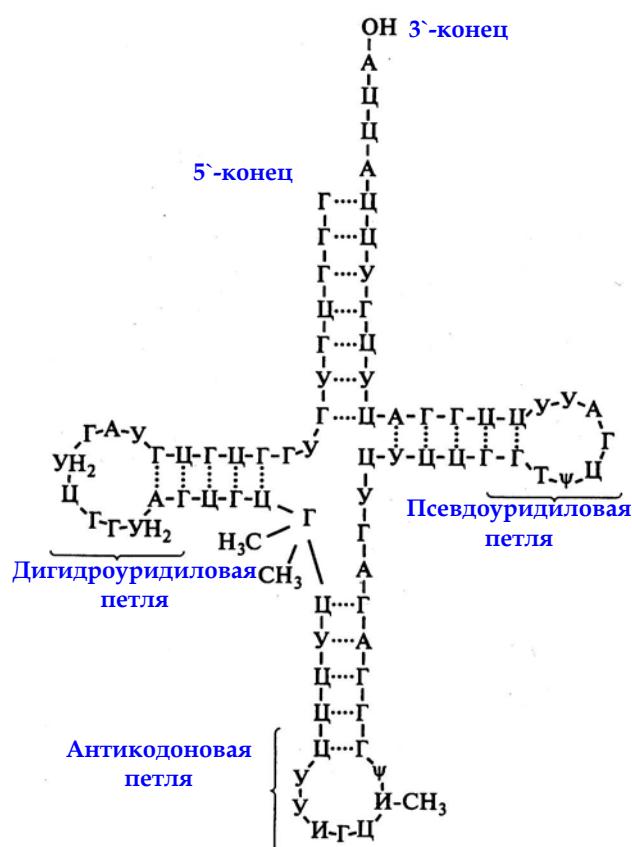
тРНК представляют собой сравнительно небольшие одноцепочечные молекулы, состоящие из 70–93 нуклеотидов. Их молекулярная масса составляет  $(2,4 - 3,1) \cdot 10^4$  кДа.

Вторичная структура тРНК формируется за счет образования максимального числа водородных связей между внутримолекулярными комплементарными парами азотистых оснований. В результате образования этих связей полинуклеотидная цепь тРНК закручивается с образованием спираллизованных ветвей, заканчивающихся петлями из неспаренных нуклеотидов. Пространственное изображение вторичных структур всех тРНК имеет форму клеверного листа (рисунок 2.23).

В «клеверном листе» различают четыре обязательные ветви, более длинные тРНК, кроме того, содержат короткую пятую (дополнительную) ветвь. Адапторную функцию тРНК обеспечивают акцепторная ветвь, к 3'-концу которой присоединяется эфирной связью аминокислотный остаток, и противостоящая акцепторной ветви антикодоновая ветвь, на вершине которой находится петля, содержащая антикодон. *Антикодон* представляет собой специфический триплет нуклеотидов, который комплементарен в антипараллельном направлении кодону мРНК, кодирующему соответствующую аминокислоту.

Т-Ветвь, несущая петлю псевдоуридуина (ТψС-петлю), обеспечивает взаимодействие тРНК с рибосомами.

Д-ветвь, несущая дегидроуридиновую петлю, обеспечивает взаимодействие тРНК с соответствующей аминоацил-тРНК-синтетазой.



**Рисунок 2.23 - Вторичная структура тРНК**

белка на мРНК. Число рибосом в клетке очень велико: от  $10^4$  у прокариот до  $10^6$  у эукариот. Локализуются рибосомы главным образом в цитоплазме, у эукариот, кроме того, в ядрышке, в матриксе митохондрий и строме хлоропластов. Рибосомы состоят из двух субчастиц: большой и малой. По размерам и молекулярной массе все изученные рибосомы делятся на 3 группы — 70S рибосомы прокариот (S-коэффициент седиментации), состоящие из малой 30S и большой 50S субчастиц; 80S рибосомы эукариот, состоящие из 40S малой и 60S большой субчастиц.

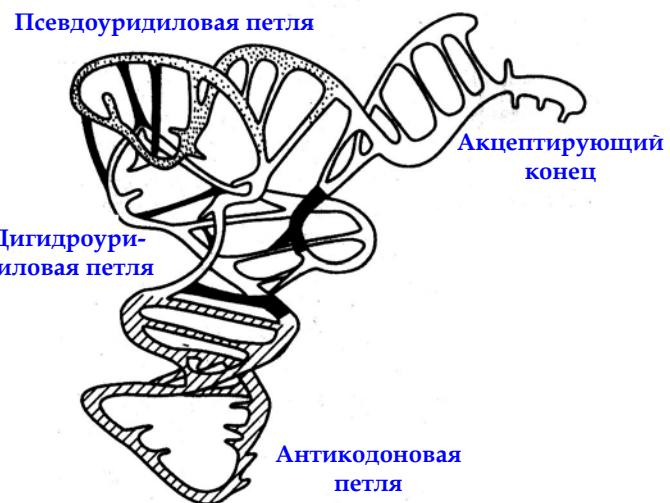
Малая субчастица 80S рибосом образована одной молекулой рРНК (18S) и 33 молекулами различных белков. Большая субчастица образована тремя молекулами рРНК (5S, 5,8S и 28S) и примерно 50 белками.

Вторичная структура рРНК образуется за счет коротких двусpirальных участков молекулы — шпилек (около 2/3 рРНК), 1/3 — представлена однотяжевыми участками, богатыми пуриновыми нуклеотидами.

Функции пятой дополнительной ветви пока мало исследованы, вероятнее всего она уравнивает длину разных молекул тРНК.

Третичная структура тРНК очень компактна и образуется путем сближения отдельных ветвей клеверного листа за счет дополнительных водородных связей с образованием L-образной структуры «локтевого сгиба» (рисунок 2.24). При этом акцепторное плечо, связывающее аминокислоту, оказывается расположенным на одном конце молекулы, а антикодон — на другом.

**Строение рРНК и рибосом.** Рибосомные РНК формируют основу, с которой связываются специфические белки при образовании рибосом. *Рибосомы* — это нуклеопротеиновые органеллы, обеспечивающие синтез



**Рисунок 2.24 - Третичная структура тРНК (по А.С. Спирину)**

54

## 2.5. ЛИПИДЫ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА

**Липиды** (от греч. «lipos» – жир) – низкомолекулярные органические соединения, полностью или почти полностью нерастворимые в воде и хорошо растворимые в неполярных органических растворителях (хлороформ, метанол, эфир, бензол и др.).

Гидрофобность (или липофильность) является общим признаком этого класса соединения. В их состав входят спирты, жирные кислоты, азотистые соединения, фосфорная кислота, углеводы и др.

К основным функциям липидов относятся:

— *структурная*. В комплексе с белками липиды являются структурными компонентами всех биологических мембран клеток. Они влияют на их проницаемость, участвуют в передаче нервного импульса, в создании межклеточного взаимодействия;

— *энергетическая*. Липиды, являясь более восстановленными по отношению к углеводам, служат наиболее энергоемким «клеточным топливом». При окислении 1 г жира выделяется 39 кДж энергии, что в два раза больше, чем при окислении 1 г углеводов;

— *резервная*. Липиды являются наиболее компактной формой депонирования энергии в клетке. Они резервируются в адипоцитах – клетках жировой ткани;

— *защитная*. Обладая выраженными термоизоляционными свойствами, липиды предохраняют организм от термических воздействий; жировая прокладка защищает тело и органы животных от механических и физических повреждений; защитные оболочки в растениях (восковой налет на листьях и плодах) защищают от инфекции и излишней потери или накопления влаги;

— *регуляторная*. Некоторые липиды являются предшественниками витаминов, гормонов, в том числе гормонов местного действия. Кроме того, от состава, свойств, состояния мембранных липидов во многом зависит активность мемранно-связанных ферментов.

Липиды представляют собой разнородные в химическом отношении вещества. В связи с этим существуют разные подходы к их классификации. На рисунке 2.25 приведена классификация липидов, в соответствии с которой они сгруппированы в отдельные классы и группы на основании их химического строения и состава.

Определяющим признаком для первичной классификации липидов, приведенной выше, являются входящие в состав липидов многоатомные алифатические спирты, содержащие две или три гидроксильные группы.

**Жирные кислоты.** Многообразие и физико-химические свойства липидов в основном обусловлены наличием в их составе жирных кислот.

В природе обнаружено более 200 жирных кислот. Однако широкое распространение имеют не более 20, которым присущ ряд общих свойств и особенностей:

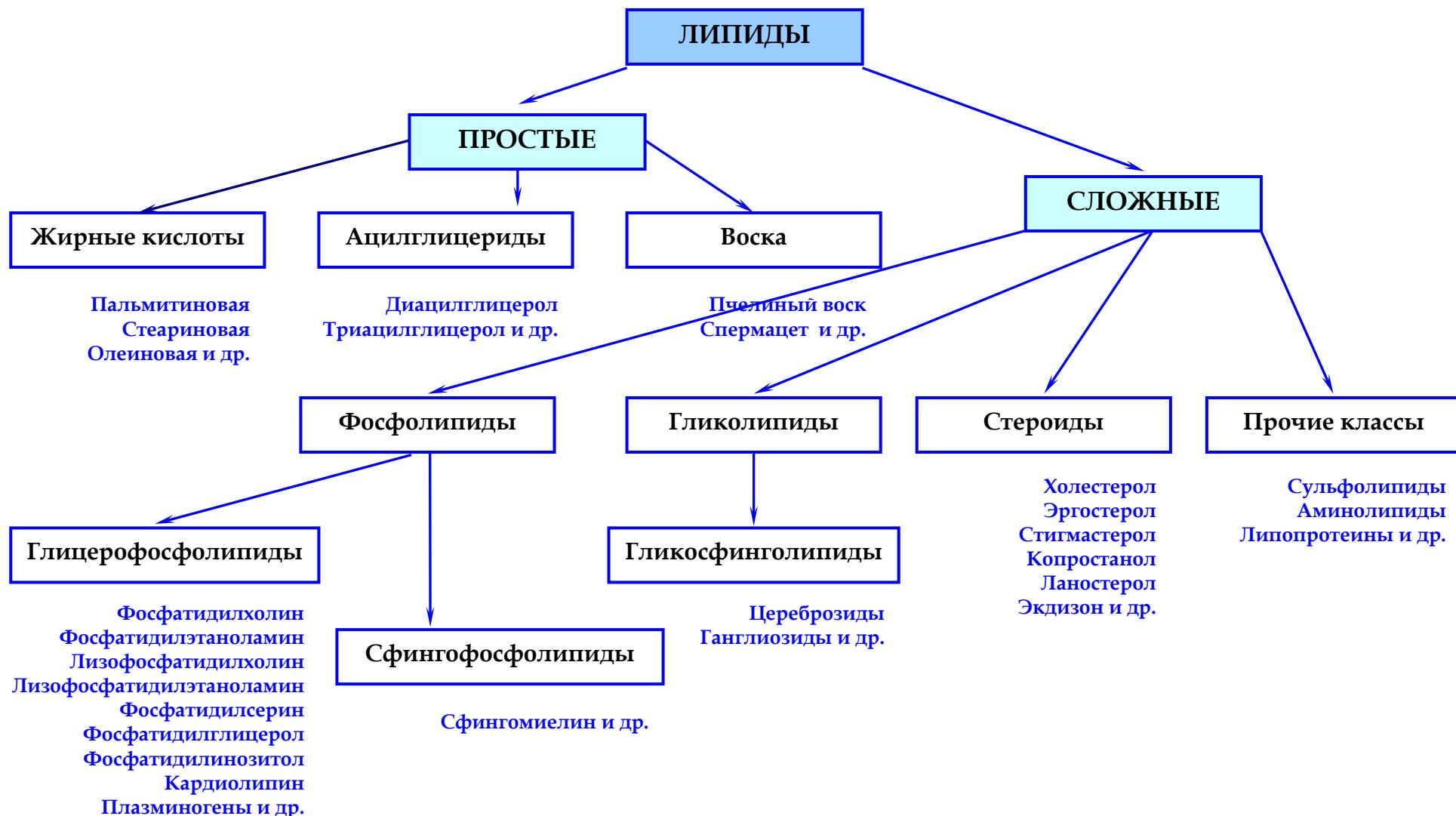


Рисунок 2.25 - Классификация липидов

—жирные кислоты, входящие в состав липидов высших растений и животных — это монокарбоновые кислоты, содержащие линейные углеводородные цепи (обычно  $C_{12}-C_{20}$ ) с общей формулой  $CH_3(CH_2)_nCOOH$ ;

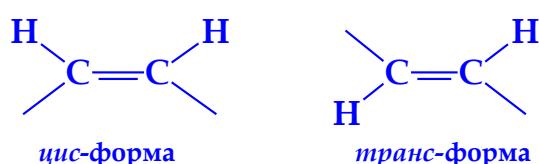
—жирные кислоты обычно содержат четное число атомов углерода ( $n$  — кратно 2). Однако в природе встречаются также кислоты с нечетным числом углеродных атомов;

—жирные кислоты могут быть как *насыщенными*, т.е. содержать в углеводородной цепочке только ковалентные связи, так и *ненасыщенными*, т.е. содержать одну и более ненасыщенных (этиленовых) связей. Они всегда разделены одной метиленовой группой:



Необходимо отметить, что на долю ненасыщенных кислот в природных липидах приходится примерно 3/4 всех жирных кислот.

—природные ненасыщенные жирные кислоты чаще имеют *цис*-конфигурацию, крайне редко в полиеновых кислотах встречается *транс*-конфигурация:



В таблице 2.4 приведены названия и структурные формулы некоторых наиболее распространенных высших жирных кислот.

**Таблица 2.4 - Некоторые физиологически важные высшие жирные кислоты**

Число атомов углерода в цепи	Тривиальное название	Систематическое название
<b>Насыщенные жирные кислоты</b>		
$C_{16}$ $CH_3-(CH_2)_{14}-COOH$	пальмитиновая	гексадекановая
$C_{18}$ $CH_3-(CH_2)_{16}-COOH$	стеариновая	октадекановая
<b>Моноеновые жирные кислоты</b>		
$C_{18}$ $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$	олеиновая	9-октадеценовая
<b>Полиеновые жирные кислоты</b>		
$C_{18}$ $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$	линолевая	9,12-октадекадиеновая
$C_{18}$ $CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$	линоленовая	9,12,15-октадекатриеновая
$C_{20}$ $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_3-COOH$	арахидоновая	5,8,11,14-эйкозатетраеновая

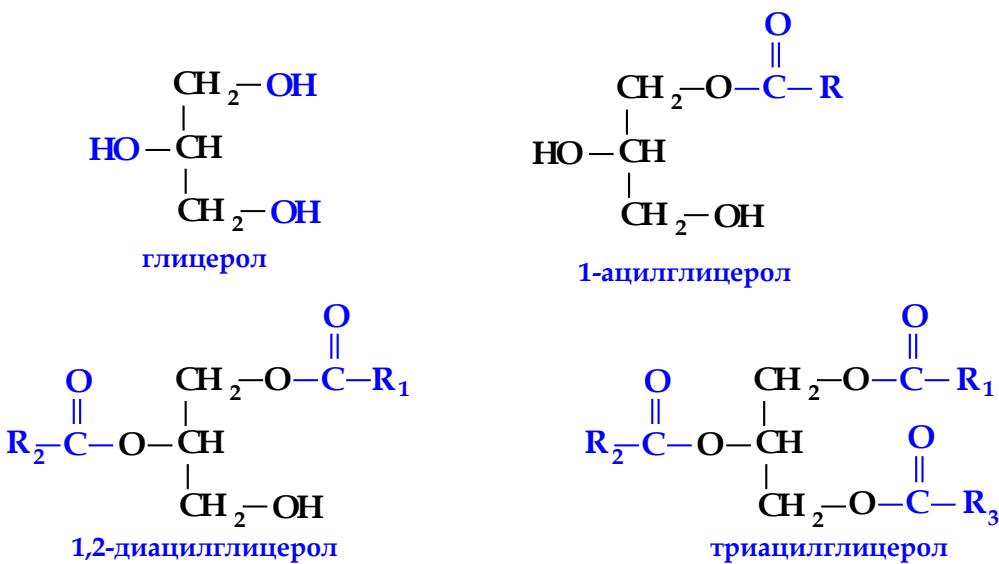
Большое число неполярных связей C—C и C—H в углеводородной цепи жирных кислот придает неполярный характер молекуле липида в целом, хотя в ней имеется полярная, заряженная, группа — COO<sup>-</sup>. Неполярность высших жирных кислот является причиной нерастворимости липидов в воде.

*Цис*-конфигурация двойной связи придает углеводородной цепи укороченный вид за счет ее изгиба. Введение *цис*-этиленовой связи существенно влияет на свойства жирных кислот. Так, например, с увеличением числа двойных связей значительно снижается температура плавления жирных кислот, возрастает их растворимость в неполярных растворителях.

Линолевая, линоленовая и другие полиеновые кислоты не синтезируются в организме высших животных и человека и должны поступать в организм с пищей. В связи с тем, что эти кислоты необходимы для нормальной жизнедеятельности организма, их относят к незаменимым (эссенциальным) жирным кислотам или чаще комплекс этих кислот объединяют в группу витаминов F.

Особая роль в организме принадлежит 20-углеродным (эйкозановым) ненасыщенным кислотам (арахидоновой и дигомо- $\gamma$ -линоленовой), являющимся предшественниками тканевых гормонов (эйкозаноидов, простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов).

*Ацилглицеролы, или нейтральные липиды*, — наиболее распространенная в природе группа липидов. Эти соединения представляют собой сложные эфиры жирных кислот и трехатомного спирта глицерола (глицириды), в котором могут быть этерифицированы одна, две или три гидроксильные группы глицерола с образованием соответственно моно-, ди- и триацилглицеролов:



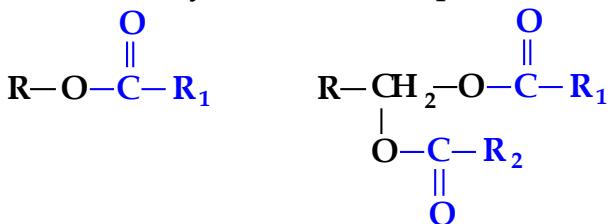
В природе наиболее часто встречаются триацилглицеролы. Поскольку все приведенные выше ацилглицеролы не содержат ионных групп, они относятся к нейтральным липидам. Если все три кислотных радикала принадлежат одной и той же жирной кислоте, то такие триацилглицеролы называют простыми, если же разным жирным кислотам — то смешанными.

Животные жиры обычно содержат значительное количество насыщенных жирных кислот, благодаря чему они при комнатной температуре остаются *твёрдыми*. Жиры, в состав которых входит много ненасыщенных кислот, будут при этих условиях *жидкими* - их называют *маслами*.

Для характеристики свойств жира используют константы, или жиро-ые числа, — кислотное число, число омыления, йодное число.

Нейтральные липиды играют важную роль в процессах метаболизма в организме. Триацилглицеролы жировой ткани являются самой компактной и энергоемкой формой хранения энергии, кроме того выполняют в подкожном слое роль физической защиты, термо- и электроизоляторов.

**Воска** — сложные эфиры высших жирных кислот и высших моноатомных или двухатомных спиртов.



Помимо эфиров, воска содержат свободные высшие жирные спирты, например цетиловый спирт и другие спирты с четным числом углеродных атомов (от  $C_{22}$ — $C_{32}$ ), а также свободные жирные кислоты с длинной углеводородной цепью (от  $C_{14}$  до  $C_{34}$ ).

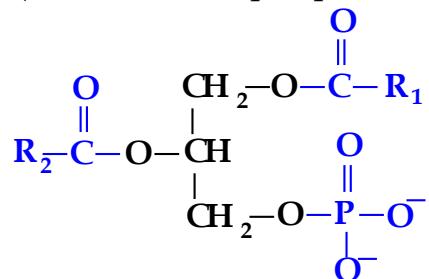
Спермацет, получаемый из головного мозга кашалотов, является сложным эфиром цетилового спирта (первичный спирт, соответствующий пальмитиновой кислоте) и пальмитиновой кислоты.

Воска выполняют в организме преимущественно защитную функцию, которая сводится к образованию защитных покрытий. Они входят в состав жира, покрывающего кожу, шерсть, перья. У растений около 80% от всех липидов, образующих пленку на поверхности листьев, составляют воска. Известно также, что воска являются нормальными метаболитами некоторых микроорганизмов.

**Фосфолипиды.** Общий признак всех фосфолипидов — наличие в их составе фосфорной кислоты. В зависимости от спиртового компонента они делятся на глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды.

#### Глицерофосфолипиды.

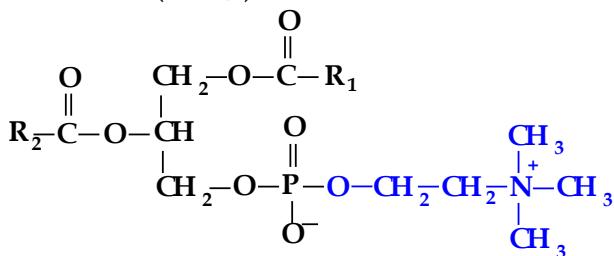
Общим структурным фрагментом всех глицерофосфолипидов является фосфатидная кислота (1,2-диацил,3-фосфоглицерол):



Молекулы фосфолипидов имеют гидрофобную часть, образованную радикалами жирных кислот, и гидрофильную — остатки фосфорной кислоты, аминокислот, аминоспиртов.

**Фосфатидилхолин (лецитин).** В своем составе содержит аминоспирт

холин (гидроксид 3-гидроксиэтилтритиаммония). В зависимости от того, с каким атомом углерода глицерола связана фосфорная кислота ( $\alpha$  – в крайнем положении,  $\beta$  – в срединном), различают два типа фосфатидилхолинов ( $\alpha$  и  $\beta$ ).

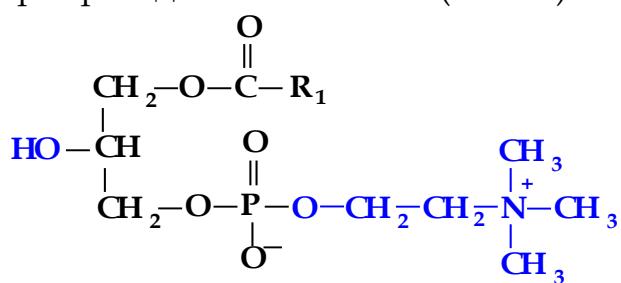


Фосфатидилхолины ( $\Phi X$ ) широко распространены в клетках, особенно мозговой ткани человека и животных; в растениях они встречаются в соевых бобах, семенах подсолнечника, зародышах пшеницы.

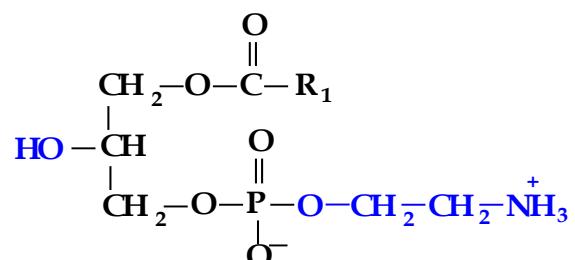
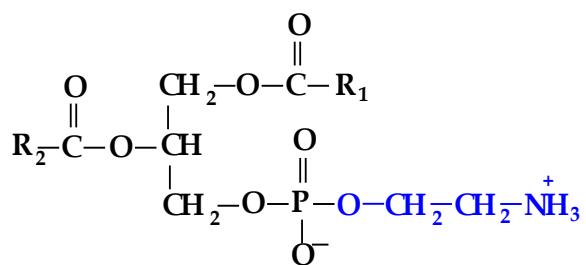
**Фосфатидилэтаноламин (кефалин).** В состав фосфатидилэтаноламинов ( $\Phi EA$ ) вместо холина входит азотистое основание этаноламин.

$\Phi X$  и  $\Phi EA$  являются главными липидными компонентами мембран клеток.

В результате гидролиза при действии специфичного фермента – фосфолипазы  $A_2$  в  $\Phi X$  или  $\Phi EA$  возможно отщепление остатка жирной кислоты с образованием лизоформ: лизофосфатидилхолина ( $\Lambda \Phi X$ ) и лизофосфатидилэтаноламина ( $\Lambda \Phi EA$ ):



лизосфатидилхолин



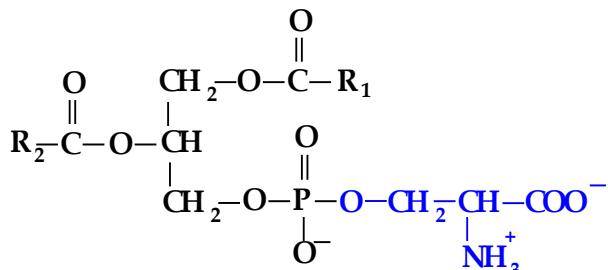
лизофосфатидилэтаноламин

**Фосфатидилсерин.** В молекуле фосфатидилсерина полярной группой является остаток аминокислоты серина.

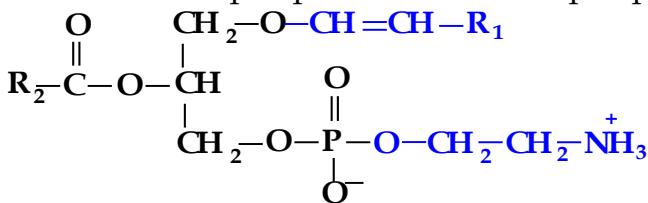
Фосфатидилсерины ( $\Phi C$ ) распространены менее широко, чем  $\Phi X$  и  $\Phi EA$ . Значение  $\Phi C$  определяется тем, что он является предшественником в синтезе двух других групп.

**Плазмалогены.** Известны также глициерофосфолипиды, которые в отличие от приведенных выше –  $\Phi X$ ,  $\Phi EA$ ,  $\Phi C$  – отличаются тем, что вместо остатка кислоты при атоме углерода С, они содержат  $\alpha$ -,  $\beta$ -ненасыщенный спирт, образующий простую эфирную связь с гидроксильной группой глицерола.

При гидролизе этой эфирной связи образуется альдегид соответствующего спирта. Отсюда название группы – фосфатидали: фосфатидаль-



этаноламин, фосфатидальхолин, фосфатидальсерин.

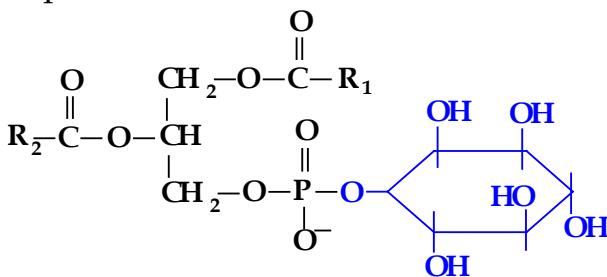


фосфатидальэтаноламин (плазмалоген)

состав бактериальных мембран, но практически не встречаются в растениях.

**Фосфатидилинозитол.** В отличие от других групп глицерофосфолипидов в состав фосфатидилинозитола вместо азотсодержащих соединений входит шестиуглеродный циклический спирт инозитол, представленный одним из его стереоизомеров — моноинозитолом.

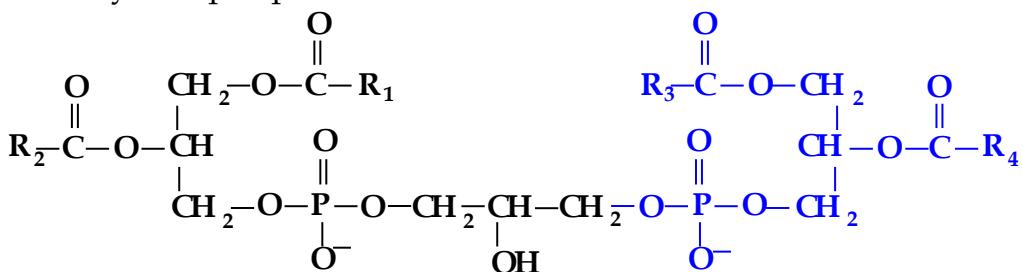
Фосфатидилинозитол входит в состав клеточных мембран животных, высших растений, различных микроорганизмов, особенно высоко его содержание в миелиновых оболочках нервных волокон.



фосфолипидах полярной группой служит еще одна молекула глицерола.

**Фосфатидилглициеролы и их аминокислотные производные** в значительном количестве содержатся в бактериальных мембранах, а также хлоропластах растений.

**Кардиолипин.** Этот фосфолипид можно рассматривать как производное фосфатидилглициерола, в котором 3-гидроксигруппа второго остатка молекулы глицерола этерифицирована молекулой фосфатидной кислоты.



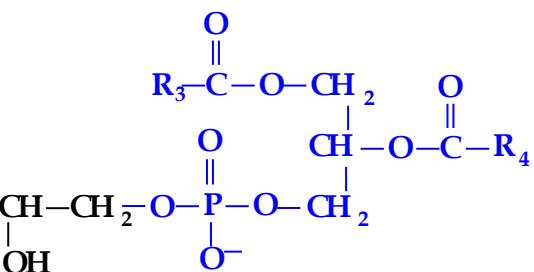
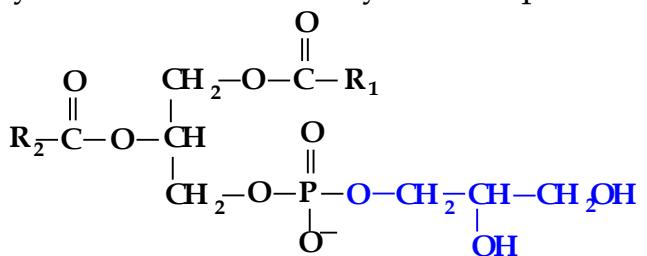
Кардиолипин локализован почти исключительно в митохондриях и играет важную роль в структурной организации и функционировании дыхательных комплексов. Кардиолипин является также обязательным компонентом бактериальных клеточных мембран и хлоропластов растений.

На долю плазмалогенов приходится до 10% фосфолипидов мозга и мышечной ткани. Они обнаружены также в эритроцитах, тканях некоторых беспозвоночных (до 25%), входят в

Важное значение имеют фосфорилированные производные фосфатидилинозитолов.

**Фосфатидилглицерол.** Так же как фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол не содержит азотсодержащего соединения. В этих

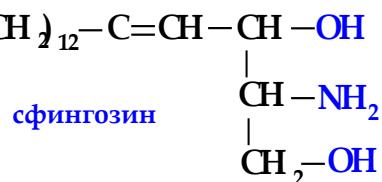
длятся еще одна молекула глицерола.



### *Сфингофосфолипиды.*

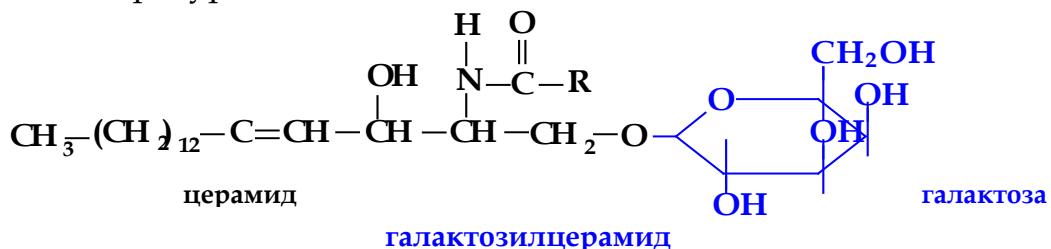
В составе соединений этого класса глицерола нет. Они являются производными сложного ненасыщенного дигидроксиаминоспирта – сфингозина или его насыщенного аналога – дигидросфингозина.

При ацилировании  $\text{H}_2\text{N}$ -группы сфингозина жирной кислотой образуется соединение – церамид, фосфохолиновое производное которого называется сфингомиелином. Сфингомиелины являются наиболее распространенными сфинголипидами, находятся в мембранах животных и растительных клеток. Особенность богата ими нервная ткань. Сфингомиелины обнаружены также в ткани почек, печени и других органов, входят в состав липидов крови.



**Гликолипиды (гликосфинголипиды).** Липиды этого класса, подобно сфингомиелинам, являются производными церамидов, спиртовая группа которых гликозилирована остатками одного или нескольких углеводов. В зависимости от состава углеводного компонента их делят на цереброзиды и ганглиозиды.

**Цереброзиды** – это церамидомоносахарида, к ним относятся галактозил-церамиды и глюкозилцерамиды. Гликозидная связь с углеводом имеет обычно Р-конфигурацию.



Галактозилцерамид является основным гликолипидом мозговой и нервной тканей, содержит различные жирные кислоты, в том числе цереброновую ( $\text{C}_{24}$ ), являющуюся гидроксикислотой. В результате сульфатирования галактозилцерамида он превращается в сульфатид.

**Ганглиозиды** представляют собой более сложные сфинголипиды, чем цереброзиды. В их состав входят сфингозин, жирная кислота, один или несколько углеводов (D-глюкоза, D-галактоза, N-ацетилглюказамин, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилнейраминовая кислота и др.).

Ганглиозиды в больших количествах находятся в нервной ткани. В северном веществе мозга ганглиозиды составляют около 6% мембранных липидов. Ганглиозиды выполняют рецепторные функции. Они активно участвуют в контроле и регуляции межклеточных контактов, рецепции.

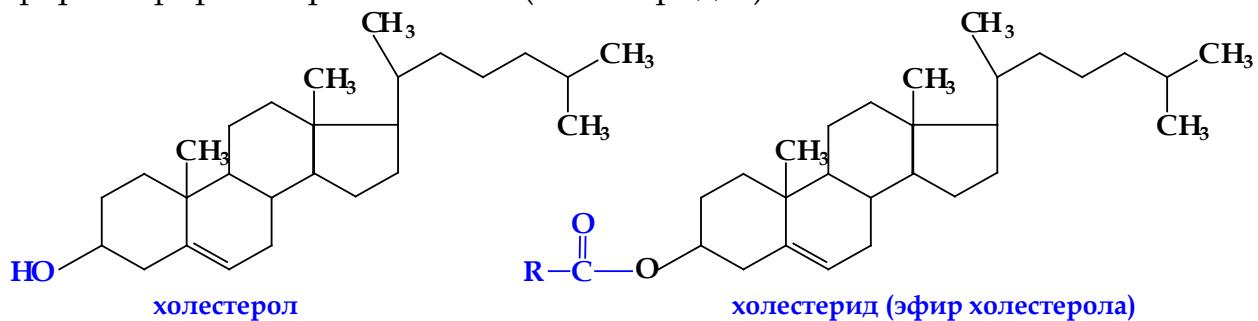
**Стероиды** являются производными циклопентанпергидрофенантрена, содержащего три неподеленные конденсированных насыщенных циклогексановых и одно циклопентановое кольцо.

К стероидам относится большое количество биологически важных соединений: собственно стеролы (или стерины), витамины группы D, поло-

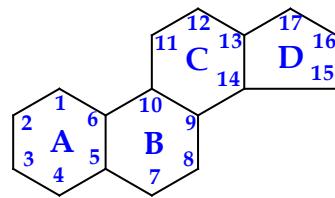
вые гормоны, гормоны коры надпочечников, зоо- и фитоэкстериоидные гормоны, сердечные гликозиды, растительные сапонины и алкалоиды, некоторые яды и др.

Классификация стероидов основана на структуре заместителя у C-17 углеродного атома (длина углеродной цепи), числе и положении гидроксигрупп, степени ненасыщенности.

Наиболее известный среди стеролов — холестерол, содержащийся почти во всех тканях организма. Особенно много его в центральной и периферической нервной системе, подкожном жире, почках и др. Холестерол является одним из главных компонентов цитоплазматической мембраны, а также липопротеинов плазмы крови. В липопротеиновых фракциях крови примерно только одна треть его находится в виде спирта, а две трети — в форме эфиров жирных кислот (холестеридов):



Холестерол служит исходным предшественником для синтеза всех стероидов, функционирующих в организме, — половых гормонов и гормонов коркового слоя надпочечников (кортикоидов), желчных кислот, витамина D<sub>3</sub>. Кроме этого, холестерол, входящий в состав клеточных мембран, оказывает существенное влияние на состояние мембраны и таким образом участвует в регуляции ее проницаемости. Много холестерола содержится в молоке, сливочном масле, яичном желтке.



цикlopентанпергидрофенантрен

## 2.6. ГОРМОНЫ И ВИТАМИНЫ

**Гормоны** (от греч. «hormao» – «возбуждаю») – это органические молекулы, которые синтезируются в клетках эндокринных желез, транспортируются кровью к тканям и клеткам-мишеням, где выполняют физиологобиохимические регуляторные функции. Молекулы гормонов распознаются рецепторами клеток-мишенией, влияют на синтез ферментов в клетке *de novo* или изменяют активность ферментов, уже имеющихся в клетке.

Эволюционно сформировались четыре системы регуляции, выполняющие функции координации тканевых ответов на изменения среды, а также осуществляющие взаимосвязь между клетками, тканями и органами.

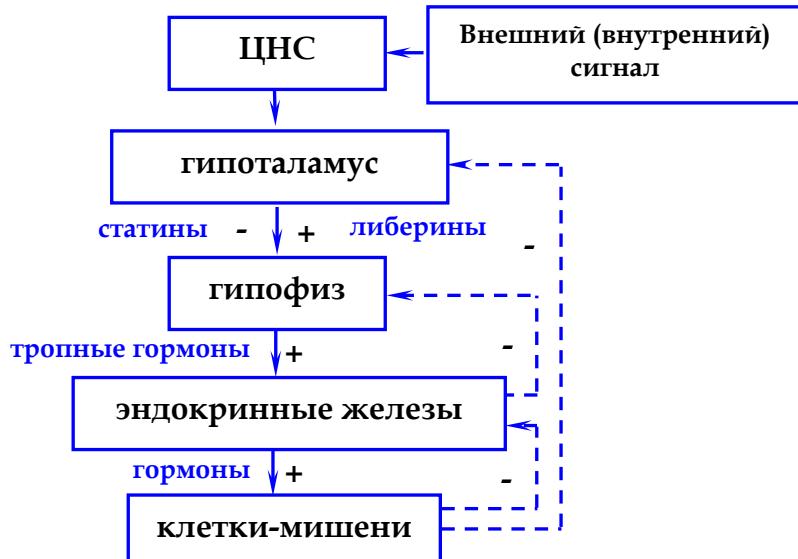
1. Центральная и периферическая нервная система, осуществляющая проведение быстрого сигнала посредством нервных импульсов и нейромедиаторов.

2. Эндокринная система, использующая в качестве мобильных химических посредников переносящих сигналы - гормоны. Скорость сигналов относительно низка и ограничена скоростью диффузии гормонов с кровью.

3. Паракринная и аутокринная системы, осуществляющие регуляцию через различные соединения, которые секретируются в межклеточное пространство и взаимодействуют с рецепторами клеток (например, эйкозаноиды, гормоны ЖКТ, гистамин).

4. Иммунная система, действующая через специфические белки (антитела, Т-рецепторы, цитокины).

Синтез и секреция гормонов стимулируются внешними и внутренними сигналами, поступающими в ЦНС. Эти сигналы по нервным связям поступают в гипоталамус, где стимулируют синтез пептидных гормонов (рилизинг-факторов) – либеринов и статинов (рисунок 2.26).



«+» (сплошные стрелки) и «-» (пунктирные стрелки) – стимуляция и подавление синтеза и секреции гормонов

Рисунок 2.33 - Взаимосвязь регуляторных систем организма

Либерины и статины транспортируются в переднюю долю гипофиза, где стимулируют или тормозят синтез тропных гормонов. Тропные гормоны гипофиза стимулируют синтез и секрецию гормонов периферических эндокринных желез, которые поступают в общий кровоток. Изменение концентрации метаболитов в клетках-мишениях подавляет синтез гормонов по механизму отрицательной обратной связи, действуя либо на эндокринные железы, либо на гипоталамус. Синтез и секреция тропных гормонов подавляется гормонами периферических желез.

Имеются несколько вариантов классификации гормонов, которые наглядно изображены на рисунке 2.27. Однако наиболее приемлемыми среди них являются классификация гормонов по химическому строению (белково-пептидные, стероидные гормоны и т.д.) и по месту их синтеза (гормоны гипоталамуса, гипофиза и т.д.).

В соответствии с предложенной классификацией различают также три типа сигнальных молекул:

1) *нейромедиаторы (нейротрансмиттеры)*, представляющие собой органические сигнальные молекулы, действующие в пределах того синапса, в который они освобождаются проводником (например: ацетилхолин, норадреналин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота);

2) *истинные (классические) гормоны*, обладающие дистантным действием и регулирующие обмен веществ и физиологические функции в организме (рост клеток и тканей, их дифференцировку, кровяное давление, работу репродуктивной системы, адаптационные механизмы и др.);

3) *тканевые гормоны* (гормоны местного действия), которые вырабатываются, связываются с рецепторами и инактивируются в пределах ограниченного участка ткани или органа (например: простагландины, лейкотриены и др.).

**Механизмы передачи гормонального сигнала.** Несмотря на большое количество гормонов, обладающих разнообразными функциями и имеющих различные структуры, механизмы их действия на клетки-мишени в значительной степени унифицированы. Выделяют три основных механизма действия гормонов: мембранный (локальный), мембрально-внутриклеточный (или опосредованный) и цитозольный (прямой).

**Мембранный механизм.** Данного типа действия гормонов, заключающийся в избирательном изменении проницаемости плазматической мембраны, реализуется в месте связывания гормона с мембраной. По механизму действия гормон в данном случае выступает как аллостерический эффектор транспортных систем мембраны. Так, например, обеспечивается трансмембранный перенос глюкозы под действием инсулина, аминокислот и некоторых ионов.

**Мембрально-внутриклеточный механизм.** Основные циклы первого этапа передачи гормонального сигнала протекают на плазматической мембране, далее перемещаясь в цитозоль клетки. Они связаны с узнаванием и трансформацией гормонального сигнала и осуществляются при помощи сложной надмолекулярной системы в несколько этапов.

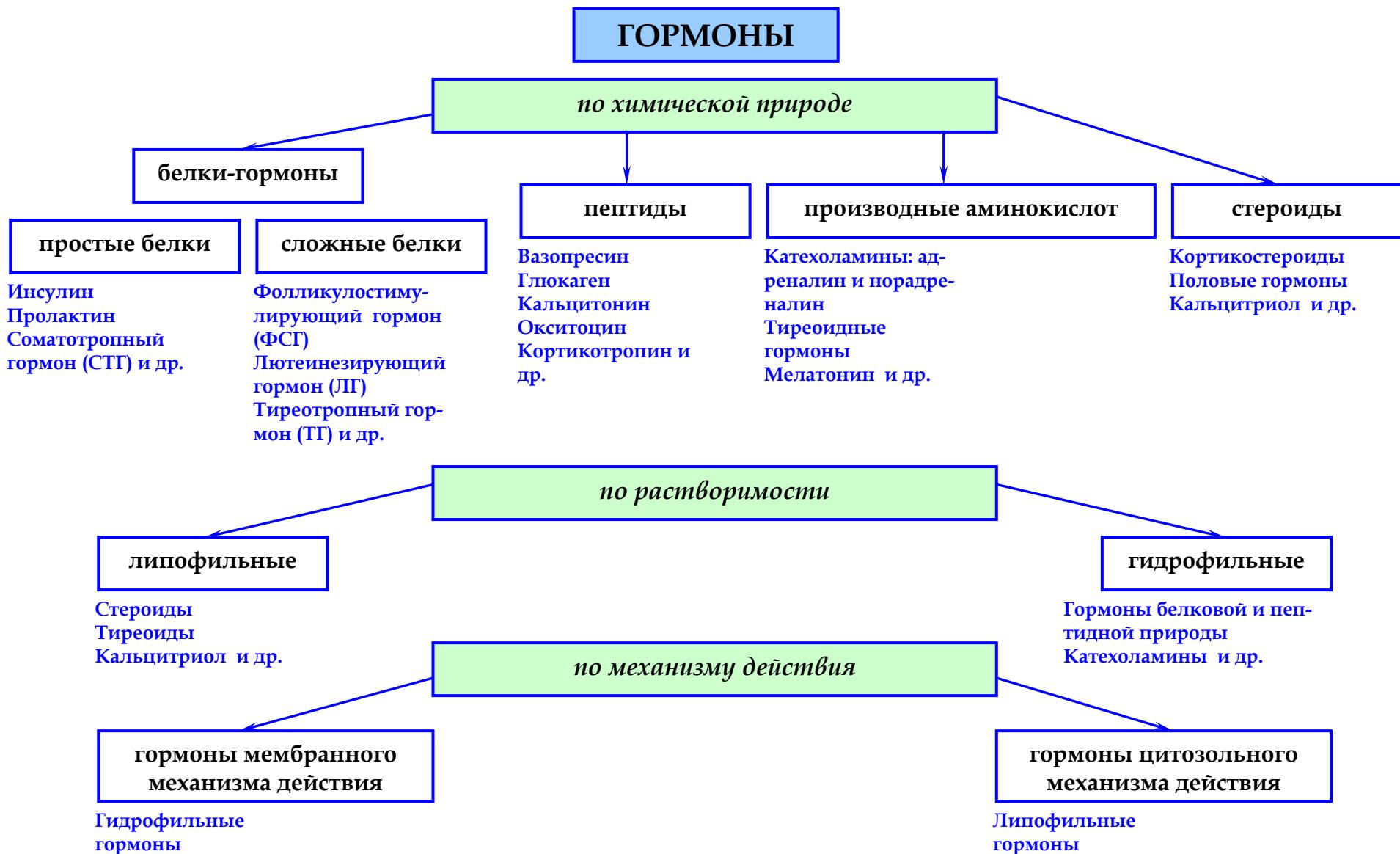
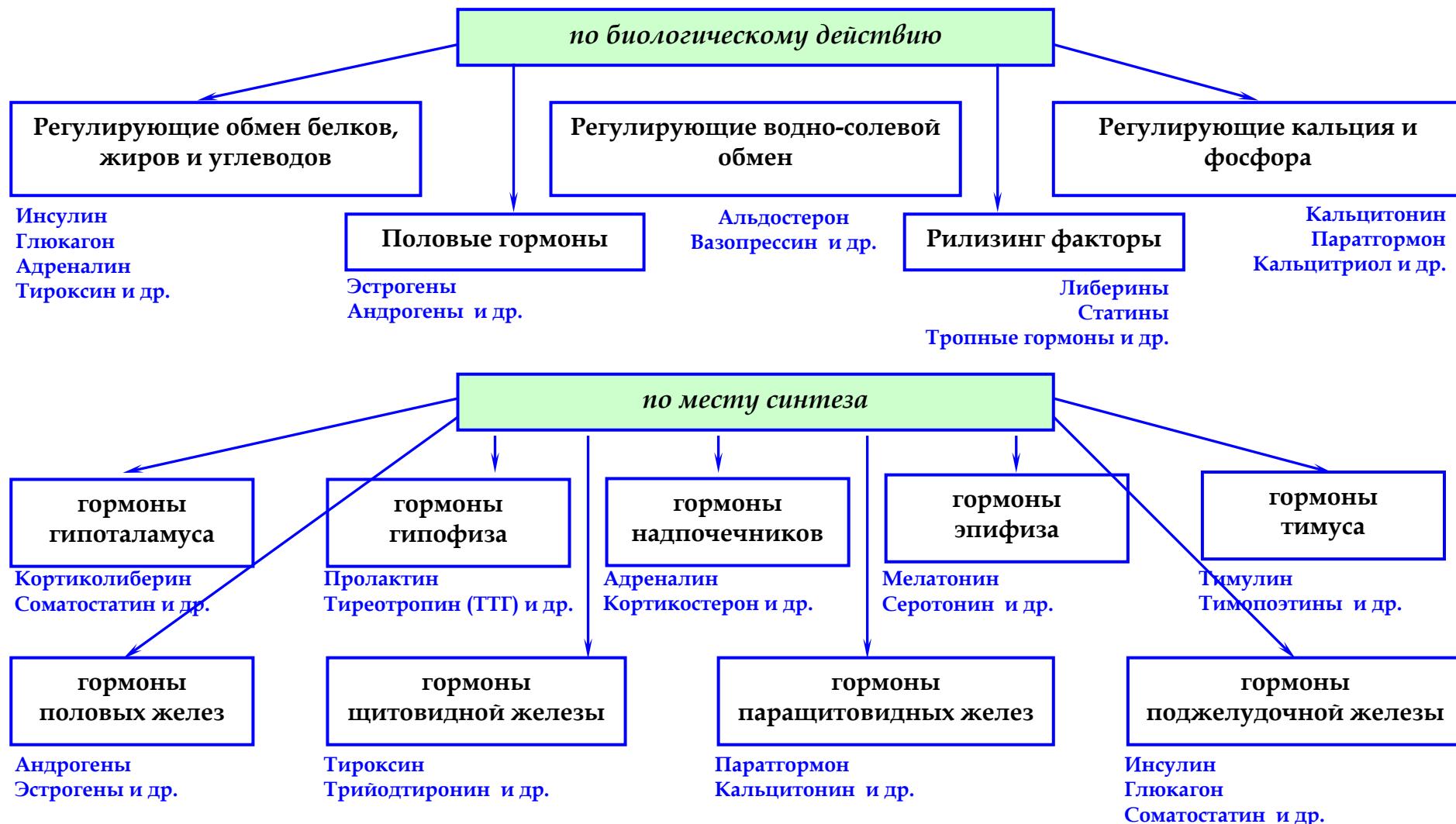


Рисунок 2.27 - Классификация гормонов

Окончание рисунка 2.27



В механизме действия ряда гидрофильных гормонов ключевую роль играет вторичный посредник (мессенджер) – циклический АМФ (цАМФ), или циклический ГМФ (цГМФ), образующиеся из АТФ и ГТФ при участии ферментов аденилатциклазы и гуанилатциклазы. Различные гормоны увеличивают, либо снижают внутриклеточный уровень цАМФ (цГМФ). Ответ тканей на действие гормонов осуществляется через уникальные для каждого гормона рецепторы, сопряженные с одним и тем же ферментом – *аденилатциклазой*.

Схема функционирования аденилатциклазной и гуанилатциклазной систем включает несколько этапов, схематически изображенных на рисунке 2.28.

При связывании гормона с рецептором конформация последнего изменяется так, что гормон-рецепторный комплекс связывается с ГГФ- зависимым белком (G-белком) внутри мембраны. Происходит активация G-белка, и он оказывает влияние на аденилатциклазу (активирует или ингибирует).

Активная аденилатциклаза, локализованная на внутренней поверхности плазматической мембраны, катализирует образование цАМФ из АТФ в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ . Образующийся вторичный посредник (цАМФ) является аллостерическим эффектором фермента протеинкиназы, состоящего из четырех субъединиц: двух регуляторных (2R) и двух катализических (2C).

В ассоцииированном состоянии протеинкиназа неактивна. Присоединяя четыре молекулы цАМФ, протеинкиназа диссоциирует на 2R- и 2C-субъединицы, при этом открывается активный центр катализической субъединицы. Фермент катализирует фосфорилирование ряда белков с образованием фосфопroteинов путем переноса фосфатной группы от АТФ ( $Mg^{2+}$ ) на остаток серина или треонина в различных белках. В результате фосфорилирования изменяется функциональная активность этих белков.

Действие гормонов, опосредованное увеличением концентрации цАМФ, может быть прекращено путем гидролиза цАМФ фосфодиэстеразами.

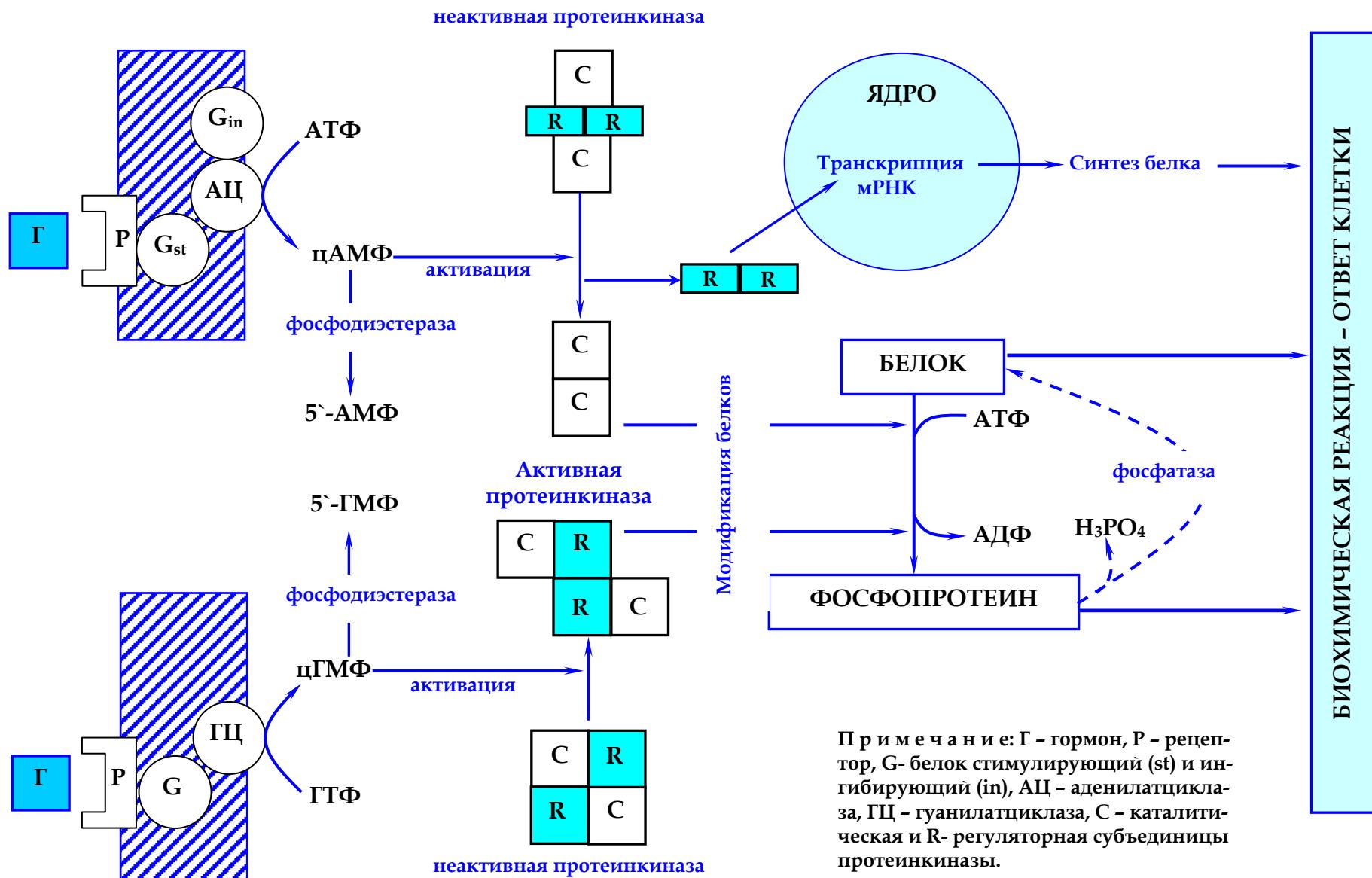
Еще один способ контроля гормонального эффекта – регуляция процесса дефосфорилирования белков под действием фосфопroteинфосфатаз.

Таким образом, эффект влияния цАМФ на белки обусловлен процессами фосфорилирования – дефосфорилирования белков (ковалентная модификация).

*Гуанилатциклазная мессенджерная система*, подобно аденилатциклазной, основана на активации гуанилатциклазы и образовании цГМФ (рисунок 2.28).

Обнаружены две формы гуанилатциклазы – растворимая и мембранные связанные. Последняя, в результате гормонального сигнала катализирует синтез цГМФ в реакции:





**Рисунок 2.28 - Схематическое изображение мембрano-внутриклеточного механизма действия гормонов на метаболизм клеток, опосредованный циклическими нуклеотидами**

**$\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулиновая мессенджерная система.** Поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму клетки регулируется гормонами, селективно изменяющими проницаемость мембраны  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -АТФ-зависимым насосом, а также высвобождением депонированных в митохондриях и эндоплазматической сети ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Присоединение четырех ионов  $\text{Ca}^{2+}$  к молекуле белка кальмодулина приводит к резкому изменению конформации последнего и активации кальмодулин-зависимых ферментов.

**Цитозольный механизм.** Липофильные гормоны (стериоиды, тироксин) свободно проникают внутрь клетки через плазматическую мембрану, где взаимодействуют с высокоспецифическими рецепторами. Гормон-рецепторный комплекс в форме димера связывается в ядре с хроматином и индуцирует транскрипцию определенных генов. Усиление или подавление синтеза мРНК влечет за собой изменение концентрации специфических белков (ферментов), определяющих ответ клетки на гормональный сигнал (рисунок 2.29).

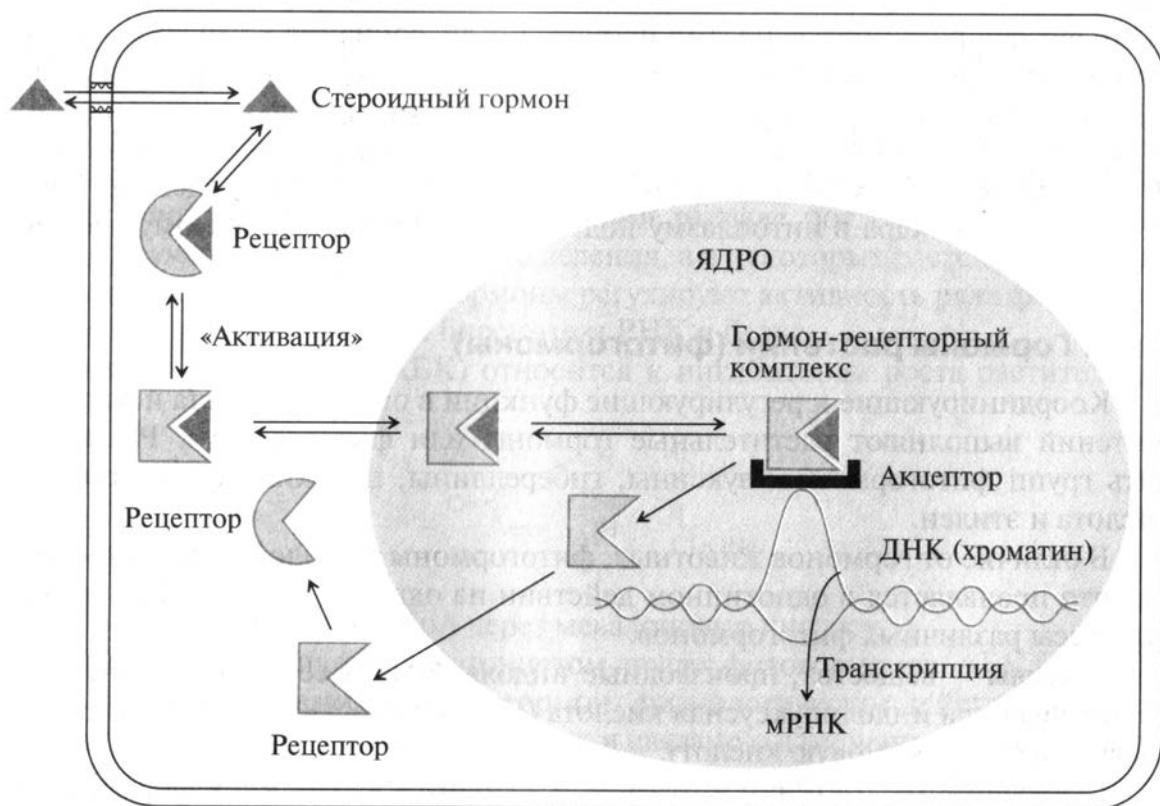


Рисунок 2.29 - Цитозольный механизм действия гормонов

Процесс экспрессии генов требует некоторого времени, поэтому ответ клетки на гормональный сигнал в данном случае будет отдаленным, но более продолжительным. Такая гормональная регуляция называется **хронической**.

Рецепторы гормонов принадлежат к группе специфических белков. Белки-рецепторы характеризуются высоким сродством к гормону и высокой избирательностью. Связывание гормона влечет за собой конформационную перестройку молекулы рецепторного белка, сопряженного с други-

ми белками. При этом происходит освобождение от белков-ингибиторов или образование димеров, обладающих повышенным сродством к ДНК.

Связывание гормона рецептором основано на том, что конформация какого-то участка молекулы гормона комплементарна участку молекулы рецептора (гормонсвязывающему домену). Сущность рецептора определяется двойной функцией – связыванием гормона и генерацией сигнала.

**Тканевые гормоны.** Тканевые гормоны синтезируются специализированными клетками различных тканей. По химической природе тканевые гормоны можно разделить на три группы:

- эйкозаноиды (производные арахидоновой кислоты: простагландины, тромбоксаны, лейкотриены);
- тканевые гормоны пептидной природы (гормоны ЖКТ: гастрин, секретин, холецистокинин, энтероглюкагон и др.);
- биогенные амины (производные аминокислот: гистамин, серотонин, дофамин, эцетилхолин и др.).

Механизм действия, биохимический и физиологический эффекты, вызываемые тканевыми гормонами подобны тем, что были описаны выше. Единственным отличием остается их местный эффект в области выделения, а также относительно малый период их жизни.

**Витамины** – низкомолекулярные органические вещества, поступающие в организм с пищей извне и участвующие в регуляции биохимических процессов на уровне ферментов. Они не являются компонентами живой материи и не используются в качестве источников энергии.

Для характеристики обеспеченности организма какими-либо витаминами принято различать три формы: авитаминоз, гиповитаминоз и гипервитаминоз.

**Авитаминоз** – состояние организма, возникающее при полном отсутствии поступления витамина или витаминов с пищей. Если витамин поступает с пищей, однако его количества для организма не хватает, то в таком случае говорят о *гиповитаминозе*. Его можно рассматривать как начальную стадию авитаминоза. Кроме того, развитие гиповитаминоза может быть связано не только с несбалансированным питанием, но и с нарушениями всасывания витаминов при патологиях ЖКТ или печени, при различных эндокринных или инфекционных заболеваниях.

**Гипервитаминоз** – комплекс патофизиологических и биохимических нарушений, возникающих вследствие длительного избыточного поступления в организм любого из витаминов.

Современная классификация витаминов основана на физико-химических свойствах (в частности, растворимости) или на химической природе витаминов. В зависимости от растворимости в неполярных органических растворителях или в водной среде различают *жирорастворимые* и *водорастворимые витамины*. В приводимой классификации витаминов, помимо буквенного обозначения, в скобках указан основной биологический эффект, иногда с приставкой «анти», указывающей на способность

данного витамина предотвращать или устранять развитие соответствующего заболевания; далее приводится номенклатурное химическое название каждого витамина.

**Жирорастворимые витамины (группы):**

1. Витамин А (антиксерофталмический); ретинол
2. Витамин D (антирахитический); кальциферолы
3. Витамин К (антигеморрагический); нафтохиноны
4. Витамин Е (антистерильный, витамин размножения); токоферолы

**Водорастворимые витамины (группы):**

1. Витамин В<sub>1</sub> (антиневритный); тиамин
2. Витамин В<sub>2</sub> (витамин роста); рибофлавин
3. Витамин В<sub>3</sub> (антидерматитный); пантотеновая кислота
4. Витамин В<sub>6</sub> (антидерматитный, адермин); пиридоксин
5. Витамин В<sub>12</sub> (антианемический); цианкобаламин; кобаламин
6. Витамин РР (В<sub>5</sub>) (антипеллагрический, ниацин); никотинамид
7. Витамин В<sub>c</sub> (В<sub>9</sub>) (антианемический); фолиевая кислота
8. Витамин Н (антисеборейный, фактор роста бактерий, дрожжей и грибков); биотин
9. Витамин С (антискорбутный); аскорбиновая кислота
10. Витамин Р (капилляроукрепляющий, витамин проницаемости); рутин, биофлавоноиды.

Помимо этих двух главных групп витаминов, выделяют группы *витаминоподобных соединений* и антивитаминов. К первым относят холин, липоевую кислоту, витамин В<sub>15</sub> (пангамовая кислота), оротовую кислоту, инонзит, убихинон, парааминобензойную кислоту, карнитин, линолевую и линоленовую кислоты, витамин U (противоязвенный фактор) и ряд других.

**Антивитамины** – специфические антагонисты незаменимых пищевых факторов, снижающие биологическую активность витаминов. В данной группе выделяют:

—антивитамины, сходные по структуре с нативными витаминами и оказывающие действие на основе конкурентных взаимоотношений с ним;

—антивитамины, вызывающие изменения в химической структуре витаминов и затрудняющие их всасывание или транспорт .

Жирорастворимые витамины нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в жирах и маслах. Они относительно стабильны при обычной температуре, но разрушается при УФ-облучении или при окислении. В процессе всасывания жирорастворимых витаминов активную роль играют желчные кислоты и пищевой жир, в их транспорте – липопротеины и специфические транспортные белки. Жирорастворимые витамины могут депонироваться в печени и частично в жировой ткани. Потому гипервитаминозы характерны именно для жирорастворимых витаминов.

Метabolизм большинства водорастворимых витаминов имеет много общего. Всасывание витаминов происходит в кишечнике, запасаются они в связанном с ферментами или транспортными белками виде. Если уровень

водорастворимых витаминов превышает пороговый, они легко выводятся из организма вместе с мочой.

Водорастворимые витамины в основном относятся к **энзимовитаминам**, т.е. к элементам, выполняющим коферментные функции. Чаще всего витамины в коферментной форме представляют собой нуклеотиды или нуклеотидподобные вещества.

Исследователями было отмечено, что витамины, взаимодействуя друг с другом, могут быть *синергистами*, т.е. усиливать биологическое действие друг друга, или *антагонистами*, т.е. угнетать действие друг друга. К витаминам-синергистам относятся: витамины В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub>, витамины группы А и Е, тиамин и аскорбиновая кислота. К витаминам-антагонистам (в отношении некоторых эффектов) можно отнести: витамины А и К, В<sub>6</sub> и Е, С и В<sub>12</sub>, РР и В<sub>12</sub>, В<sub>1</sub> и В<sub>6</sub>.

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что такое белки или протеины? Какова их роль в клетке и организме?
2. Перечислите основные функции белков.
3. Дайте определение аминокислоте. На чем основана современная классификация аминокислот?
4. Что такое незаменимые и заменимые аминокислоты? Перечислите их.
5. Охарактеризуйте основные уровни пространственной организации белков.
6. На чем основана классификация белков? Перечислите основные классы белков.
7. Дайте характеристику основным физико-химическим свойствам белков (заряд, растворимость, молекулярный вес, форма молекул, денатурация, изоэлектрическая точка).
8. Что такое ферменты (энзимы)?
9. Охарактеризуйте строение сложных ферментов.
10. Что такое активный, связывающий, аллостерический центры ферментов?
11. Что такое изоферменты и мультиферменты? Приведите примеры.
12. На чем основана современная классификация ферментов? Перечислены классы ферментов, дайте им краткую характеристику.
13. Что такая специфичность действия ферментов? Какие виды специфичности ферментов Вы знаете?
14. Дайте определение энергии активации и свободной энергии.
15. Дайте определение ингибиторам и активаторам ферментов.
16. Что такое углеводы? Каковы их функции?
17. Какие классы углеводов Вы знаете? Дайте им краткую характеристику.

18. Дайте определение нуклеиновым кислотам. Какие виды нуклеиновых кислот Вы знаете? Охарактеризуйте их строение и свойства.
19. Какова роль ДНК в клетке?
20. Опишите строение и свойства основных видов РНК.
21. Что такое липиды? Какова их роль в клетке и организме?
22. Опишите строение и свойства основных классов липидов.
23. Что такое гормоны? Опишите основные принципы, положенные в основу классификации гормонов.
24. Дайте характеристику основным механизмам передачи гормонального сигнала.
25. Дайте определение витаминам, авитаминам, витаминоподобным веществам, авитаминозу, гипо- и гипервитаминозу.

## РАЗДЕЛ II. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В ЖИВОМ ОРГАНИЗМЕ

---

### ГЛАВА 3. БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ

---

#### 3.1. БИОСИНТЕЗ ДНК (РЕПЛИКАЦИЯ)

Процесс биосинтеза дочерней ДНК на ее матрице, приводящий к ее удвоению носит название *репликации*. Для реализации этого процесса необходима матрица – расплетенная цепь ДНК, субстраты, участвующие в полимеризации ДНК, ферменты, катализирующие этот процесс, ионы  $Mg^{2+}$ , а также ряд белковых факторов, обеспечивающих деспирализацию двухнитевой ДНК.

Как и любой процесс, репликация протекает в несколько этапов: инициация, элонгация и терминация репликации.

##### **Инициация репликации ДНК.**

Репликация всегда предшествует делению клетки и начинается с расплетения двойной спирали ДНК. Это осуществляется при помощи ферментов хеликаз, которые перемещаются вдоль цепей ДНК и раскручивают их. Процесс расплетения спиралей ДНК является энергозависимым и требует затраты АТФ. Интенсивное раскручивание ДНК может привести к образованию дополнительных витков (сверхспиралей), которые легко предотвращаются ферментами топоизомеразами. Синтез новой цепи ДНК осуществляется при помощи ДНК-полимераз.

##### **Элонгация репликации ДНК.**

На следующем этапе репликации от 3'-конца цепи ДНК начинается синтез новой цепи нуклеиновой кислоты при помощи ДНК-полимеразы III. Синтез идет в направлении 5'→3' одновременно на обеих цепях матрицы. Поскольку цепи молекулы ДНК антипараллельны, только одна из новых цепей синтезируется непрерывно – эта цепь называется *лидирующей*. Цепь, направление синтеза которой противоположно движению репликативной вилки, называют *отстающей*, и синтез этой цепи имеет прерывистый характер (рисунок 3.1).

В процессе репликации на отстающей цепи образуется множество короткоцепочечных фрагментов, которые носят название *фрагментов Оказаки*. Их величина у прокариот составляет около 1000 нуклеотидов, у эукариот – в три раза меньше.

##### **Терминация репликации.**

Заключительной фазой процесса репликации является стадия терминации, или окончания синтеза. У эукариот, как и у прокариот, имеются специальные терминаторы, прекращающие синтез цепи ДНК. Этими терминаторами являются определенные последовательности нуклеотидов, при

достижении которых ДНК-полимераза прекращается синтез новой цепи ДНК.

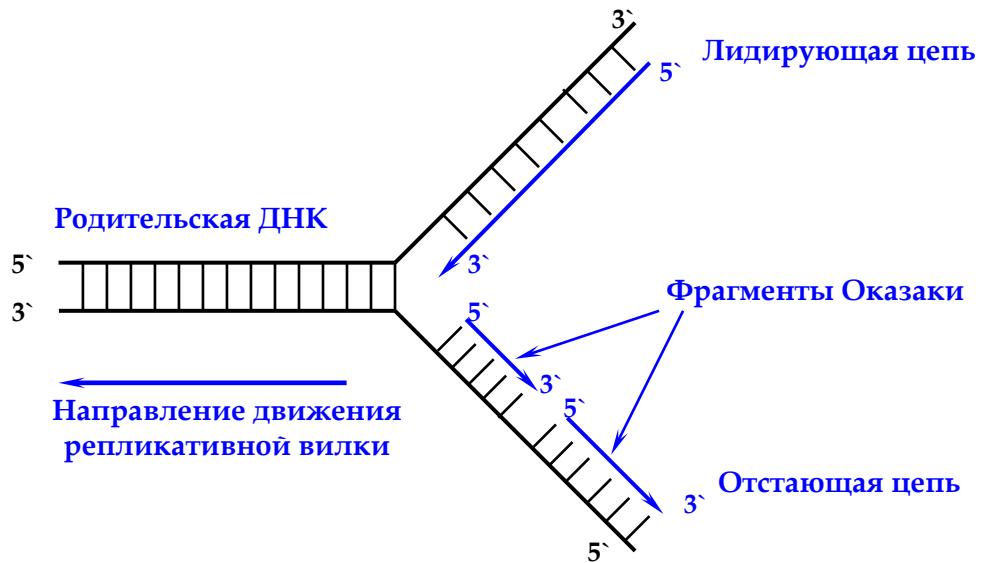


Рисунок 3.1 - Схематическое изображение репликативной вилки

Механизмы действия ДНК-полимераз эукариот и прокариот схожи между собой. Отличия в процессе репликации заключаются в следующем: хромосома эукариот имеет линейную структуру, на обеих цепях расположено множество репликонов и соответствующее количество терминаторов. Линейность ДНК эукариот является причиной проблем, которых не существует у прокариот, имеющих кольцевую ДНК. В отличие от лидирующей цепи, которая реплицируется полностью, праймер, находящийся у 3'-конца отстающей цепи, разрушается и не реплицируется при помощи ДНК-полимераз. Для предотвращения укорачивания цепи на концах хромосомы находятся теломеры – участки нереплицируемой ДНК. На этом участке ДНК может синтезироваться праймер, и полнота репликации сохранится. Теломера состоит из большого числа повторов, например у человека: ТТАГГГ.

### **3.2. БИОСИНТЕЗ РНК (ТРАНСКРИПЦИЯ)**

Процесс биосинтеза РНК па матрице ДНК получил название *транскрипции*. Субстратами и источниками энергии для синтеза всех видов РНК являются рибонуклеозидтрифосфаты: АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. Катализируют синтез РНК ферменты РНК-полимеразы. В ядрах эукариотов обнаружены три специализированные РНК-полимеразы: РНК-полимераза I, синтезирующая пре-рРНК; РНК-полимераза II, ответственная за синтез пре-мРНК; РНК-полимераза III, синтезирующая пре-тРНК.

В процессе транскрипции, как и в репликации, различают три стадии: инициацию, элонгацию и терминацию. Кроме того, сюда можно отнести посттранскриptionные изменения РНК

#### **Инициация транскрипции РНК.**

Инициация транскрипции является наиважнейшим фактором, определяющим начало синтеза РНК, его скорость и регуляцию.

Присоединение РНК-полимеразы к промотору определяет рамку считывания информации с матрицы ДНК. Активация промотора происходит с помощью белкового фактора (ТАТА-фактора), который облегчает взаимодействие промотора с РНК-полимеразой. Присоединение РНК-полимеразы к промотору увеличивает сродство фермента к факторам инициации (A, B), которые инициируют раскручивание примерно одного витка двойной спирали ДНК.

Далее к РНК полимеразе присоединяется кофермент, и образуется закрытый транскриptionный комплекс. В результате раскручивания цепей ДНК разрываются водородные связи междуарами нуклеотидов, и образуется открытый транскрипционный комплекс.

Сразу после начала транскрипции первый нуклеотид с 5'-конца подвергается модификации (метилированию гуанина), которая называется *кэпированием* (от англ. «сар» - кепка). Поэтому первый нуклеотид, старовая точка гена, называется *кэн-сайт*. Сигнал ААТААА (последняя последовательность, кодируемая РНК-полимеразой) способствует блокированию 3'-конца мРНК.

#### **Элонгация транскрипции РНК.**

Факторы элонгации (E, H, F) повышают активность РНК-полимеразы и облегчают локальное расхождение нуклеотидных цепей. Синтез молекулы РНК идет по направлению от 5`-конца к 3`-концу комплементарной матричной цепи ДНК.

После образования нескольких пар оснований происходит отделение РНК-полимеразы от транскрипционного комплекса, а водородные связи между нуклеотидами матрицы (цепь ДНК) вновь восстанавливаются. У прокариот частично синтезированная мРНК уже взаимодействует с рибосомами и вовлекается в процесс синтеза белка. В клетках эукариот синтез РНК и белка разобщен, кроме того, новосинтезированные транскрипты подвергаются посттранскрипционным модификациям.

#### **Терминация транскрипции РНК.**

Терминация синтеза РНК у прокариот обусловлена наличием на матрице таких последовательностей, которые допускают возможность образования шпильки на транскрипте РНК. При этом связь транскрипта с матрицей значительно ослабляется, что в конечном счете приводит к отделению РНК.

Механизмы терминации транскрипции у эукариот до конца не изучены. Полагают, что с РНК-полимеразой взаимодействует белковый стоп-сигнал, который замедляет (но не прекращает) транскрипцию. Далее фермент катализирует синтез последовательности ААУААА и следующие за ней 15 нуклеотидов, после чего завершает свою работу. В процессе отделения транскрипта от матрицы экзонуклеаза отщепляет терминальные 15 нуклеотидов, а фермент полиА-полимераза достраивает к последовательности ААУААА порядка 150 – 200 полиадениловых нуклеотидов (полиА).

### **Посттранскрипционный процессинг РНК.**

После завершения синтеза транскрипты отделяются от матрицы и подвергаются дальнейшим превращениям или посттранскрипционному процессингу, на первой стадии которого происходит фрагментация транскрипта. Затем наблюдается модификация фрагментов, и в частности их метилирование, а также защита 5'- и 3'-концов от действия экзонуклеаз.

В структуре мРНК имеется большое количество вставок, которые не имеют смыслового значения - *инtronы*, которые вырезаются из цепи мРНК в процессе ее созревания. Транслируемые участки называются *экзонами* и составляют цепь зрелой мРНК. Механизм точного вырезания инtronов (*процессинг*) и сшивания экзонов (*сплайсинг*) достаточно сложен.

Молекула мРНК у эукариотов моноцистронная, т. е. каждая молекула мРНК содержит информацию только об одном белке (молекула мРНК прокариот - полицистронна и содержит в себе информацию о нескольких белках). После завершения процессинга зрелые мРНК перемещаются через поры ядерной мембранны в цитоплазму при помощи специальных белков-переносчиков.

В процессе посттранскрипционных модификаций первичных транскриптов тРНК на 3'-конце молекулы формируется акцепторный участок (ЦЦА) для присоединения аминокислот, а в средней части молекулы – антикодон, т. е. триплет нуклеотидов, обеспечивающий взаимодействие тРНК с кодоном мРНК (см. рисунок 2.23).

В ходе посттранскрипционных модификаций пре-рРНК и связывания ее со специфическими белками образуется рибосома.

### 3.3. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА (ТРАНСЛЯЦИЯ)

Информация, заложенная в ДНК и РНК, реализуется в процессе синтеза белка. Нуклеотидная последовательность ДНК и мРНК представляют собой своеобразный генетический код всех белков клетки. Код заключается в определенной последовательности расположения нуклеотидов в молекуле нукleinовой кислоты. Кодом для включения аминокислоты в белковую молекулу служит *триплет* – участок ДНК (мРНК), состоящий из трех последовательно расположенных нуклеотидов. Каждой из 20 α-аминокислот соответствует определенный триплет, либо одной и той же аминокислоте соответствует несколько кодонов (например, для пролина, глутамина, аргинина и др.) (таблица 3.1).

Таблица 3.1 - Генетический код

		Второй нуклеотид триплета													
		А			Г			У			Ц				
Первый нуклеотид триплета	А	ААА	лиз	АГА	арг	АУА	иле	АЦА	тре	A	ала	А	асп	гл	Г
		ААГ		АГГ		АУГ	мет	АЦГ		Г		Г			У
		ААУ		АГУ		АУУ	иле	АЦУ		У		У			Ц
		ААЦ		АГЦ		АУЦ		АЦЦ		Ц		Ц			Ц
	Г	ГАА	глу	ГГА	гли	ГУА	вал	ГЦА	ала	A	сер	А	терм.	Г	
		ГАГ		ГГГ		ГУГ		ГЦГ		Г		Г		У	
		ГАУ		ГГУ		ГУУ		ГЦУ		У		У		Ц	
		ГАЦ		ГГЦ		ГУЦ		ГЦЦ		Ц		Ц		Ц	
	У	УАА	терм.	УГА	цис	УУА	лей	УЦА	сер	A	фен	А	тир	Г	
		УАГ		УГГ		УУГ		УЦГ		Г		Г		У	
		УАУ		УГУ		УУУ		УЦУ		У		У		Ц	
		УАЦ		УГЦ		УУЦ		УЦЦ		Ц		Ц		Ц	
	Ц	ЦАА	глин	ЦГА	арг	ЦУА	лей	ЦЦА	про	A	лей	А	гис	Г	
		ЦАГ		ЦГГ		ЦУГ		ЦЦГ		Г		Г		У	
		ЦАУ		ЦГУ		ЦУУ		ЦЦУ		У		У		Ц	
		ЦАЦ		ЦГЦ		ЦУЦ		ЦЦЦ		Ц		Ц		Ц	

П р и м е ч а н и е: терм – терминирующий кодон

Генетический код обладает рядом свойств, основными из которых являются:

- триплетность — одну аминокислоту кодируют три нуклеотида (триплет, или кодон);
- специфичность — триплет кодирует только одну аминокислоту;
- вырожденность — одну и ту же аминокислоту могут кодировать несколько триплетов;
- непрерывность — у всех организмов код линейный, односторонний и непрерывный;
- универсальность — у всех живых организмов генетический код

одинаков.

**Трансляция** – это процесс перевода последовательности оснований ДНК и соответствующей мРНК в последовательность аминокислот, объединенных в полипептидную цепь и составляющих первичную структуру белков.

Трансляция осуществляется в клетках при помощи сложной белок-синтезирующей системы. Отдельные компоненты которой ассоциируют в единую структуру по мере ее функционирования и разобщаются по окончанию синтеза. В состав белок-синтезирующей системы входят следующие элементы:

- рибосомы — нуклеопротеины, содержащие примерно 60% рибосомальной РНК и 40% различных белков;
- матричная РНК;
- транспортная РНК;
- белковые факторы и ферменты инициации, элонгации и терmination трансляции;
- набор 20  $\alpha$ -аминокислот;
- набор аминоацил-тРНК-сингтетаз, образующих аминоацил-тРНК;
- макроэргические соединения (АТФ и ГТФ);
- ионы  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ .

Последовательность событий при трансляции можно представить в следующем виде.

### **1. Активация и рекогниция аминокислоты.**

Большая часть пула аминокислот в цитоплазме клеток находится не в свободном состоянии, а в виде аминоацил-тРНК, что предохраняет аминокислоты от метаболических превращений. Образованию комплекса аминокислота-тРНК предшествует активация аминокислоты и нахождение соответствующей тРНК (*рекогниция*). Это происходит под действием фермента аминоацил-тРНК-сингтетазы. Эти ферменты имеют два активных центра, один из которых соответствует определенной тРНК, а другой строго специфичен соответствующей аминокислоте. Образование аминоацил-тРНК требует источника энергии в виде энергии макроэргов (АТФ).

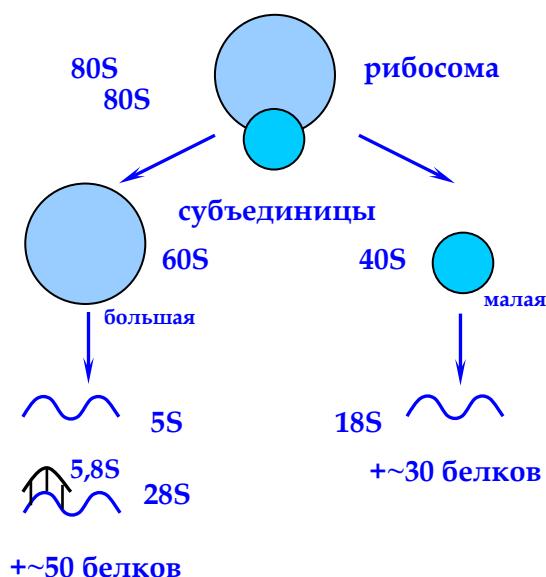
### **2. Инициация трансляции.**

Инициация трансляции начинается с момента присоединения формил-метионина (*fMet*), первой аминокислоты биосинтеза белка, к специфической тРНК-формил-мет, отличающейся от тРНК-мет, с помощью которой метионин включается в срединную часть полипептидной цепи.

Следующий момент инициации – образование инициирующего комплекса. Одним из его компонентов являются рибосомы. Они обладают катализитическими свойствами, образуя пептидную связь, а также выполняют функцию механического переноса пептидил-тРНК. Состав и структура рибосом схематически изображены на рисунке 3.2.

Для процесса трансляции весьма важно правильное положение инициирующего кодона мРНК в этом сайте, так как от этого зависит его попада-

ние в пептидильный (Р) центр полной рибосомы.



**Рисунок 3.2 - Структурная организация рибосом эукариот**

Энергию, необходимую для процессов комплексообразования, предоставляет ГТФ. При ассоциации малой и большой рибосомальных субчастиц происходит образование пептидильного (Р) и аминоацильного (А) центров трансляции, причем в пептидильном Р-центре находится инициирующий кодон мРНК, комплементарно соединенный с fMet-tРНК. В аминоацильном А-центре расположен только кодон мРНК. На этом стадия инициации завершается и наступает следующий этап трансляции – элонгация.

### 3. Элонгация трансляции.

Элонгация представляет собой образование и удлинение полипептидной цепи, формирующейся на рибосоме. Этот процесс проходит при участии ГТФ и факторов элонгации.

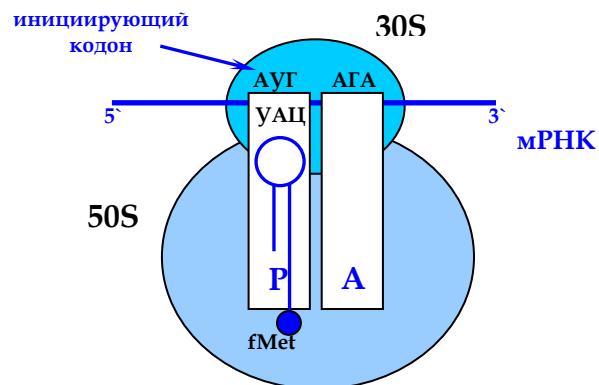
Процесс элонгации состоит из трех ступеней:

- узнавание кодона мРНК антикодоном тРНК, связывание аминоацил-тРНК в А-центре;
- образование пептидной связи;
- транслокация.

Узнавание кодона служит основой для точного последовательного синтеза полипептида и состоит этот процесс в комплементарном узнавании оснований 5`→3`, ориентированных кодонов мРНК, основаниями антикодона тРНК, ориентированных в направлении 3`→5`.

К рибосоме, у которой в Р-центре находится fMet-tРНК, в А-центре присоединяется новая аминоацил-тРНК. Выбор аминоацил-тРНК определяется строением кодона мРНК. Связывание происходит с использованием энергии ГТФ и при участии **фактора элонгации EF<sub>1</sub>**.

У 5'-конца мРНК имеется специальная последовательность нуклеотидов, комплементарная участку 18S, входящему в малую рибосомальную субчастицу. Взаимодействие этих комплементарных участков тРНК и мРНК ориентирует положение кодона в пептидильном сайте (рисунок 3.3).



**Рисунок 3.3 - Схематическое изображение инициирующего комплекса**

На следующей стадии элонгации синтезируется первая пептидная связь за счет реакции транспептидации, в ходе которой метионин от инициаторной тРНК переносится на  $\alpha$ -аминогруппу аминоацил-тРНК в А-центре с образованием дипептидил-тРНК. Катализирует данную реакцию РНК большой субъединицы рибосом. К настоящему времени обнаружена целая группа РНК, обладающая ферментативными свойствами, которая получила название *рибозимов*.

Конечной стадией процесса элонгации принято считать *транслокацию*. Сущность этого процесса состоит в том, что тРНК участка Р, не связанная с пептидом покидает рибосому, а молекула пептидил-тРНК переходит с участка А на участок Р, и рибосома перемещается вдоль мРНК на три нуклеотида в сторону 3'-ОН конца. В результате высвобождается центр А и становится доступным очередной кодон, а fMet-тРНК покидает рибосому. Далее весь цикл элонгации повторяется сначала.

#### 4. Терминация трансляции.

Терминация представляет собой завершение синтеза полипептидной цепи и освобождение ее от рибосомы (рисунок 3.4).

Сигналами окончание синтеза, являются *стоп-кодоны* (или терминирующие) на цепи мРНК (см. таблицу 3.1). У этих кодонов нет комплементарных антикодонов тРНК, поэтому при достижении их рибосомой синтез прекращается. В А-центр вместо аа-тРНК входят белковые *факторы терминации* RRF, RF<sub>1</sub> и RF<sub>2</sub>.

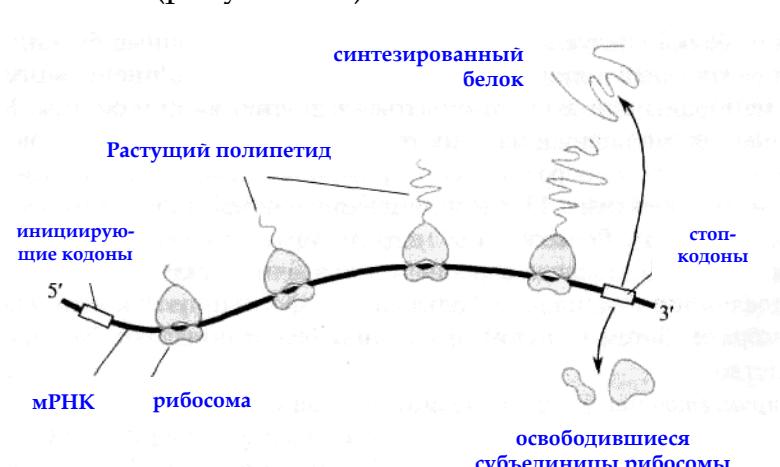
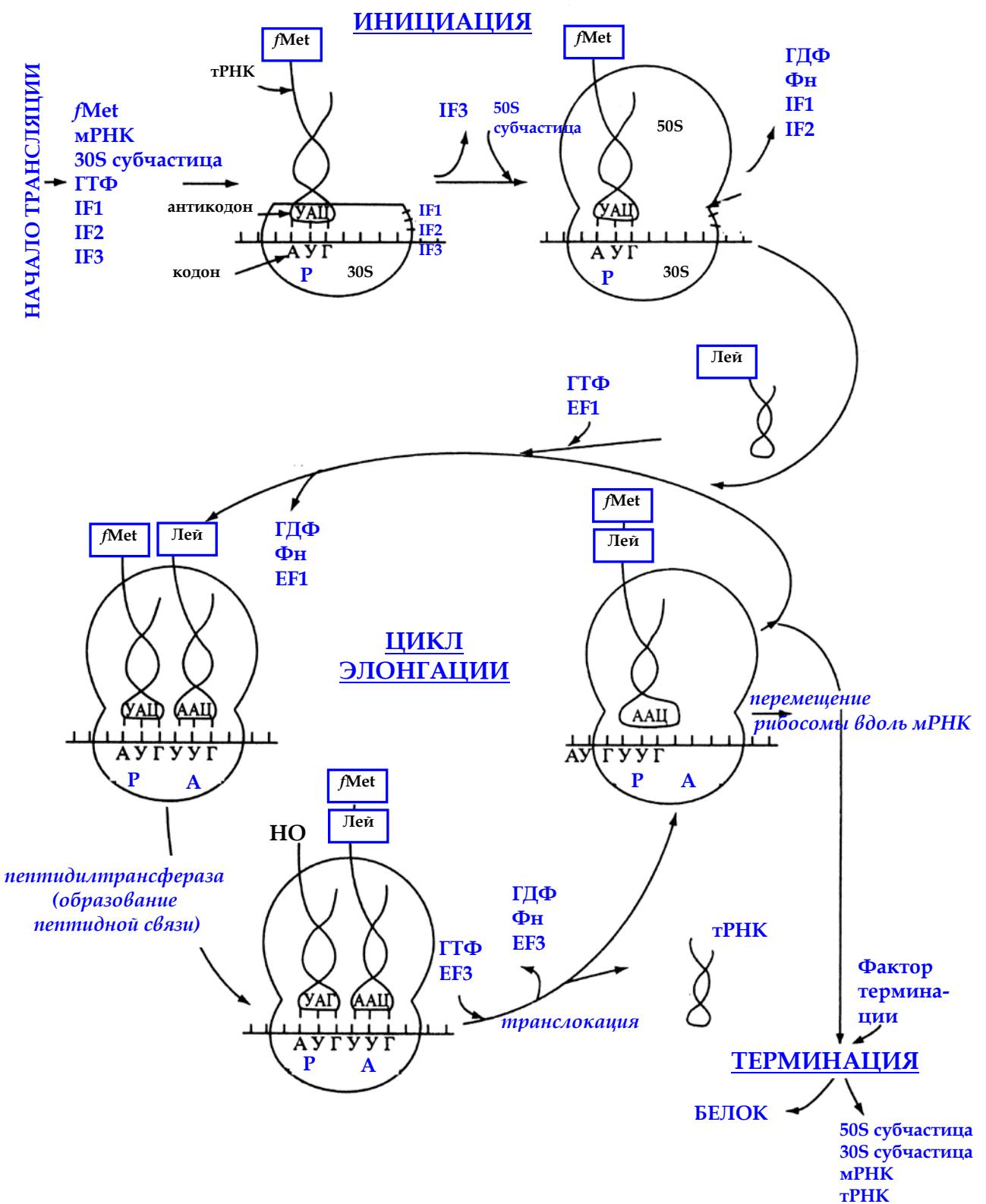


Рисунок 3.4 - Общая схема высвобождения белка из рибосомы в процессе биосинтеза

Под действием этих факторов в Р-центре гидролизуется связь тРНК-полипептид. Освобожденный полипептид диффундирует из рибосомы. Вслед за этим происходит диссоциация комплекса мРНК-рибосома, а затем рибосома распадается на отдельные субъединицы (малую и большую). После связывания этих частиц с другой молекулой мРНК весь процесс биосинтеза вновь повторяется.

Схема всех стадий процесса трансляции (биосинтеза белка) приведена на рисунке 3.5. Показаны условия, необходимые для начала инициации, формирование инициирующего комплекса, протекание элонгации, транслокации, действие пептидилтрансферазы, и наконец терминации процесса.

Синтез белка – процесс, протекающий со значительной затратой энергии. На образование одной полипептидной связи порядка шести молекул макроэргов. Так, при активации аминокислот АТФ гидролизуется до



IF1, IF2, IF3 – факторы инициации, EF1, EF3 – факторы элонгации

### Рисунок 3.5 – Основные этапы трансляции

АМФ, что эквивалентно затрате двух макроэргов, а инициация трансляции требует один макроэрг – ГТФ. В процессе элонгации затрачивается два макроэрга ГТФ: один на доставку аминоацил-тРНК в А-центр рибосомы, а второй – на процесс транслокации. И, наконец, на терминацию требуется один макроэрг ГТФ.

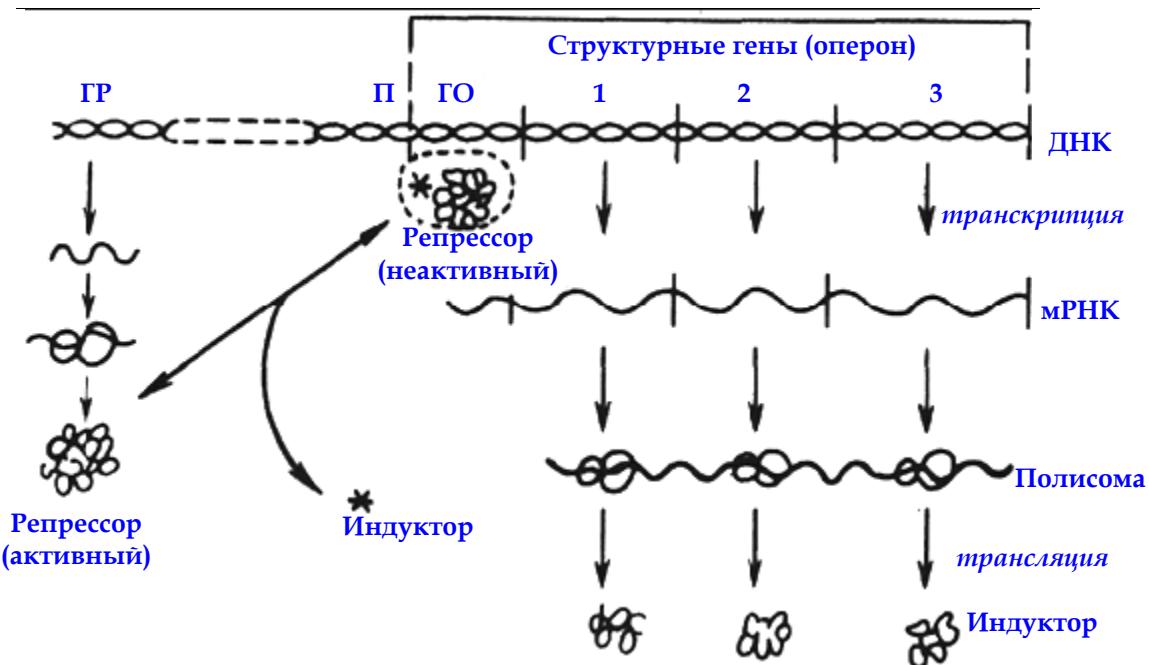
После окончания биосинтеза полипептидной цепи начинается период посттрансляционных превращений полипептида. Эти модификации могут включать в себя: частичный протеолиз (расщепление), модификации аминокислот (карбоксилирование, фосфорилирование, гликозилирование, ацилирование и др.), формирование пространственной структуры белка, образование дисульфидных связей, присоединение простетических групп, образование олигомерных структур и т.д.

Ранее формирование пространственной структуры (*фолдинг* или свертывание полипептида) считалось самопроизвольным процессом, в результате которого возникала активная форма белка, энергетически более выгодная и стабильная, нежели хаотичный клубок полипептида. Последние исследования в области молекулярной биологии показали, что пространственная структура белка формируется при участии специальных белков – *шаперонов* (или белков теплового шока) – белковых комплексов, которые предупреждают неправильное сворачивание полипептида при выходе его из рибосомы и формируют нативную конформацию белка. Механизм сворачивания основан на способности шаперонов изменять кинетику межмолекулярных взаимодействий аминокислотных остатков, причем пространственная структура в конечном итоге будет все-таки определяться аминокислотной последовательностью белка. Связывание шаперонов с фрагментами полипептидной цепи стабилизирует частично свернутую молекулу до того момента, пока не произойдет правильное пространственное сворачивание белка.

**Регуляция синтеза белка.** Регуляция синтеза белка очень сложный процесс, поскольку транскрипция и трансляция происходят в разных компартментах и обеспечиваются большим количеством соответствующих структур.

На уровне транскрипции регуляторные механизмы у прокариот и эукариот имеют ряд общих черт, а именно регуляция по механизму индукции и репрессии.

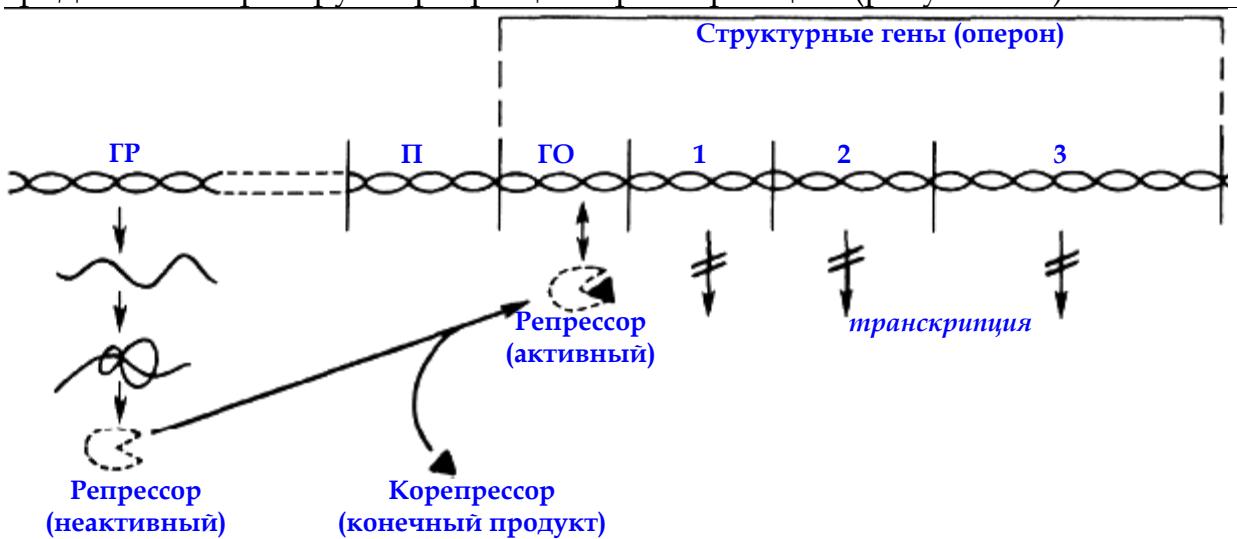
**Регуляция по механизму индукции** (на примере лактозного оперона). В отсутствие индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором. Поскольку участки оператора и промотора перекрываются, присоединение репрессора к оператору препятствует связыванию ДНК-полимеразы с промотором и транскрипция структурных генов оперона не идет. Когда индуктор (лактоза) появляется в среде, то присоединяется к белку репрессору, изменяя его конформацию и снижая сродство к оператору. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены. В результате синтезируются ферменты, принимающие участие в утилизации лактозы (молочного сахара) (рисунок 3.6).



П р и м е ч а н и е: ГР – ген-регулятор, П – промотор, ГО – ген-оператор

**Рисунок 3.6 - Схематическое изображение регуляции синтеза белка путем индукции**

**Регуляция по механизму репрессии.** При регуляции оперона по механизму репрессии белок-репрессор не имеет сродства к оператору. Когда к белку-репрессору присоединяется молекула-корепрессор (например, конечный продукт метаболического пути), то в результате конформационных изменений белка комплекс белок-репрессор-корепрессор приобретает сродство к оператору и прекращает транскрипцию (рисунок 3.7).



П р и м е ч а н и е: ГР – ген-регулятор, П – промотор, ГО – ген-оператор

**Рисунок 3.7 - Схематическое изображение регуляции синтеза белка путем репрессии**

В клетках высших организмов существует два типа регуляции путем индукции и репрессии – кратковременная и длительная. С помощью первой, регулируется содержание белков в клетках в условиях изменения

окружающей среды, с помощью второй –дифференцировка клеток и белковый состав тканей и органов.

Кроме того, для клеток эукариот характерна амплификация генов и их перестройка. Оба механизма обеспечивают резкое увеличение копий тех или иных белков, необходимых для реализации клеточного метаболизма.

Известно, что в клетках эукариот ДНК, соединенная с белками (гистонами), упакована в нуклеосомы. В этом состоянии транскрипция невозможна, и для экспрессии генов необходимо деблокирование транскриптона. Одним из возможных путей активирования транскриптона является процесс фосфорилирования гистонов. В результате действия белковых гормонов происходит опосредованное фосфорилирование ядерных белков (гистонов) и разрушение нуклеосом. Матрица при этом становится доступной для основных факторов инициации транскрипции, и начинается синтез РНК. При прекращении действия гормонов нуклеосомы восстанавливаются.

Ацетилирование и деацетилирование гистонов еще один из факторов регуляции генной активности. В результате ацетилирования положительный заряд белка уменьшается, и сродство гистона к отрицательно заряженной ДНК снижается. Это может привести к разрушению нуклеосом и деблокированию транскриптона. Деацетилирование гистонов приводит к противоположному эффекту.

Скорость синтеза белка напрямую зависит от количества мРНК, которое определяется временем ее «полужизни» или стабильностью *in vivo*.

Лимитирующей стадией процесса трансляции является ее инициация. Регуляция синтеза белка осуществляется также на стадии процессинга белка. Модификации новосинтезированных полипептидов осуществляются при помощи соответствующих ферментов, активность которых, в свою очередь, находится под генетическим контролем.

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Как называется процесс биосинтеза ДНК? Дайте краткую характеристику данного процесса.
2. Как называется процесс биосинтеза РНК? Дайте краткую характеристику данного процесса.
3. Дайте определение инtronам, экзонам, сплайсингу.
4. Как называется процесс биосинтеза белка? Дайте краткую характеристику данного процесса.
5. Что такое генетический код? Перечислите его свойства.
6. Перечислите основные уровни регуляции биосинтеза белка. Дайте им краткую характеристику, приведите примеры.

## ГЛАВА 4. МЕТАБОЛИЗМ БИОМОЛЕКУЛ В ЖИВОМ ОРГАНИЗМЕ

---

### 4.1. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ

Под *обменом веществ (метаболизмом)* понимают строго упорядоченную систему биохимических и физиологических процессов, которые обеспечивают поступление питательных и других веществ в организм, их усвоение, превращение внутри клеток, а также выведение образовавшихся продуктов обмена во внешнюю среду. Обмен веществ обеспечивает процессы роста и размножения, самообновление всех клеточных структур, энергобеспечение, постоянство внутренней среды, приспособление к факторам среды. Поэтому при прекращении обмена веществ нарушается или прекращается жизнедеятельность организма.

В обмене веществ выделяют два взаимосвязанных, но разнонаправленных процесса — катаболизм и анаболизм.

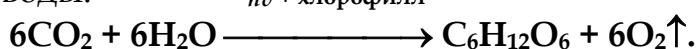
**Катаболизм (диссимиляция)** — это процессы распада в клетках организма сложных веществ до более простых или до низкомолекулярных конечных продуктов распада ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$  и мн. др.) и выведения последних из организма. Катаболические реакции сопровождаются выделением свободной энергии, которая заключена в сложных молекулах органических веществ. Часть этой энергии превращается в химическую форму энергии (АТФ, НАДН $\cdot$ Н $^+$  и др.) и запасается в клетках организма. Большая часть энергии рассеивается в виде тепла.

**Анаболизм (ассимиляция)** — это процессы синтеза сложных химических веществ из простых молекул. В процессе анаболизма образуются нуклеиновые кислоты, белки и другие макромолекулы организма. К ним относятся реакции распада питательных веществ при пищеварении, так как они обеспечивают поступление в клетки строительного материала (молекул-предшественников) и энергии, которые необходимы для процессов анаболизма. Анаболические реакции протекают с использованием химической энергии в виде АТФ или НАДН $\cdot$ Н $^+$ .

Анаболизм и катаболизм — разнонаправленные процессы, протекающие независимо друг от друга. Однако они тесно взаимосвязаны между собой. Катаболические процессы поставляют метаболиты и энергию для процессов анаболизма. Анаболические реакции накапливают (запасают) сложные питательные вещества и энергию, что создает возможность дальнейших реакций катаболизма.

Организм человека и животных получает энергию из внешней среды с растительной и животной пищей. Первичным же источником энергии для всех живых организмов является энергия Солнца. Солнечная энергия накапливается зелеными растениями в органических веществах в процессе их фотосинтеза.

Зеленый пигмент растений хлорофилл способен аккумулировать кванты энергии солнечного света ( $h\nu$ ) при синтезе органических веществ из углекислого газа и воды:



В организме животных энергия химических связей органических веществ извлекается только в процессе их катаболического распада и окисления. При этом высвобождается свободная энергия.

Распад питательных веществ и высвобождение из них свободной энергии происходит постепенно в несколько этапов. Под *свободной энергией* понимают ту часть химической энергии питательных веществ, которая в организме может использоваться для выполнения полезной работы при постоянной температуре и постоянном давлении.

Свободная энергия в клетках не может использоваться непосредственно в процессах жизнедеятельности. Она в большей степени аккумулируется в химических связях высокоэнергетических (макроэргических) соединений, в основном в молекулах АТФ. Только энергия макроэргических соединений может использоваться клетками для обеспечения многих ее функций. Эта энергия способна превращаться в другие формы энергии.

Изменение свободной энергии ( $\Delta G$ ) в биохимии принято выражать в джоулях (Дж) на 1 моль вещества.

Таким образом, аккумуляторами и носителями свободной энергии в клетках организма являются высокоэнергетические соединения. В центре энергетического обмена клетки находятся адениннуклеотиды – АТФ и АДФ.

К высокоэнергетическим относят вещества, имеющие химические связи, при гидролизе которых выделяется более 21 кДж/моль свободной энергии. Такие химические связи, как и сами вещества, еще называют *макроэргическими* и обозначаются значком «~» (тильда).

Как правило, макроэргическими являются фосфорорганические соединения. Кроме АТФ к ним относятся также УТФ, ЦТФ, ГТФ, ТТФ, креатинфосфат, некоторые тиоэфиры (например, ацил-SKоА), фосфоенолпируват, 1,3-дифосфоглицерат и некоторые другие (рисунок 4.1).

Высвобождаемая при их гидролизе свободная энергия используется для переноса фосфата (~PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) на молекулу другого вещества, свободная энергия которого ниже. Реакция присоединения фосфата называется *fosфорилированием*.

Одной из центральных проблем биоэнергетики биохимических процессов является биосинтез АТФ путем фосфорилирования АДФ.

Фосфорилирование АДФ является эндергоническим процессом и требует источника энергии.

Зеленые растения и некоторые микроорганизмы способны трансформировать энергию солнечного света в химическую энергию, которая расходуется на фосфорилирование АДФ в световой фазе фотосинтеза. Этот процесс получил название *фотосинтетического фосфорилирования*.

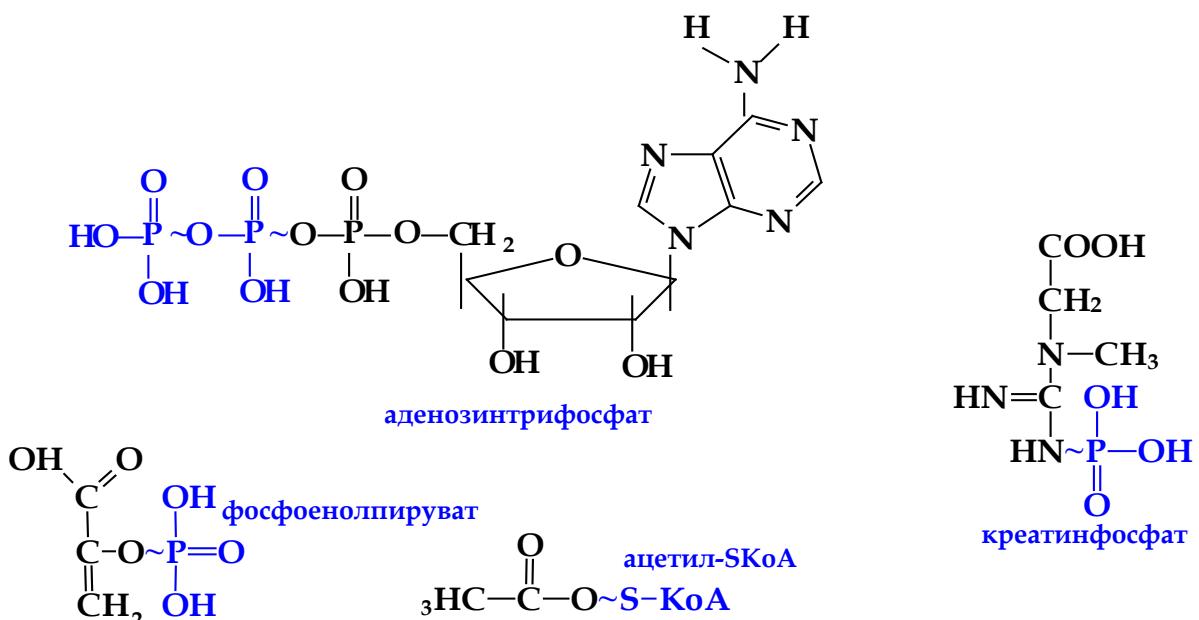


Рисунок 4.1 - Примеры макроэргических соединений

Трансформация энергии окисления органических молекул в связи АТФ в аэробных условиях происходит преимущественно путем *окислительного фосфорилирования*. При этом свободная энергия, необходимая для фосфорилирования генерируется в дыхательной цепи митохондрий.

Для *субстратного фосфорилирования*, в отличие от окислительного, донором активной фосфатной группировки, необходимой для регенерации АТФ из АДФ, служат интермедиаты процессов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот.

Несмотря на множество путей получения АТФ клеткой, она быстро расходуется, так как легко отдает свой высокоэнергетический фосфат другим веществам, т.е. выступает в качестве донора фосфатных групп. Практически все реакции энергетического обмена в клетках организма протекают посредством образования и распада молекул АТФ.

В клетках организма химическая форма энергии АТФ преобразуется в другие формы энергии: кинетическую (механическую), электрическую, осмотическую, тепловую (рисунок 4.2).

Выделяемая в реакциях биологического окисления энергия может расходиться в виде теплоты или улавливаться в процессе синтеза макроэргических соединений. Поэтому выделяют свободное и сопряженное окисление.

*Свободное окисление* не связано с переходом энергии биологического окисления в энергию макроэргических соединений. Выделяющаяся энергия рассеивается в виде теплоты. Этот вид энергообразования в клетках важен для теплорегуляции и детоксикации вредных продуктов обмена веществ (микросомальное окисление).

*Сопряженное окисление* связано с переходом свободной энергии, выделяющейся в процессе биологического окисления, в доступную для использования форму энергии – макроэргические связи АТФ или другие виды

энергии, например, ионный градиент.



$\Delta\mu H^+$  - протонный электрохимический потенциал, ФФн - пирофосфат

**Рисунок 4.2 - Взаимозаменяемость различных видов энергии при выполнении клеточной работы (по Скулачеву В.В.)**

Различают такие виды сопряженного окисления, как окислительное фосфорилирование на уровне субстрата и окислительное фосфорилирование на уровне дыхательной цепи ферментов.

В первом случае (на уровне субстрата) синтез АТФ идет за счет переноса высокоэнергетического фосфата ( $\sim PO_3^{2-}$ ) от окисляемого субстрата к АДФ. Такое фосфорилирование происходит в основном в мышцах в процессе гликогенолиза.

Во втором случае (на уровне дыхательной цепи ферментов) синтез АТФ идет за счет энергии, которая выделяется при переносе электронов по дыхательной цепи ферментов, локализованных в митохондриях, от окисляемых питательных веществ к атомарному кислороду в процессе дыхания. Этот процесс не связан непосредственно с синтезом АТФ и вначале используется для образования протонного потенциала на мемbrane, который в дальнейшем приводит к синтезу АТФ. Энергия протонного потенциала может затрачиваться и на другие виды работы, поэтому образование АТФ не является единственным и обязательным следствием окисления.

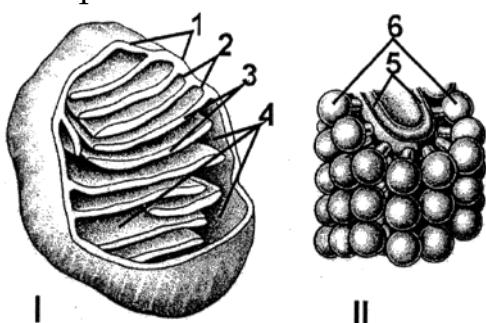
В митохондриях образуется до 90 % АТФ, необходимой для жизнедеятельности организма. Такая специфическая функция этих органелл клетки связана с особенностями их строения.

**Митохондрии** – внутриклеточные органеллы, выполняющие важнейшую роль обеспечения клетки достаточным количеством энергии макро-связей аденоинтрифосфата (АТФ) и метаболитами, а также процессов жизнедеятельности всего организма. В зависимости от функций тех или

иных клеток количество митохондрий в них может варьировать от одной (в виде митохондриального синцития в мышечной клетке – хондриом) до 100 и выше.

Основные функции митохондрий сводятся к следующим:

- синтез АТФ, энергообеспечение клетки;
- осуществление комплекса реакций энергетического обмена и регуляции интенсивности этих процессов;
- образование в митохондриях различных субстратов (ацетилКоА, дикарбоновых и трикарбоновых кислот), необходимых для процессов синтеза липидов, гема и др.;
- интегрирование всех метаболических процессов на пути биологического окисления в митохондриях;
- хранение генетической информации, наличие собственного генома митохондрий.



I – общая схема строения,  
II – схема строения кристы;  
1-наружная мембрана, 2-внутренняя мембрана,  
3-кristы, 4-матрикс, 5-складка внутренней мембранны,  
6-Н<sup>+</sup>-АТФ-синтетаза

**Рисунок 4.3 - Схема строения митохондрии (Билич Г.Л. и др., 1999)**

Хондрии регулирует перенос метаболитов в матрикс и выход из него таких веществ, как АТФ, АДФ, отдельных аминокислот, жирных кислот, ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и др. Эта мембрана практически непроницаема даже для многих малых молекул, так как на ней создается электрохимический градиент протонов  $\text{H}^+$ .

Наружная мембрана не имеет складок и перегибов в отличие от внутренней мембраны, которая для увеличения площади своей поверхности образует большое число внутренних складок-крист (рисунок 4.3). Около 25 % общего белка внутренней мембранные составляют ферменты, участвующие в функционировании системы переноса электронов и окислительно-фосфорилирования. Оставшаяся часть белков вместе с липидами принимает участие в поддержании структуры митохондриальной мембранны. Внутреннее пространство митохондрий заполнено **матриксом** – студнеобразной полужидкой массой, состоящей на 50 % из белка.

Со стороны матрикса к поверхности крист прикреплено множество электроноплотных субмитохондриальных элементарных частиц (до 4000 на 1  $\text{мкм}^2$  мембранны). Каждая из них имеет форму гриба (рисунок 4.3). Круг-

В световом микроскопе митохондрии видны в виде округлых, удлиненных или палочкообразных структур длиной 0,3 – 5,0 и шириной 0,2 – 1,0 мкм. Основная их структурная особенность – это наличие двух мембран – внешней (70 Å) и внутренней (50 – 55 Å) (рисунок 4.3). Отличительным признаком внешней мембранны является относительно высокое содержание холестерола и фосфолипидов.

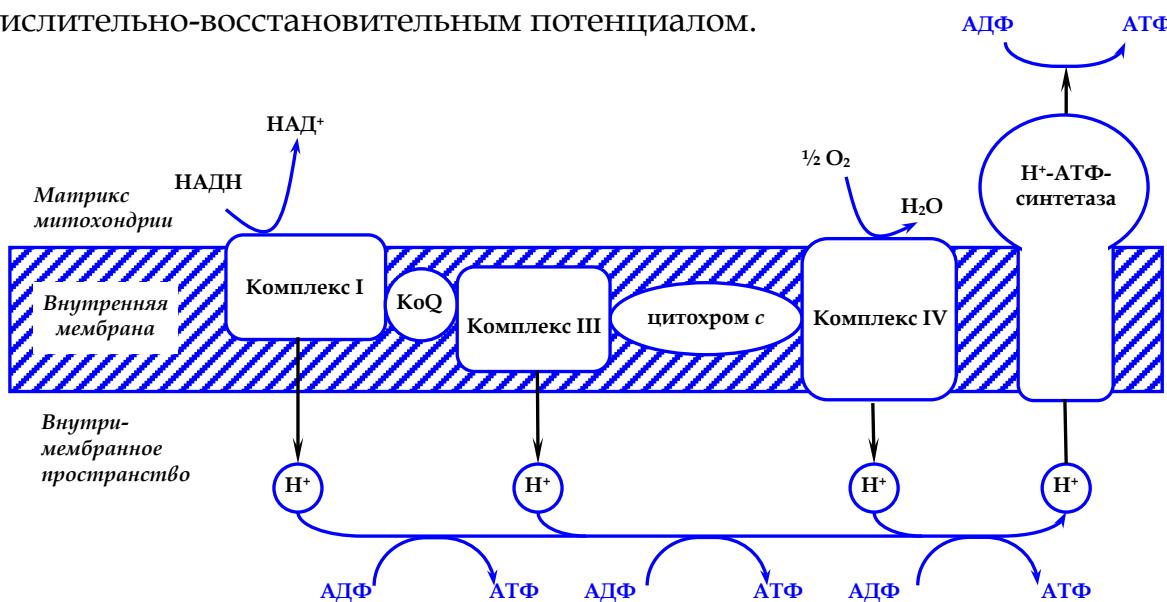
Внутренняя мембрана мито-

лая головка диаметром 9 – 10 нм посредством тонкой ножки диаметром 3 – 4 нм прикрепляется к внутренней мембране. В этих частицах сосредоточены АТФазы – ферменты, непосредственно обеспечивающие синтез и распад АТФ. Эти процессы непосредственно связаны с циклом трикарбоновых кислот.

В матриксе находятся ферменты окисления пирувата и жирных кислот, а также в высокой концентрации – растворимые ферменты цикла Кребса. Здесь же содержатся АТФ, НС-КоА, НАД<sup>+</sup> и все вещества, обеспечивающие митохондриальный синтез белка.

В толще внутренней мембранны на разном удалении от ее поверхности асимметрично в виде связанных друг с другом белково-ферментных комплексов I, II, III, IV и V располагаются ферменты, которые с помощью FeS-белковых центров участвуют в функционировании систем переноса электронов и процессах окислительного фосфорилирования.

В состав дыхательной цепи входят три основных ферментных комплекса, осуществляющих постепенную передачу электронов от НАДН к атомарному кислороду (рисунок 4.4). Переносчики располагаются в дыхательной цепи в определенной последовательности, взаимосвязанной с их окислительно-восстановительным потенциалом.



**Рисунок 4.4 - Последовательность расположения переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрии**

Комплекс I дыхательной цепи, называемый НАД<sup>+</sup>-дегидрогеназным, осуществляет прием электронов от НАДН·Н<sup>+</sup> (в отдельных случаях – от ФАДН<sub>2</sub>) и передачу их убихинону (коферменту Q). В передаче электронов участвуют ионы железа, которые входят в состав серосодержащих ферментов этого комплекса.

Убихинон способен принимать один или два электрона и отдавать их, он не связан прочно с белками и является лабильным переносчиком электронов, перемещающимся между компонентами первого и второго комплексов.

Следующий комплекс III дыхательной цепи представляет собой ансамбль из двух цитохромов — *b* и *c<sub>1</sub>*. Этот комплекс принимает электроны от кофермента Q и передает их цитохрому *c* — небольшой белковой молекуле, встроенной в мембрану митохондрий, которая переносит эти электроны на дыхательный комплекс IV.

Комплекс IV называют *цитохромоксидазным*, он включает цитохромы *a* и *a<sub>3</sub>*, которые представляют собой сложный фермент, обозначаемый как *цитохромоксидаза*. Цитохромоксидаза передает электроны от цитохрома *c* атомарному кислороду. В состав этого комплекса входит ион меди, который участвует в передаче электронов кислороду с дальнейшим образованием воды при участии протонов.

Около 90 % кислорода, поступившего в клетки, используется в этих процессах биологического окисления.

При передаче электронов по дыхательной цепи кислороду происходит постепенное высвобождение энергии (рисунок 4.5).

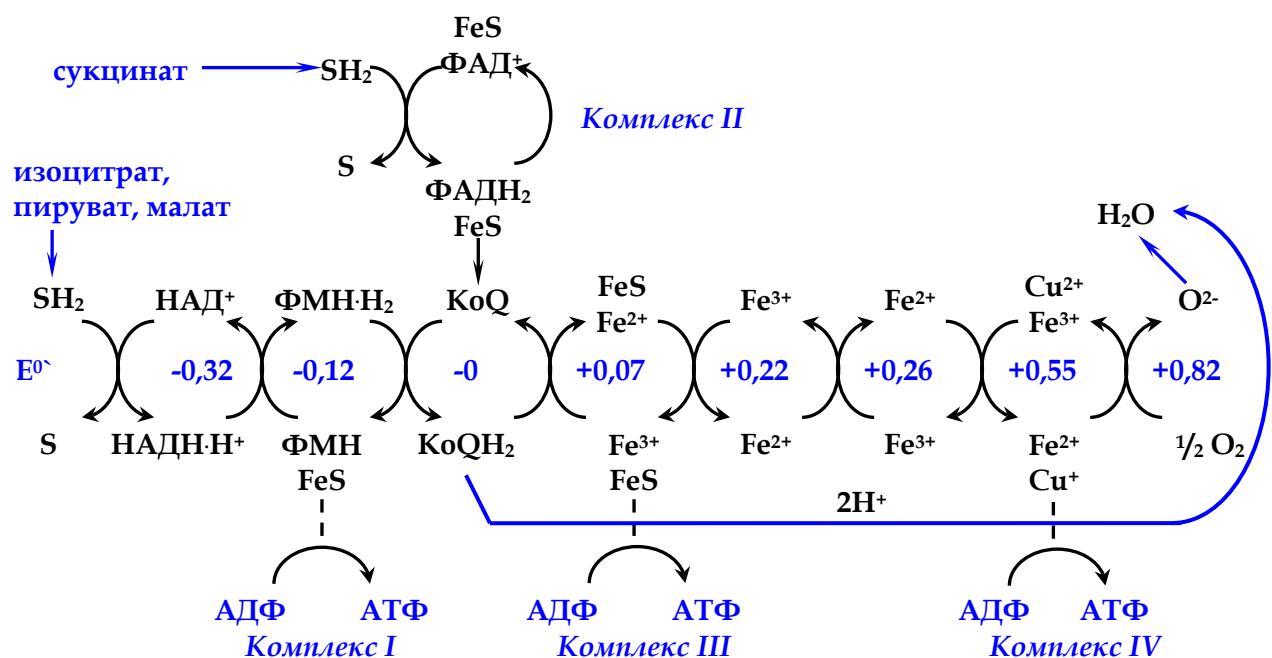


Рисунок 4.5 - Электронпереносящие комплексы дыхательной цепи

Резкий перепад потенциала наблюдается между тремя рассмотренными комплексами. Они являются энергопреобразующими устройствами, так как высвобождаемая свободная энергия используется ими для перекачивания ионов H<sup>+</sup> через внутреннюю мембрану митохондрий в межмембранные пространство. Это приводит к образованию электрохимического протонного градиента (высокая концентрация ионов H<sup>+</sup> в матриксе и низкая в межмембранным пространстве). Градиент концентрации ионов водорода и мембранный потенциал служат источником энергии для синтеза АТФ в процессе окислительного фосфорилирования и поддержания необходимого уровня АТФ в клетке.

Основным ферментом, который участвует в образовании АТФ, является H<sup>+</sup>-зависимая АТФ-синтетаза. Она пронизывает внутреннюю мембрану

митохондрий в тех местах дыхательной цепи, где происходит значительное изменение свободной энергии, и аккумулирует энергию путем синтеза АТФ.

АТФ-синтетаза в зависимости от условий может как синтезировать АТФ (синтетаза), так и гидролизовать ее (АТФаза). При недостаточном количестве АТФ в клетке АТФ-синтетаза синтезирует АТФ за счет энергии протонного градиента. Если внезапно падает протонный градиент, то она будет гидролизовать АТФ и усиливать движение протонов через мембрану митохондрий.

При переносе пары электронов от окисляемого субстрата к атому поглощенного кислорода воздуха в митохондриях образуются три молекулы АТФ. Такое соотношение получило название *коэффициента окислительного фосфорилирования* (Р/О).

В настоящее время установлены три участка дыхательной цепи, где происходит сопряжение процесса окисления и фосфорилирования, т.е. синтез АТФ. Они находятся в местах наиболее резкого перепада редокс-потенциала. Первый участок находится между НАДФ и ФМН, второй — между цитохромами *b* и *c<sub>1</sub>*, третий — на цитохромоксидазном комплексе, который осуществляет перенос атома водорода к атому кислорода с образованием молекулы воды. Поэтому, если водород поступает в дыхательную цепь от кофермента НАДН·Н<sup>+</sup>, то образуются 3 молекулы АТФ (Р/О = 3), а если от ФАДН<sub>2</sub> (например, при окислении янтарной кислоты в цикле трикарбоновых кислот), то образуются только две молекулы АТФ (Р/О = 2).

Аденозиндифосфорная кислота осуществляет контроль дыхания: чем больше АДФ и меньше АТФ в митохондриях, тем интенсивнее потребление кислорода, чтобы ускорить восстановление высокого уровня АТФ в клетке.

В мембранах митохондрий могут находиться до 50 тысяч дыхательных цепей, поэтому одновременно синтезируется большое количество АТФ. Чем выше функциональная активность клеток, тем с большим напряжением работает эта энергетическая система.

## 4.2. ОБМЕН БЕЛКОВ

Белковый обмен является ведущим в сложных процессах обмена веществ между организмом и внешней средой. Основные структурные элементы клеток, тканей и органов животных являются белковыми образованиями. Все химические процессы в живых организмах протекают при участии белков-ферментов. Поэтому в живой природе весь ход обмена веществ подчинен воспроизведению белковых молекул.

Белки поступают в организм человека и животных с различными пищевыми продуктами, в которых содержание белка колеблется в широких пределах. Одни из них богаты белками (мясо, рыба, творог, сыр, яйца, горох, фасоль, соя), другие, напротив, содержат белок в ничтожно малом количестве (овощи, фрукты).

### 4.2.1. КАТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

Белки, распадаясь в организме, являются, так же как углеводы и жиры, источником энергии. Организм человека и животных не может обходиться без регулярного поступления белков извне, так как пластическая роль белков (участие в построении разнообразных клеточных структур) пре-восходит их энергетическую ценность. Степень усвоения организмом белка характеризует биологическую ценность последнего, которая будет тем выше, чем ближе аминокислотный состав пищевого белка к составу белков данного организма.

Белки, вводимые с пищей в организм, никогда не включаются в состав тканей и органов без предварительного их расщепления. Распад белковых веществ на более простые, лишенные видовой и тканевой специфичности соединения осуществляется при участии ряда ферментов класса гидролаз. Гидролиз белков может быть либо частичным (до пептидов), либо полным (до аминокислот). Процесс неполного гидролиза белков, при котором распадаются лишь некоторые пептидные связи, ускоряется специфическими ферментами – *протеиназами* (пептидилпептидогидролазами), важнейшими из которых являются трипсин, пепсин и химотрипсин (основные ферменты ЖКТ).

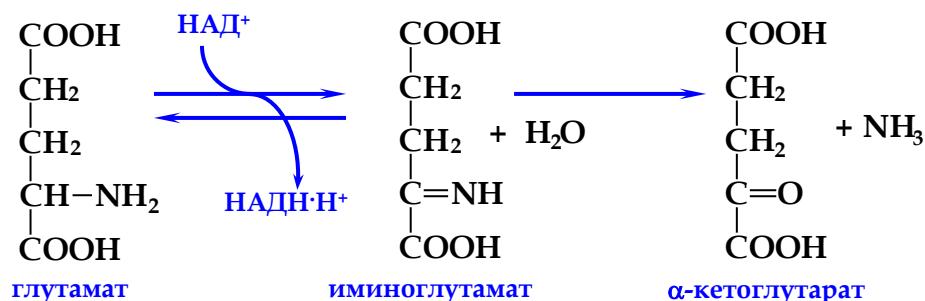
Пептиды, образовавшиеся в результате действия на белки протеиназ, подвергаются дальнейшему расщеплению до аминокислот при участии *пептидаз*: *карбоксипептидаз* (отщепляют аминокислоты от C-конца пептида), *аминопептидаз* (отщепляют аминокислоты от N-конца пептида) и *ди-пептидгидролаз* (расщепляют дипептиды). В результате совместного действия протеолитических ферментов (протеиназ и пептидаз) белки пищи распадаются до аминокислот. Свободные аминокислоты претерпевают в организме человека и животных различные превращения: часть их используется для синтеза белков органов и тканей, часть затрачивается на синтез гормонов, витаминов и т.п., часть же, подвергаясь полному распаду, используется в качестве энергетического материала.

В организме осуществляются три типа превращений аминокислот:

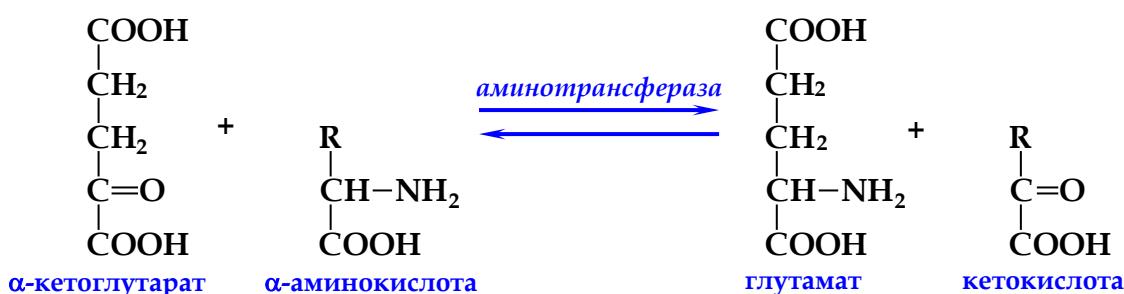
- по  $\alpha$ -аминогруппе;
- по карбоксильной группе;
- по радикалу.

Реакции по  $\alpha$ -аминогруппе аминокислот – это в основном реакции дезаминации и переаминирования.

*Дезаминация аминокислот* может идти различными путями, но главный из них – окислительное дезаминаование, которое осуществляется в две стадии.



*Переаминирование аминокислот* идет главным образом с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой согласно уравнению:



Образовавшаяся глутаминовая кислота вслед за этим претерпевает окислительное дезаминаование, а выделяющаяся при этом  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота снова вовлекается в реакцию переаминирования с L-аминокислотами.

Реакция переаминирования между L-аминокислотами и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой является обратимой, поэтому при определенных условиях она служит для синтеза L-аминокислот из кетокислот и глутаминовой кислоты. Коферментом трансаминации выступает витамин В6.

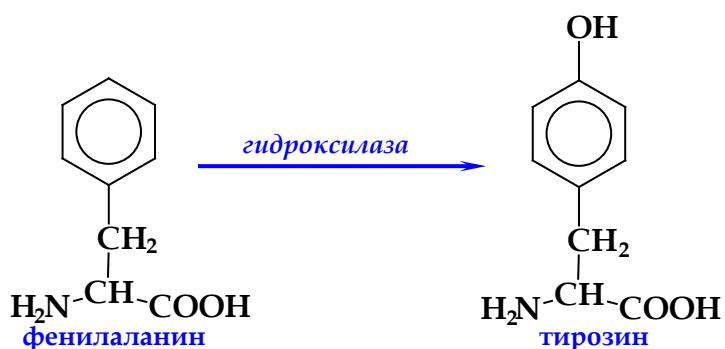
Реакции по карбоксильным группам аминокислот сводятся в основном к двум процессам: декарбоксилированию и образованию аминоациладенилатов.

Реакция *декарбоксилирования* монокарбоновых аминокислот сопровождается выделением  $\text{CO}_2$  и образованием аминов. В большинстве случаев продуктами декарбоксилирования аминокислот являются амины, обладающие высокой физиологической активностью, вследствие чего их называют *биогенными аминами*. Так, при декарбоксилировании гистидина возникает гистамин:



Другой важной реакцией аминокислот по СООН-группе является образование ими аминоациладенилатов.

Важнейшим типом химических превращений аминокислот, протекающих с *видоизменением радикалов*, является переход одних аминокислот в другие, что расширяет возможности синтеза аминокислот. Например, при окислении фенилаланина образуется тирозин:



Аминокислоты, которые не были вовлечены в процессы синтеза тканевых белков или их специфических производных (например, некоторых гормонов гипофиза, щитовидной железы, надпочечников и т. п.) и оказались, таким образом, неиспользованными, подвергаются необратимым процессам распада до конечных продуктов.

Конечными продуктами распада аминокислот в организме являются аммиак, мочевина, углекислый газ и вода. Вода поступает в общий метаболический фонд, углекислый газ беспрепятственно выводится из организма. Аммиак непосредственно или в виде солей аммония выводится в окружающую среду только у некоторых обитателей гидросферы (крабов, речных раков и др.). Для высших организмов аммиак является токсичным соединением, уже в небольших концентрациях оказывающим вредное влияние на их жизнедеятельность. В связи с этим он переводится в безвредные соединения, к числу которых принадлежат аспарагин, глутамин и мочевина.

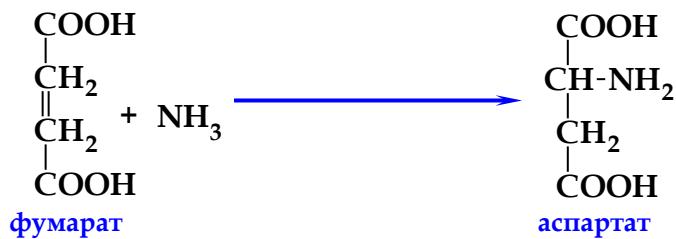
Путь биосинтеза мочевины из углекислого газа и аммиака у животных (в печени) получил название *орнитинового цикла*. Заключительной реакцией в цикле биосинтеза мочевины является гидролиз аргинина на орнитин и мочевину. Суть функционирования орнитинового цикла заключается в том, что из каждого двух молекул аммиака и одной молекулы углекислого газа получается одна молекула мочевины.

#### **4.2.2. АНАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ**

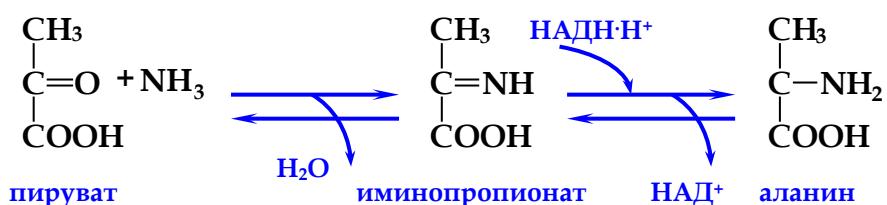
Первичный синтез аминокислот в природе осуществляется, главным образом, путем восстановительного аминирования кетокислот и прямого

аминирования непредельных кислот.

*Прямое аминирование* непредельных кислот — реакция, характерная главным образом для растений и бактерий:



*Восстановительное аминирование*, представляющее собой обращение окислительного дезаминирования аминокислот, является одним из главных путей синтеза аминокислот. Эта реакция осуществляется, как и окислительное дезаминирование, в две стадии:



Если в растительных организмах широко представлены реакции восстановительного и прямого аминирования кетокислот, то у животных преобладают реакции переаминирования аминокислот с соответствующими кетокислотами.

В отличие от растений животные организмы синтезируют около половины белковых (заменимых) аминокислот, а остальные (незаменимые) должны вводиться с пищей.

Недостаток каждой из незаменимых аминокислот в пищевом (для человека) и кормовом (для животных) рационе приводит к нарушению обмена веществ, замедлению роста и развития. Учитывая, что растительные белки, как правило, содержат незначительное количество некоторых незаменимых аминокислот (лизина, триптофана, метионина), их необходимо вводить в пищевой рацион.

Пищевая ценность белка определяется, с одной стороны, содержанием незаменимых аминокислот, а с другой — степенью его усвоения. Чем выше эти показатели, тем лучше качество белка. Белки яйца и молока, обладающие высокой пищевой ценностью, принято считать эталонами при оценке качества различных белков.

## **4.3. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ**

Углеводный обмен занимает одно из ведущих мест в обмене веществ. При окислении углеводов в организме высвобождается энергия, которая запасается в макроэргических связях АТФ.

Углеводы выполняют еще одну важнейшую функцию в процессе обмена веществ — они являются источником большого числа органических соединений, которые служат исходными веществами для биосинтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот.

### **4.3.1. ОСНОВНЫЕ ПУТИ КАТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ**

Распад углеводов в организме человека и животных начинается еще в ротовой полости. Полисахариды и олигосахариды распадаются на простые соединения посредством реакций двух типов: гидролиза и фосфоролиза.

*Гидролиз* (или расщепление макромолекулы в присутствии воды) крахмала ускоряется специфическими ферментами — амилазами, относящимися к классу гидролаз. В зависимости от характера фермента гидролитический разрыв эфирных связей между остатками  $\alpha$ -D-глюкопиранозы в молекуле крахмала может происходить до глюкозы, мальтозы или олигосахаридов.

В природе найдено несколько амилаз:  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза,  $\gamma$ -амилаза (глюкоамилаза) и амило-1,6-глюкозидаза.

$\alpha$ -Амилаза ( $\alpha$ -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза) ускоряет гидролиз внутренних  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей в молекуле крахмала. В качестве основного конечного продукта гидролиза крахмала при участии  $\alpha$ -амилазы образуется мальтоза в  $\alpha$ -форме.  $\alpha$ -Амилаза найдена у всех видов растений и животных.

$\beta$ -Амилаза ( $\alpha$ -1,4-глюкан-мальтогидролаза) ускоряет гидролиз  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей, начиная с невосстановляющего конца молекулы крахмала, последовательно отщепляя остатки мальтозы. Мальтоза, освобождающаяся при гидролизе крахмала под действием  $\beta$ -амилазы, получается в  $\beta$ -форме. Образование последней происходит в момент гидролиза  $\alpha$ -гликозидной связи вследствие изменения пространственной конформации образующегося гликозидного гидроксила при первом углеродном атоме остатка глюкозы.  $\beta$ -Амилаза найдена лишь у высших растений.

$\gamma$ -Амилаза ( $\alpha$ -1,4-глюкан-глюкогидролаза, глюкоамилаза) ускоряет гидролиз  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей в молекуле крахмала или олигосахаридов, последовательно отщепляя остатки глюкозы от невосстановляющего конца молекулы.

Амило-1,6-глюкозидаза (амило-6-глюканогидролаза) ускоряет реакцию гидролиза 1,6-связей в молекуле крахмала (амилопектина), т.е. в точках разветвления полиглюкозидной цепи, и образует олигосахариды с тем или иным числом остатков  $\alpha$ -D-глюкозы и зависимости от длины отщепляемой

боковой цепи. Фермент характерен для животных тканей, но встречается также у растений и микроорганизмов. Характерной особенностью всех амилаз является отсутствие абсолютной специфичности действия. Они ускоряют гидролиз различных соединений: амилозы, амилопектина, гликогена и олигосахаридов.

Аналогично крахмалу и гликогену гидролизуются и другие природные полисахариды: целлюлоза – при участии фермента целлюлазы, хитин – хитиназы, гепарин – гепариназы и др. Дисахариды, возникающие в ряде случаев при гидролизе полисахаридов (например, малтоза и целлобиоза) или существующие в организме в свободном виде (лактоза, сахароза, трегалоза и др.), гидролизуются при каталитическом воздействии  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозидаз до индивидуальных моносахаридов.

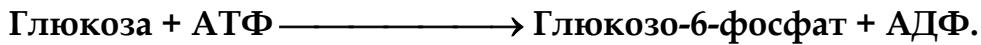
Другой путь распада полисахаридов и олигосахаридов – **фосфоролиз** – наиболее характерен для гликогена. Реакция фосфоролиза заключается в присоединении фосфорной кислоты по месту разрыва гликозидной связи между остатками моносахаридов в молекулах олиго- или полисахаридов.

Реакции фосфоролиза ускоряются специфическими ферментами – фосфорилазами (гликозилтрансферазами), причем фосфоролитическому расщеплению подвергаются лишь 1,4-гликозидные связи. Поэтому в случае фосфоролиза, например, амилопектина распад прекращается в точках разветвления молекулы, где имеются 1,6-связи. Дальнейший фосфоролиз будет происходить лишь после расщепления 1,6-связей в остаточном дексстрине при посредстве амило-1,6-гликозидазы.

Таким образом, при распаде олиго- и полисахаридов возникают свободные моносахариды или их фосфорные эфиры. В дальнейшем обмене моносахаридов участвуют только их фосфорные эфиры, свободные же монозы фосфорилируются, превращаясь в фосфорные эфиры, представляющие собой гораздо более реакционноспособные соединения по сравнению со свободными моносахаридами.

Фосфорилирование моносахаридов осуществляется при их взаимодействии с АТФ и ускоряется ферментами – фосфотрансферазами, носящими название **киназ**. Фосфорилирование глюкозы, например, идет по схеме:

глюкокиназа



В природе обнаружено около двух десятков индивидуальных фосфотрансфераз, переносящих остатки фосфорной кислоты от АТФ. Процесс обмена углеводов протекает через некоторые их формы, занимающие ключевые позиции (например, глюкозо-6-фосфат и рибулозо-5-фосфат).

Глюкозо-6-фосфат образуется в организме разными путями, в том числе при фосфорилировании глюкозы, и, за счет изомеризации (при участии фермента фосфоглюкомутазы) глюкозо-1-фосфата, который образуется в свою очередь в процессе фосфоролиза олиго- и полисахаридов.

Глюкозо-6-фосфат подвергается разнообразным превращениям. В процессе его окислительного распада запасается энергия в макроэргических связях АТФ. Кроме того, многие из промежуточных продук-

тов, образующихся при обмене глюкозо-6-фосфата, используются для синтеза аминокислот, нуклеотидов, глицерина, высших жирных кислот и т. п.

Катаболизм глюкозо-6-фосфата осуществляется преимущественно двумя путями: дихотомическим (гликолиз), когда на определенной стадии молекула распадается пополам, и аптомическим (пентозофосфатный путь), когда молекула теряет первый углеродный атом.

На рисунке 4.6 показана схема, обобщающая основные пути распада углеводов.



**Рисунок 4.6 - Схематическое изображение путей катаболизма полисахаридов**

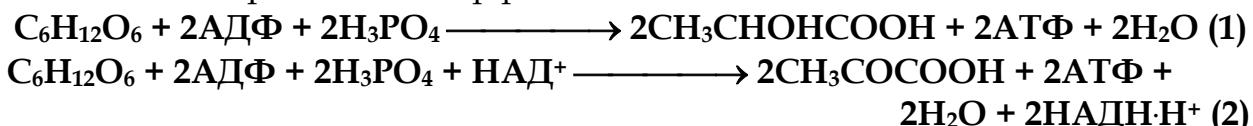
Взаимосвязи между путями распада углеводов сложны и определяются как видовыми особенностями, так и условиями жизнедеятельности организмов. Даже в различных тканях и органах одного и того же организма соотношения путей распада углеводов могут быть различными. У подавляющего большинства организмов аэробный путь распада углеводов в целом превалирует над анаэробным, а дыхание подавляет гликолиз и брожение.

### Дихотомический путь распада глюкозы (гликолиз)

Основным катаболическим процессом деструкции глюкозы в клетках животных и человека является последовательность ряда реакций ее окисления, в результате которых в анаэробных (без участия кислорода) условиях глюкоза превращается в лактат (молочную кислоту), а в аэробных (в присутствии кислорода) – в конечные продукты распада –  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Гликолиз** (от «glycys» - сладкий и «lysis» - растворение, распад) – это последовательность ферментативных реакций, в процессе которых глюкоза расщепляется на две молекулы пирувата (аэробный гликолиз), или лактата

(анаэробный гликолиз), сопровождаясь выделением энергии АТФ. Ниже приведены реакции анаэробного (1) и аэробного (2) гликолиза с учетом всех стехиометрических коэффициентов:



Разделение на анаэробный и аэробный гликолиз носит чисто условный характер, поскольку первые реакции гликолиза в присутствии кислорода и без него одни и те же, отличия касаются лишь их скорости и конечных продуктов. При недостатке кислорода реокисление НАДН·Н<sup>+</sup>, образовавшегося в ходе гликолиза, осуществляется путем сопряжения с восстановлением пирувата в лактат, а в аэробных условиях НАДН·Н<sup>+</sup> окисляется в ходе кислородзависимого фосфорилирования, результатом которого является образование большого количества АТФ.

В анаэробных условиях гликолиз – единственный процесс в организме животных, растений и микроорганизмов, приводящий к образованию АТФ.

В аэробных условиях реакции гликолиза, остановившиеся на стадии образования пирувата, составляют первую, начальную стадию деструкции углеводов, связанную с циклом трикарбоновых кислот (см. далее).

Весь этап гликолиза протекает в две стадии.

*Первая стадия* – подготовительная, или *стадия активации* глюкозы, которая включает пять реакций и завершается расщеплением глюкозы на две молекулы триозы – глицеральдегидфосфата (рисунок 4.7).

На первой стадии гликолиза глюкозо-6-фосфат претерпевает изомеризацию и превращается в β-D-фруктозо-6-фосфат (на схеме реакция 2), который далее фосфорилируется по первому углеродному атому с образованием фруктозо-1,6-дифосфата (реакция 3). Это ключевая реакция процесса гликолиза, от которой зависит скорость всего гликолиза в целом.

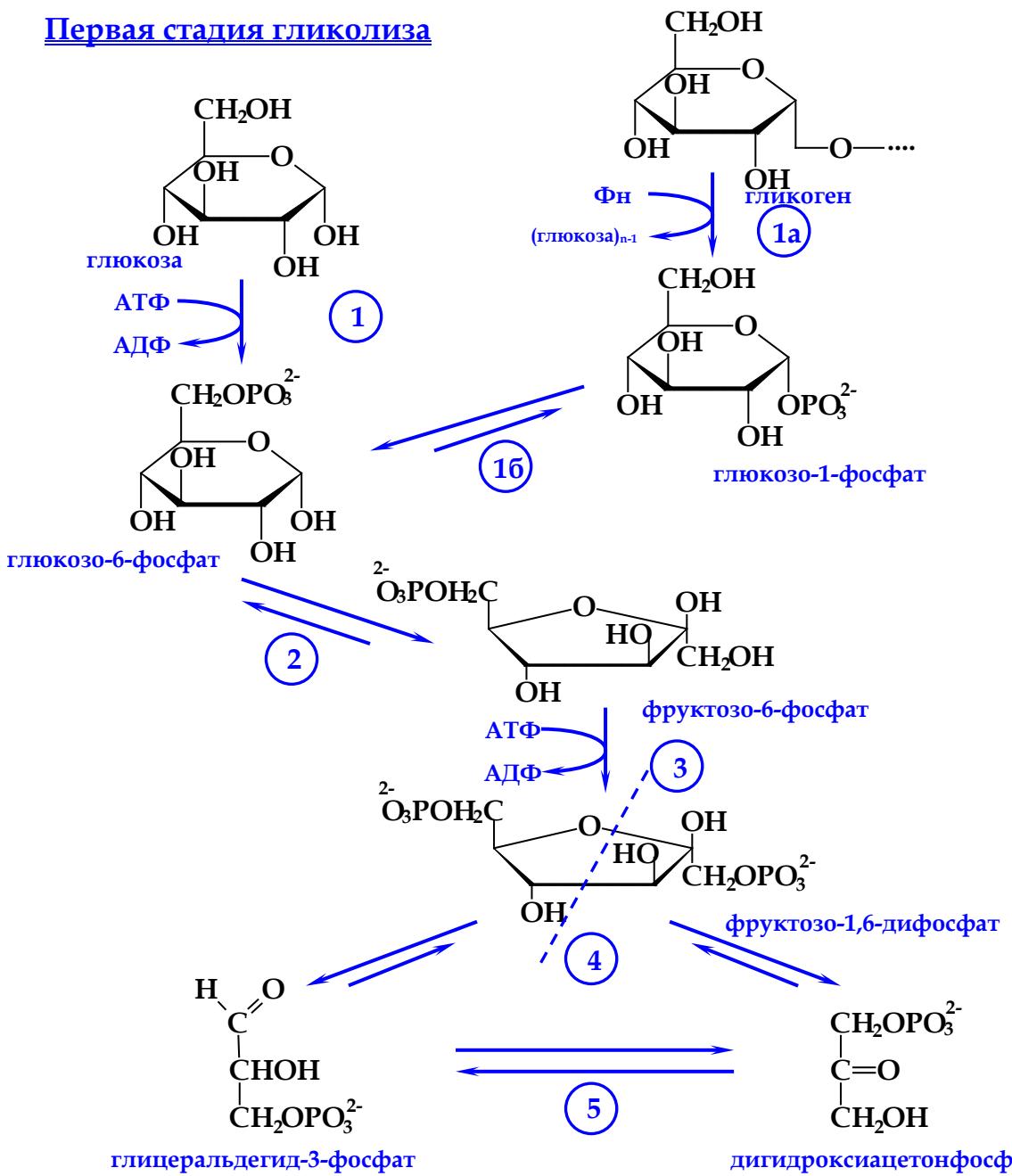
Фруктозо-1,6-дифосфат подвергается далее дихотомическому распаду на две фосфотриозы (фосфоглицеральдегид и дигидроксиацитонфосфат) (реакция 4), превращающиеся друг в друга (на схеме реакция 5).

В дальнейший обмен вступает только 3-фосфоглицериновый альдегид. По мере расходования убыль этого соединения восполняется за счет фосфодиоксиацитона, который практически полностью в него превращается. Поэтому из каждой молекулы фруктозо-1,6-дифосфата возникают две молекулы 3-фосфоглицеринового альдегида. Все последующие реакции и их продукты *удваиваются!*

*Вторая стадия – стадия генерации АТФ*, в которой энергия окислительных реакций трансформируется в энергию химической связи АТФ по механизму реакции субстратного фосфорилирования.

Процесс синтеза богатой энергией АТФ при непосредственном участии окисляемого субстрата (в данном случае, 3-фосфоглицеринового альдегида) называется *окислительным фосфорилированием* на уровне субстрата.

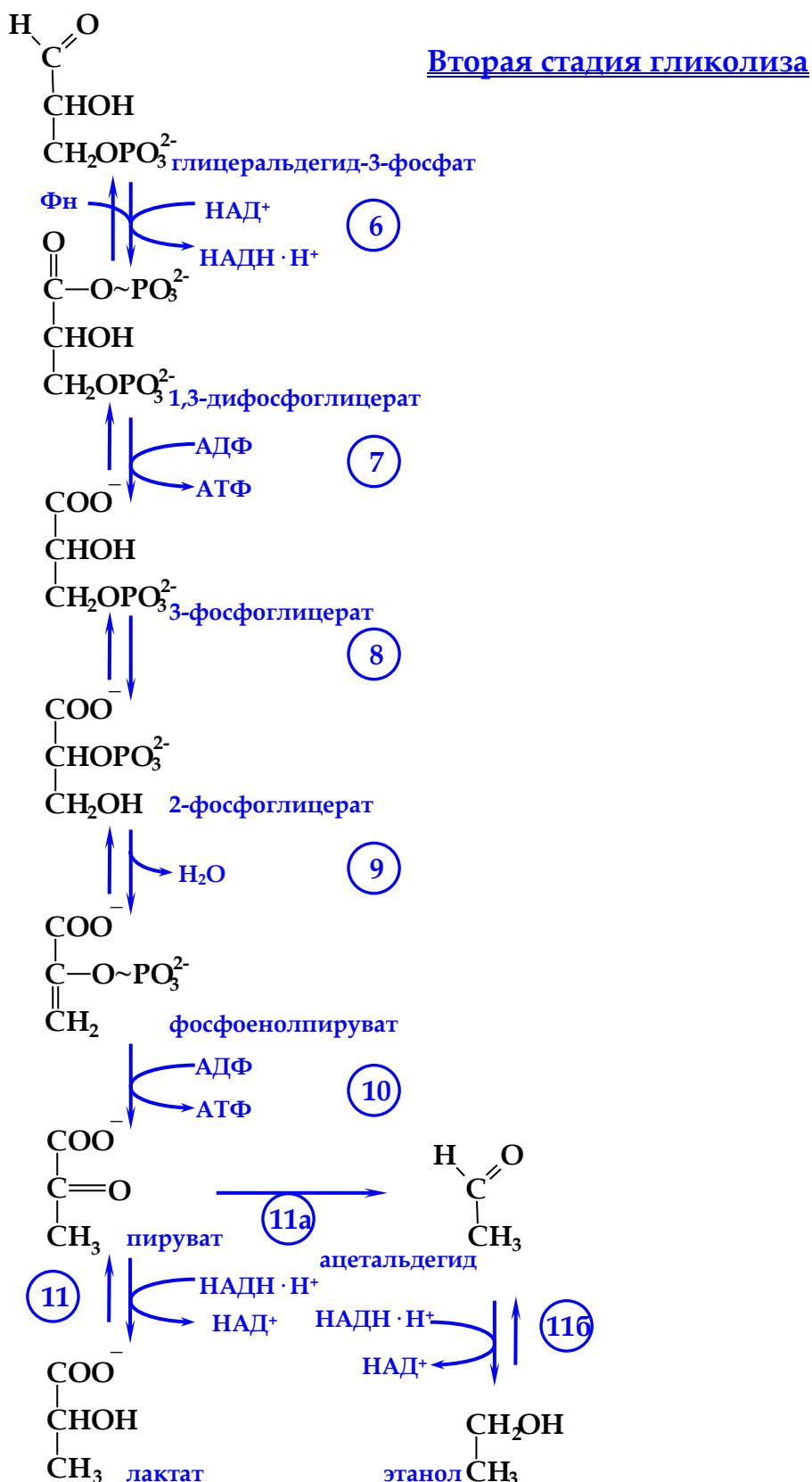
### Первая стадия гликолиза



Ферменты: 1 – гексокиназа (глюкокиназа); 1а – гликогенфосфорилаза; 1б – фосфоглюкомутаза; 2 – глюкозофосфатизомераза; 3 – фософофруктокиназа; 4 – фруктозодифосфатальдолаза (альдолаза); 5 – триозофосфатизомераза.

**Рисунок 4.7 - Реакции гликолиза, гликогенолиза и спиртового брожения**

На второй стадии гликолиза глицеральдегид-3-фосфат окисляется при участии фермента фосфоглицеринальдегиддегидрогеназы. В результате окисления связь между остатком фосфоглицериновой кислоты и ферментом становится макроэргической, которая спонтанно распадается в присутствии фосфорной кислоты с образованием 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (рисунок 4.8, реакция 6), которая вступает далее в фосфотрансферазную реакцию с АДФ с образованием АТФ и превращается в 3-фосфоглицериновую кислоту (реакция 7).



Ферменты: 6 – глицеральдегидфосфат дегидрогеназа; 7 – фосфоглицераткиназа; 8 – фосфоглицеромутаза (мутаза); 9 – фосфорикуратгидратаза (енолаза); 10 – пируваткиназа; 11 – лактатдегидрогеназа; 11а – пируваткарбоксилаза; 11б – алкогольдегидрогеназа.

**Рисунок 4.8 - Реакции гликолиза, гликогенолиза и спиртового брожения (окончание)**

3-Фосфоглицериновая кислота в результате внутримолекулярного перемещения фосфатной группы при участии фермента фосфоглицератмутазы изомеризуется в 2-фосфоглицериновую кислоту (на схеме реакция 8).

Далее 2-фосфоглицериновая кислота при участии фермента енолазы превращается, теряя воду, в енольную форму фосфопировиноградной кислоты (фосфоенолпириват) — высокоэнергетического соединения (реакция 9).

В результате этой реакции происходит перераспределение внутримолекулярной энергии, и большая часть ее оказывается сконцентрированной в макроэргической фосфатной связи 2-фосфоенолпиривиноградной кислоты. Далее при участии пируваткиназы 2-фосфоенолпириват превращается в пировиноградную кислоту (пируват) (реакция 10). На этой стадии также происходит запасание энергии (синтез молекулы АТФ) в процессе фосфорилирования на уровне субстрата.

В зависимости от места и условий протекания процесса в организме, наличия или отсутствия в нем тех или иных ферментных систем обмен пировиноградной кислоты протекает различным образом. Если процесс идет в анаэробных условиях, то пировиноградная кислота восстанавливается до молочной кислоты (лактата) (реакция 11). Донором атомов водорода при этом служит восстановленный НАДН·Н<sup>+</sup>, образовавшийся в реакции дегидрирования (реакция 6).

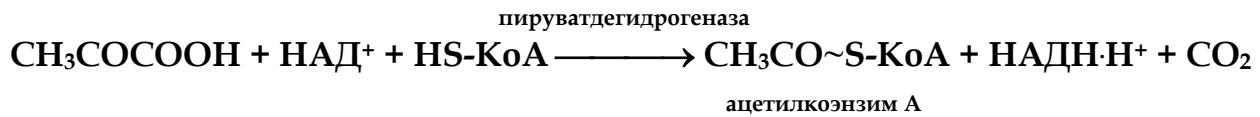
Реакция ускоряется специфическим ферментом — лактатдегидрогеназой. В анаэробных условиях каждая молекула глюкозо-6-фосфата дает 2 молекулы молочной кислоты. Если исходным углеводом для образования глюкозо-6-фосфата, а затем из него — молочной кислоты, служит глюкоза, то процесс называют гликолизом. Если исходным углеводом, дающим начало глюкозо-6-фосфату (через глюкозо-1-фосфат) и далее — молочной кислоте, является гликоген, то процесс называют *гликогенолизом*. Учитывая, что в случае, как гликолиза, так и гликогенолиза на промежуточных стадиях дихотомического распада синтезируется АТФ, процессы гликолиза и гликогенолиза служат средством получения организмом энергии в анаэробных условиях. Показано, что при гликолизе в макроэргических фосфатных связях АТФ аккумулируется около 35 — 40 % всей освобождающейся энергии. Остальные 65-70 % рассеиваются в форме теплоты.

В некоторых организмах, в частности в дрожжевых клетках, содержится мощная декарбоксилаза пировиноградной кислоты, способная в анаэробных условиях превращать пировиноградную кислоту в уксусный альдегид и углекислый газ (реакция 11 а). Образовавшийся уксусный альдегид восстанавливается за счет атомов водорода восстановленной формы НАДН·Н<sup>+</sup> (реакция 11 б). Этот процесс получил название спиртового брожения. Брожение может протекать и по другим направлениям с образованием других спиртов и органических кислот.

В аэробных условиях пировиноградная кислота окисляется до углекислого газа и воды. Вначале она подвергается *окислительному декарбоксилированию*. Реакция катализируется комплексом ферментов, состоя-

щим из 3 ферментов (в том числе пируватдегидрогеназа) и 5 коферментов (тиамилипрофосфат, липоевая кислота, НАД<sup>+</sup>, ФАД<sup>+</sup> и кофермент А), называемым *пируватдегидрогеназным комплексом* (ПДГК).

Механизм реакций окислительного декарбоксилирования очень сложен. В суммарном виде его можно представить следующим образом:



Образующийся ацетилкоэнзим А, вступает в центральный процесс обмена углеводов – *цикл трикарбоновых кислот* (ЦТК), или *цикл лимонной кислоты* (или, по имени автора – *цикл Кребса*).

Начало этого цикла – взаимодействие ацетил-КоА со щавелевоуксусной кислотой (ЩУК, или оксалоацетат). Активный центр фермента цитратсинтетазы способствует отрыву протона от метильной группы ацетил-КоА и образовавшийся карбанион атакует карбонильный атом углерода ЩУК с образование трикарбоновой лимонной кислоты (цитрата) (рисунок 4.9, реакция 1). Источником энергии в данной реакции служит энергия макроэргической связи в ацетил-КоА.

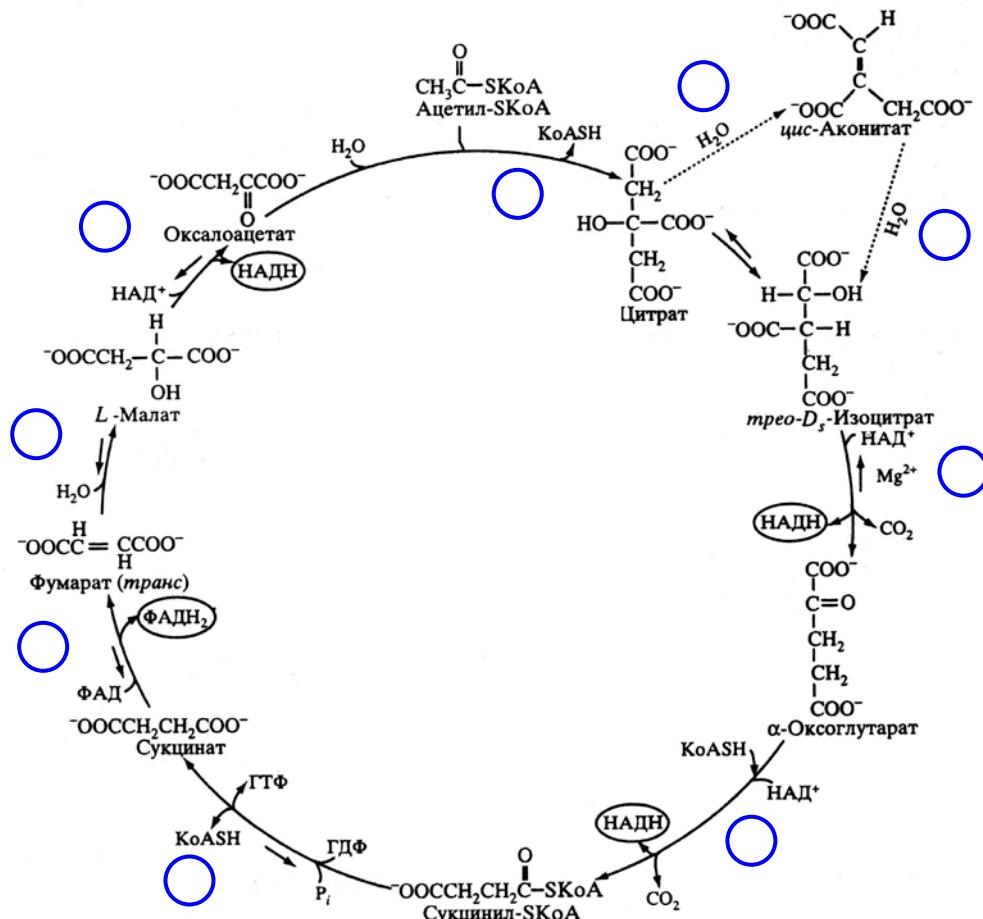


Рисунок 4.9 – Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)

В ходе дальнейшей реакции происходит изомеризация цитрата в изоцитрат через промежуточную кислоту – *цис-аконитовую* (реакции 2 и 3). Затем идет третья реакция – изоцитратдегидрогеназная. Подобно первой эта ре-

акция является необратимой и сопровождается она образованием  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты ( $\alpha$ -оксоглутарата) (реакция 4). Коферментом данной реакции выступает НАД<sup>+</sup>, а кофактором – Mg<sup>2+</sup>. Это первая реакция в цикле на которой образуется восстановленный НАДН·Н<sup>+</sup>. Кроме того, она является регулирующей для всего ЦТК (АДФ и НАД<sup>+</sup> – активируют, АТФ и НАДН·Н<sup>+</sup> – угнетают).

Следующая реакция – превращение  $\alpha$ -кетоглутарата в сукцинил-КоА. Данная реакция сходна с пируватдегидрогеназной и также катализируется комплексом трех ферментов и пяти коферментов. В результате такого окислительного декарбоксилирования образуется макроэргическое соединение – сукцинил-КоА и синтезируется еще одна молекула НАДН·Н<sup>+</sup> (реакция 5).

Сукцинилтиокиназа катализирует гидролиз сукцинил-КоА, при этом энергия макроэргического соединения сохраняется в результате синтеза гуанозинтрифосфата (ГТФ), клеточного аналога АТФ (реакция 6). Реакция протекает по механизму субстратного фосфорилирования.

Следующая стадия называется сукцинатдегидрогеназой и катализируется соответствующим ферментом – сукцинатдегидрогеназой (СДГ) (реакция 7). Акцептором водорода в данной реакции является кофермент ФАД. Особенностью СДГ является абсолютная стереоспецифичность при тщеплении атомов водорода только в *транс*-положении, в результате образуется только *транс*-изомер – фумаровая кислота (фумарат). Другая особенность СДГ – связь с мембранными митохондрий, в то время как остальные ферменты ЦТК находятся в растворенном состоянии в митохондриальном матриксе.

Реакцию гидратации фумарата до малата (янтарной кислоты) (реакция 8) катализирует фумараза, а последняя реакция – малатдегидрогеназная (реакция 9) – приводит к превращению малата вновь в оксалоацетат (ЩУК). Таким образом, цикл замыкается. Эта реакция также является НАД<sup>+</sup>-зависимой и сопровождается высвобождением последней молекулы НАДН·Н<sup>+</sup>.

Вся сложная система ферментов, обслуживающих ЦТК, теснейшим образом связанная с системой переносчиков электронов и протонов, локализована в митохондриях. Атомы водорода, полученные от субстратов в цикле, передаются от НАДН·Н<sup>+</sup> или восстановленного флавопротеина (ФАДН<sub>2</sub>) по цепи оксидоредуктаз и в конце концов попадают на атом кислорода с дальнейшим формированием молекул воды.

В результате всех трех стадий процесса катаболизма глюкозы по дихотомическому пути – гликолиз, окислительное декарбоксилирование пирувата и ЦТК – последняя полностью разлагается до шести молекул CO<sub>2</sub>. Количество молекул АТФ (в том числе и ГТФ) представляет собой энергетический эффект процесса окисления:

- на уровне гликолиза выделяются две молекулы АТФ;
- на уровне ЦТК – две молекулы ГТФ;

—в ходе аэробного окислительного фосфорилирования в митохондриях из 10 молекул НАДН $\cdot$ Н<sup>+</sup> образуется 30 молекул АТФ, а из 2 молекул ФАДН<sub>2</sub> — 4 молекулы АТФ.

Итоговая схема энергетического баланса имеет вид:

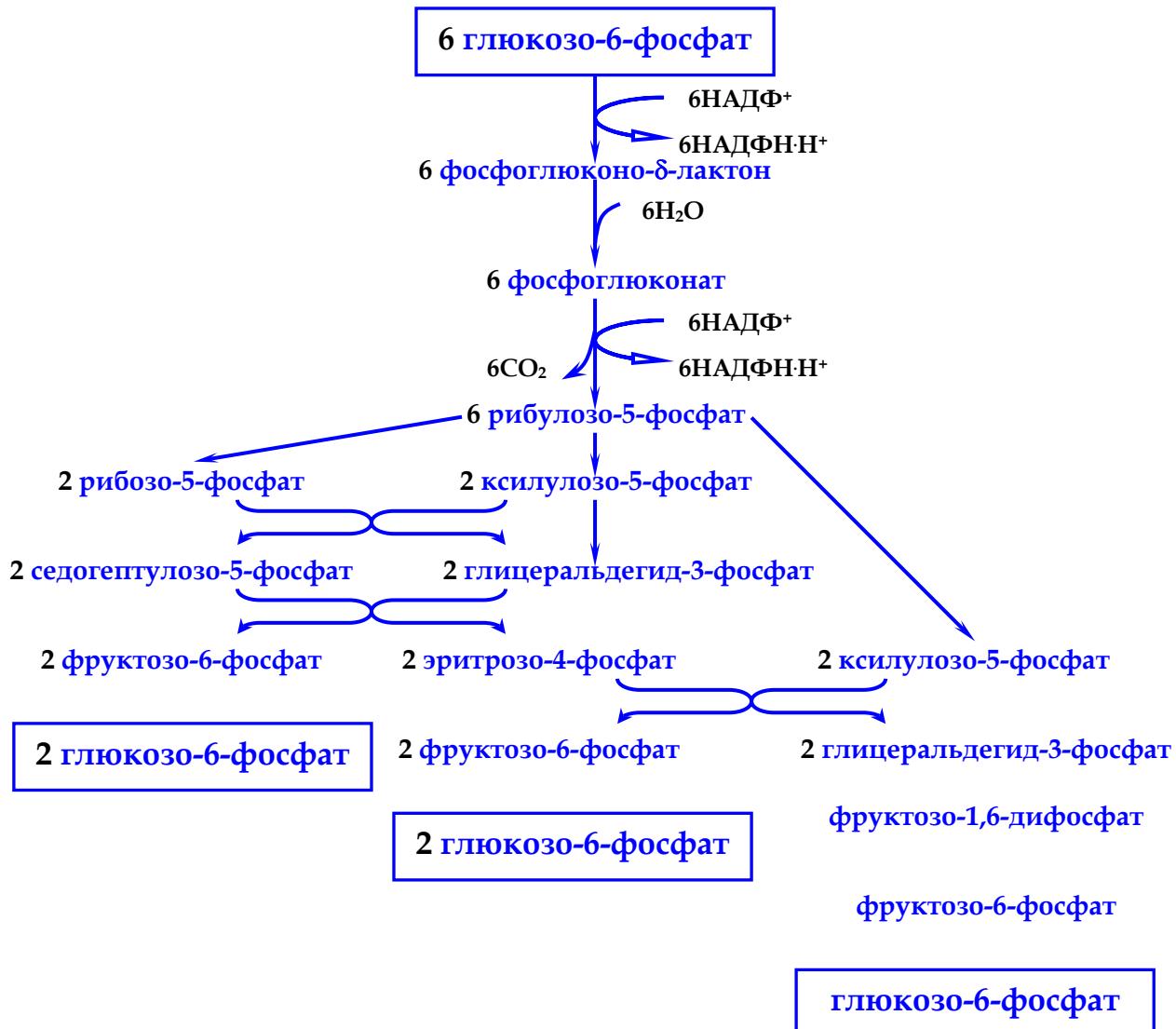
Итак, в ходе всего процесса расщепления глюкозы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  образуется 38 молекул АТФ. Однако, следует обратить внимание, что восстановленные в реакциях гликолиза две молекулы НАДН· $\text{H}^+$  могут при окислении в митохондриях давать не шесть молекул АТФ, а только четыре. Это объясняется тем, что в процессе транспорта энергии через митохондриальную мембрану при участии глицеролфосфатного челночного механизма происходит потеря энергии при передаче ее в цепи НАДН· $\text{H}^+$ -глицеролфосфат-ФАДН<sub>2</sub>. Таким образом, если в клетке (миоцит, нейрон) функционирует глицеролфосфатный челночный механизм, то при полном окислении глюкозы синтезируется не 38, а 36 молекул АТФ.

### **Аптомический путь распада глюкозы (пентозофосфатный путь)**

Основными путями распада углеводов являются гликолиз и ЦТК, но наряду с ними существуют и другие пути метаболизма углеводов. Один из них – распад глюкозо-6-фосфата до  $\text{CO}_2$  и пентоз (отсюда второе название пути – пентозофосфатный).

При аптомическом распаде глюкозо-6-фосфата не происходит его фосфорилирования и превращения во фруктозодифосфат с последующим расщеплением на две фосфотриозы. В этом случае глюкозо-6-фосфат подвергается прямому окислению с отщеплением  $\text{CO}_2$  и образованием пентозофосфата. Сначала глюкозо-6-фосфат при участии НАДФ-зависимой де-

гидрогеназы окисляется до 6-фосфоглюконолактона, который затем превращается в 6-фосфоглюконовую кислоту (рисунок 4.10).

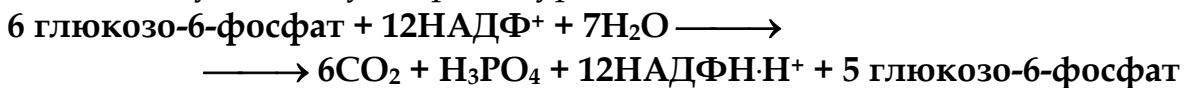


**Рисунок 4.10 - Реакции аптомического (пентозофосфатного) пути окисления углеводов**

6-Фосфоглюконовая кислота под влиянием НАДФ-зависимой дегидрогеназы подвергается дегидрированию, а затем декарбоксилированию с образованием рибулозо-5-фосфата и одной молекулы  $\text{CO}_2$ .

Дальнейший обмен рибулозо-5-фосфата протекает весьма сложно. Многократно изомеризуясь, в частности переходя в рибозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат, а также вступая в транскетолазные и трансальдолазные реакции, сущность которых состоит в переносе двух- и трехуглеродных фрагментов от одного фосфорного эфира к другому, рибулозо-5-фосфат снова превращается в глюкозо-6-фосфат. Подсчитано, что из шести молекул рибулозо-5-фосфата образуются 5 молекул глюкозо-6-фосфата, т.е. суммарный эффект всех реакций при аптомическом распаде глюкозо-6-фосфата сводится к тому, что из каждой из шести его молекул одна полностью разрушается (рисунок 4.10).

Весь ход аптомического распада глюкозо-6-фосфата можно представить в виде следующего суммарного уравнения:



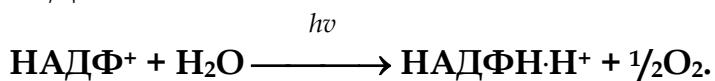
Окисление 12 молекул НАДФН·Н<sup>+</sup> в цепи дыхательных ферментов приводит к образованию 36 молекул АТФ.

### 4.3.2. АНАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ

Простые углеводы возникают, главным образом, при первичном биосинтезе органического вещества, осуществляемом растениями, а также фотосинтезирующими и хемосинтезирующими бактериями (автотрофные организмы) путем восстановления углекислого газа атмосферы с одновременным формированием органических молекул, содержащих цепи углеродных атомов.

Гетеротрофные организмы, использующие для построения своего тела уже готовые органические вещества, поскольку способностью к первичному биосинтезу они не обладают, однако могут образовывать их за счет перестройки органических соединений потребляемой пищи.

Одновременно с фотосинтетическим фосфорилированием осуществляется и другая важнейшая для первичного биосинтеза органических веществ реакция — высвобождение в результате фотолиза воды атомов водорода, необходимых для восстановления СО<sub>2</sub>, промежуточным акцептором которых является НАДФ<sup>+</sup>:



Темновые реакции фотосинтетического восстановления СО<sub>2</sub> осуществляются после его связывания в результате карбоксилирования рибулозо-1,5-дифосфата, который образуется путем фосфорилирования рибулозо-5-фосфата — продукта аптомического распада глюкозы, всегда присутствующего в клетке. Именно на этом этапе расходуется АТФ, необходимая для первичного биосинтеза углеводов.

Рибулозо-1,5-дифосфат сначала изомеризуется в енольную форму, которая затем присоединяет углекислый газ. Возникший промежуточный продукт расщепляется на две молекулы фосфоглицериновой кислоты (рисунок 4.11).

На следующем этапе 3-фосфоглицериновая кислота восстанавливается в 3-фосфоглицериновый альдегид, легко переходящий в диоксиацитон-фосфат. При воздействии альдолазы из фосфотриоз синтезируется фруктозо-1,6-дифосфат, переходящий во фруктозо-6-фосфат путем гидролиза под действием фруктозо-1,6-дифосфатазы. Фруктозо-6-фосфат легко превращается в фосфорные эфиры других моносахаридов, что в итоге обеспечивает синтез всего набора природных моносахаридов, а из них — дисахаридов и полисахаридов.

У гетеротрофов исходными веществами для синтеза простых углеводов

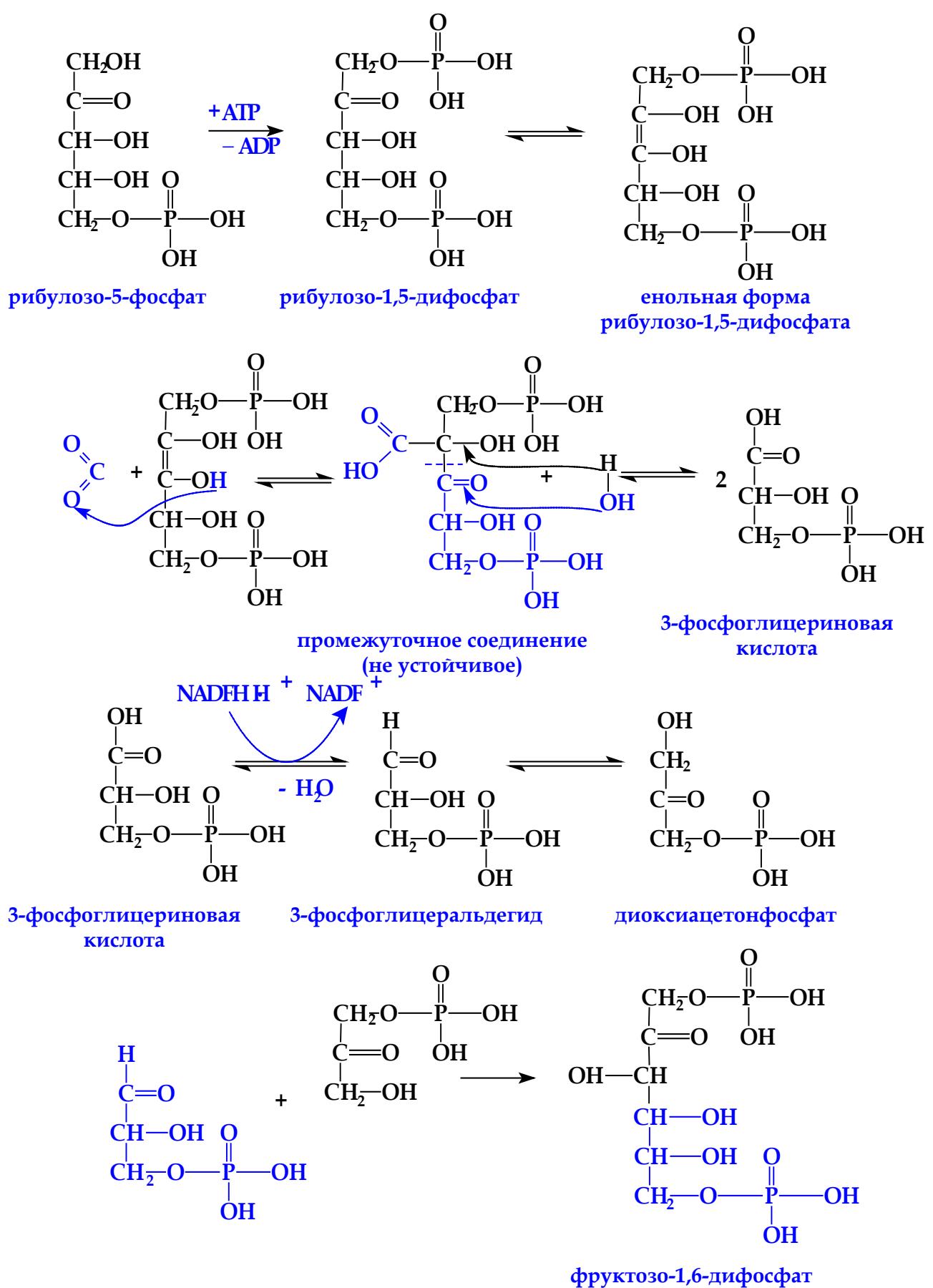


Рисунок 4.11 - Темновые реакции фотосинтеза

могут служить продукты распада липидов, белков и других органических соединений. Центральным звеном в переходе этих соединений в простые углеводы является образование пировиноградной кислоты.

Переход от пировиноградной кислоты к углеводам осуществляется путем обращения процесса дихотомического распада углеводов (*глюконеогенез*).

Биосинтез олигосахаридов осуществляется путем реакций трансгликозилирования, причем перенос гликозильного остатка на данный моносахарид идет от фосфорного эфира другого моносахарида и ускоряется специфической гликозилтрансферазой.

Активным донором гликозильных остатков в реакциях трансгликозилирования является уридинифосфатглюкоза (УДФ-глюкоза) и построенные аналогично другие нуклеозидифосфатсахара

Синтез полисахаридов (глюканов) также осуществляется путем трансгликозилирования гликозильных остатков на невосстановляющий конец растущей цепи полисахарида от субстратов: фосфорных эфиров моносахаридов, уридинифосфатсахаров и олигосахаридов.

Реакции переноса остатков моносахаридов в процессе биосинтеза полисахаридов ускоряются соответствующими гликозилтрансферазами. Такие реакции могут многократно повторяться, что обеспечивает ступенчатый синтез молекул полисахаридов.

## 4.4. ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Многие аспекты обмена нуклеиновых кислот имеют непосредственное отношение к важнейшим проблемам биологии: расшифровке молекулярных механизмов, определяющих синтез различных макромолекулярных структур, изучению законов наследственности, передаче биохимической специфичности от родителей к потомству, механизму клеточной дифференцировки и т.д.

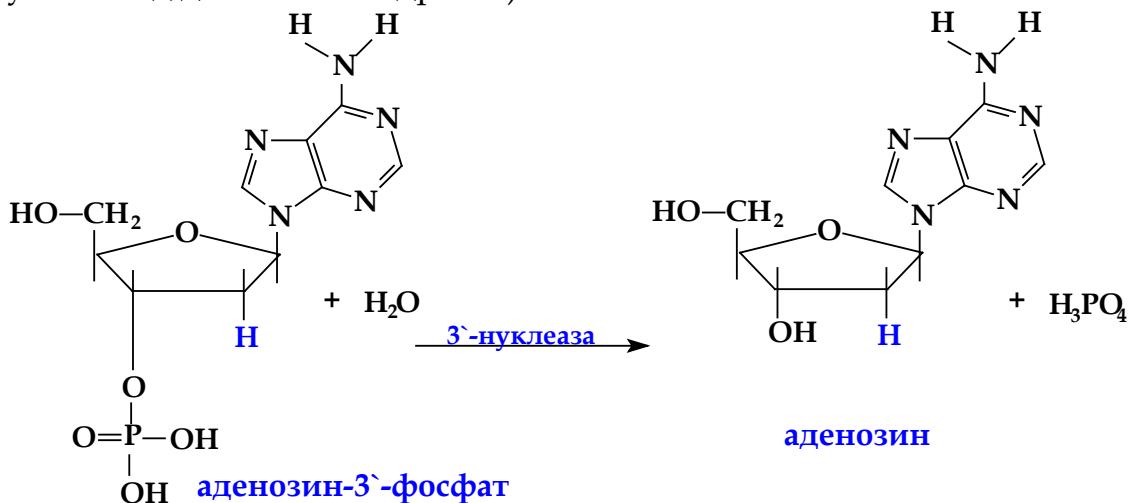
### 4.4.1. КАТАБОЛИЗМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты распадаются в организме под действием специфических ферментов, называемых *нуклеазами*, или *фосфодиэстеразами*. Нуклеазы, действующие на внутренние межнуклеотидные связи в молекулах нуклеиновых кислот, называют *эндонуклеазами*. При их участии осуществляется деполимеризация нуклеиновых кислот, в основном до олигонуклеотидов. Нуклеазы, ускоряющие реакции последовательного отщепления нуклеотидов от РНК, ДНК или их фрагментов, начиная с конца полинуклеотидной цепи, называют *экзонуклеазами*. Они обеспечивают распад нуклеиновых кислот до свободных нуклеотидов.

В зависимости от специфичности действия среди нуклеаз различают *рибонуклеазы* (ускоряют реакции распада как внутренних, так и концевых межнуклеотидных связей в молекулах РНК) и *дезоксирибонуклеазы* (выполняют ту же функцию по отношению к молекулам ДНК). Вместе с тем существует большая группа неспецифических эндо- и экзонуклеаз, действующих одновременно и на РНК, и на ДНК. Все нуклеазы относятся к классу гидролаз.

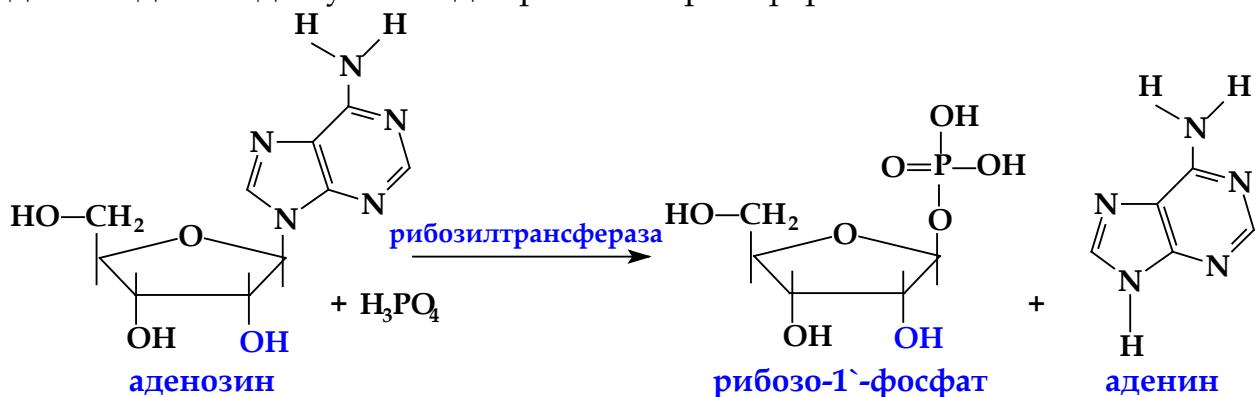
В результате действия разнообразных эндо- и экзонуклеаз нуклеиновые кислоты распадаются на сложную смесь индивидуальных нуклеотидов – рибо- и дезоксирибонуклеозид-3'- и -5'-фосфатов.

Нуклеозидфосфаты претерпевают дальнейший распад (дефосфорилируются под действием гидролаз):

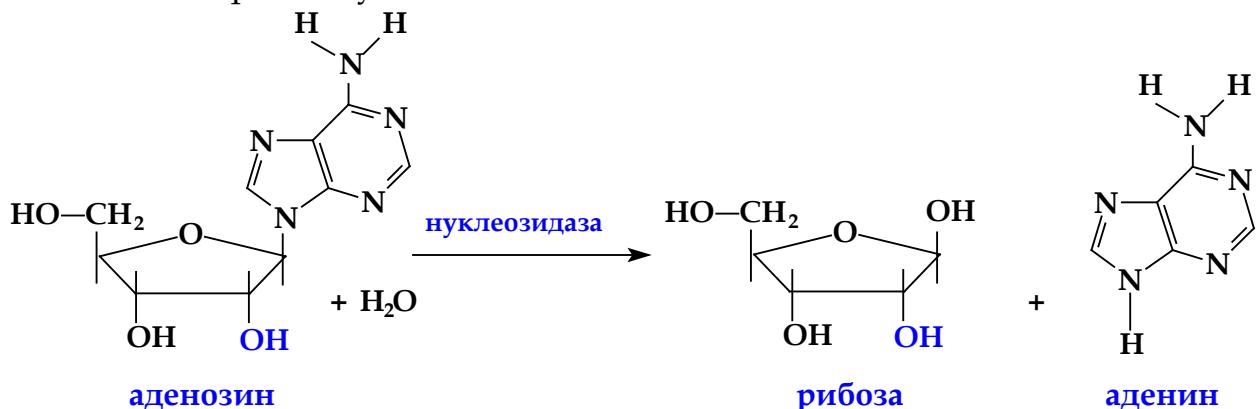


На следующей ступени распада осуществляется перенос остатка рибо-

зы от нуклеозида на фосфорную кислоту, что ускоряется специфическими для каждого вида нуклеозидов рибозил-трансферазами:



либо гидролиз нуклеозидов:



Рибоза и рибозо-1-фосфат включаются в реакции обмена, характерные для углеводов; пуриновые и пиримидиновые основания подвергаются дальнейшему распаду.

Первая фаза распада пуриновых и пиримидиновых оснований заключается в дезаминировании тех из них, которые обладают аминогруппами. Этот процесс осуществляется при помощи специфических аминогидролаз, например, аденинаминогидролаза, цитидинаминогидролаза.

В результате аденин превращается в гипоксантин, гуанин переходит в ксантин, цитозин преобразуется в урацил. Пуриновые основания (гипоксантин и ксантин) окисляются в мочевую кислоту (рисунок 4.12).

В отличие от гипоксантина и ксантина дезаминированные пиримидиновые основания подвергаются восстановлению, при этом урацил переходит в дигидроурацил, а затем последний претерпевает гидролиз и распад до  $\beta$ -аланина, аммиака и  $\text{CO}_2$  (рисунок 4.13).

Таким образом, сложные молекулы нуклеотидов в процессе распада в организмах животных и растений превращаются в относительно простые соединения, которые либо выводятся из организма ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  и др.), либо участвуют в синтезе нуклеиновых кислот.

#### 4.4.2. АНАБОЛИЗМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Исходными веществами для биосинтеза молекул ДНК служат дезокси-

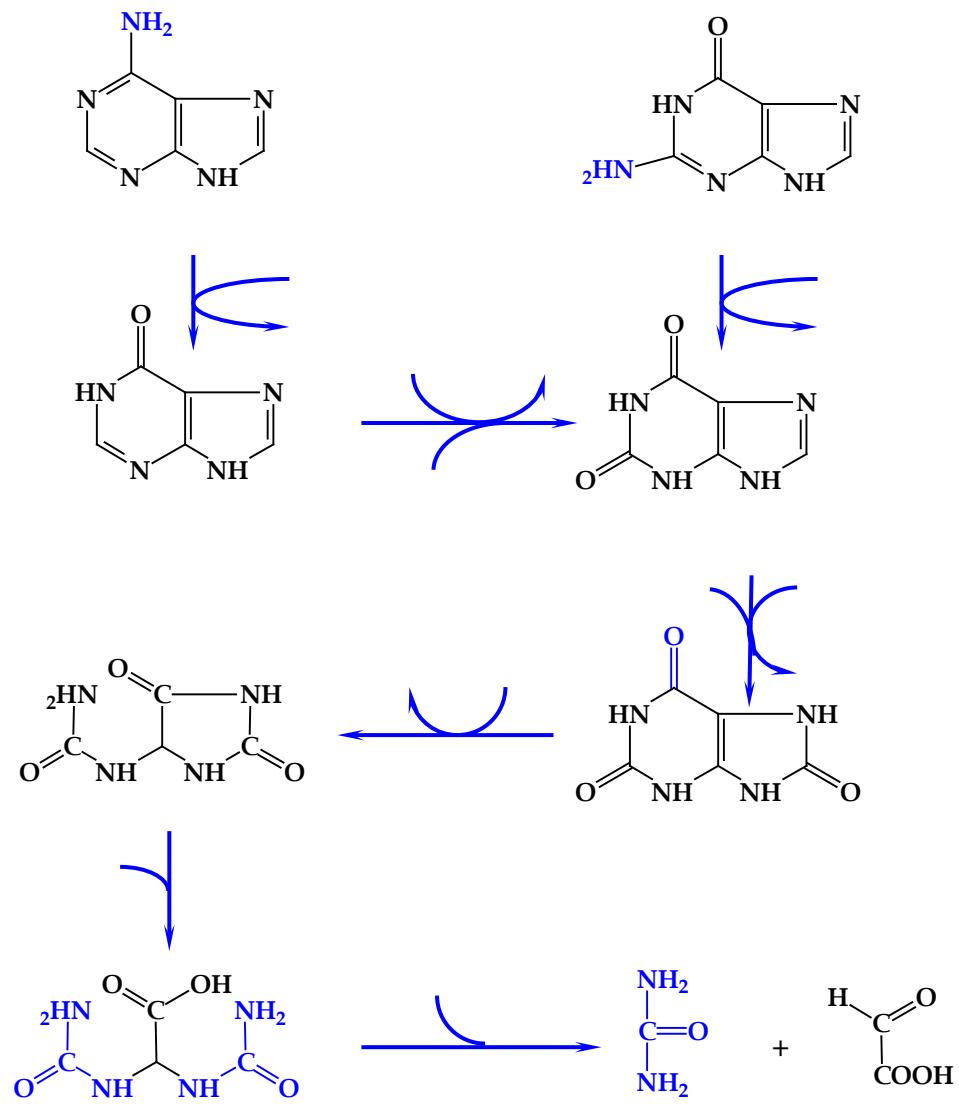


Рисунок 4.12 - Катаболизм пуриновых оснований

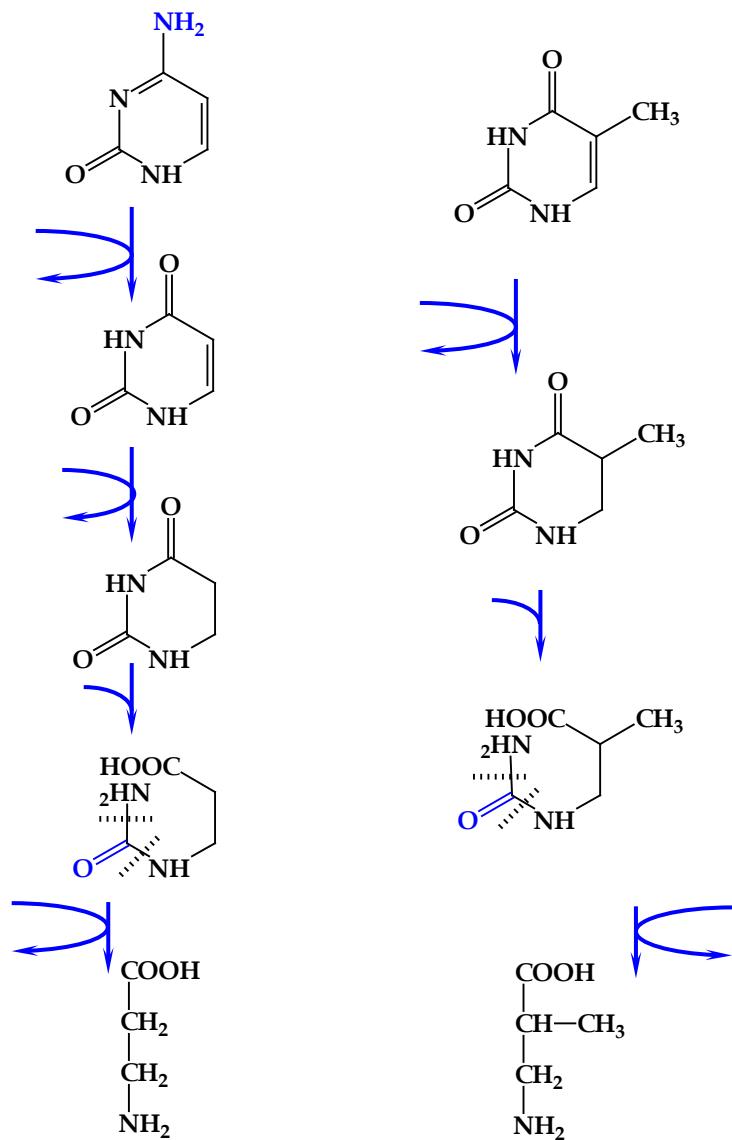


Рисунок 4.13 - Катаболизм пиримидиновых оснований

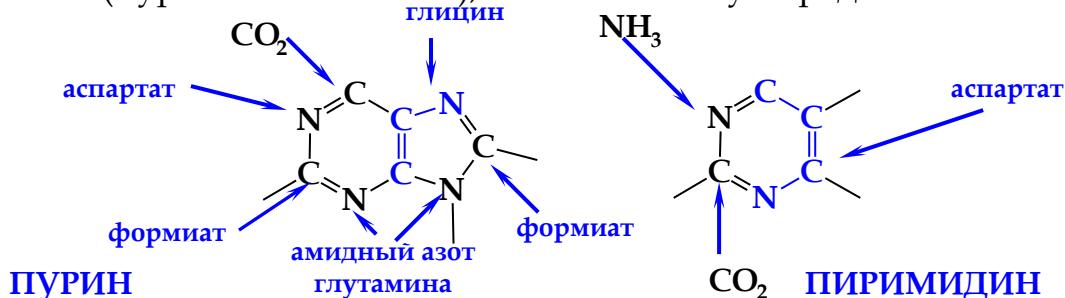
рибонуклеозид-5'-трифосфаты, а специфическое расположение нуклеотидных остатков в молекулах ДНК обеспечивается взаимодействием комплементарных оснований, принадлежащих, с одной стороны, полинуклеотидной матрице, а с другой — нуклеозидтрифосфатам. Аналогично идет специфический биосинтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов на ДНК-матрице.

Из трех основных частей нуклеотида (азотистого основания, фосфорной кислоты и пентозы) фосфорная кислота всегда присутствует в клетках, рибоза образуется при распаде углеводов, и только гетероциклическое основание создается специфическим путем.

Пути синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований различны. Но есть некоторые сходные черты в механизмах синтеза пуринового и пиримидинового циклов:

- использование глицина, аспарагина и глутамина в качестве источников азота гетероциклических колец;
- включение в состав пуриновых и пиримидиновых циклов атомов углерода углекислого газа и муравьиной кислоты;
- построение пуринового основания и завершение синтеза пиримидинового основания на рибозо-5-фосфате, в результате чего конечными продуктами биосинтеза являются сразу нуклеозид-5'-фосфаты;
- ферментативный характер всех реакций, осуществляющихся в процессе синтеза нуклеотидов;
- возникновение на определенном этапе биосинтеза общих предшественников (инозин-5'-монофосфата — для пуриновых нуклеотидов, уридин-5'-монофосфата — для пиримидиновых).

Как видно на схеме, два атома азота пуринового кольца происходят из амидной группы глутамина, третий атом азота — из аспартата (аспарагиновой кислоты) и, наконец, четвертый — из глицина. Четвертый и пятый атомы углерода также происходят из глицина. Таким образом, молекула глицина дает три атома. Второй и восьмой атомы углерода происходят из формиата (муравьиной кислоты), а шестой атом углерода — из  $\text{CO}_2$ :



Формирование пуринового кольца сразу идет на рибозо-5-фосфате, и в результате последовательных реакций наращивания пуринового цикла образуется инозин-5'-монофосфат (ИМФ) — ключевое соединение в синтезе пуриновых нуклеотидов. Инозин-5'-фосфат способен окисляться в ксантоzin-5'-фосфат.

В результате аминирования инозин-5'-монофосфата синтезируется аденоzin-5'-монофосфат (АМФ), а из АМФ при восстановлении — дезокси-

аденозин-5'-монофосфат (дАМФ). Ксантозин-5'-монофосфат (КМФ) превращается в гуанозин-5'-монофосфат (ГМФ) путем аминирования.

В процессе синтеза пиримидиновых оснований один атом азота цикла пиримидина происходит из аммиака, атом углерода — из углекислого газа, а второй атом азота и остальные атомы углерода — из аспаргиновой кислоты. В результате последовательных реакций наращивания пиримидинового цикла при дальнейшем участии фосфорилированной рибозы образуется уридин-5'-монофосфат (УМФ) — ключевое соединение в биосинтезе пиримидиновых нуклеотидов.

Уридин-5'-монофосфат далее превращается в цитидин-5'-монофосфат (ЦМФ), а также в дезоксиуридин-5'-монофосфат (дУМФ) и дезокситимидин-5'-монофосфат (дТМФ).

Пуриновые и пиримидиновые нуклеозид-5'-монофосфаты (НМФ и дНМФ) превращаются в макроэргические нуклеозид-5'-дифосфаты (НДФ и дНДФ), которые далее переходят в богатые энергией нуклеозид-5'-трифосфаты (НТФ и дНТФ). Процессы фосфорилирования нуклеотидов идут при их взаимодействии с универсальным источником энергии АТФ при участии специфических фосфотрансфераз (киназ).

Синтез дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов (дНТФ) осуществляется посредством реакции восстановления рибозы по гидроксильной группе при втором углеродном атоме. Эта реакция свойственна как нуклеозидмонофосфатам, так и нуклеозиддифосфатам.

Биосинтез всех дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов и рибонуклеозид-5'-трифосфатов регулируется в клетке таким образом, что они возникают зависимо друг от друга в строго определенных соотношениях.

## 4.5. ОБМЕН ЛИПИДОВ

Жиры – основной источник энергии в организме. Жиры значительно превосходят по энергетической ценности углеводы и в значительных количествах могут запасаться в качестве «резервного топлива».

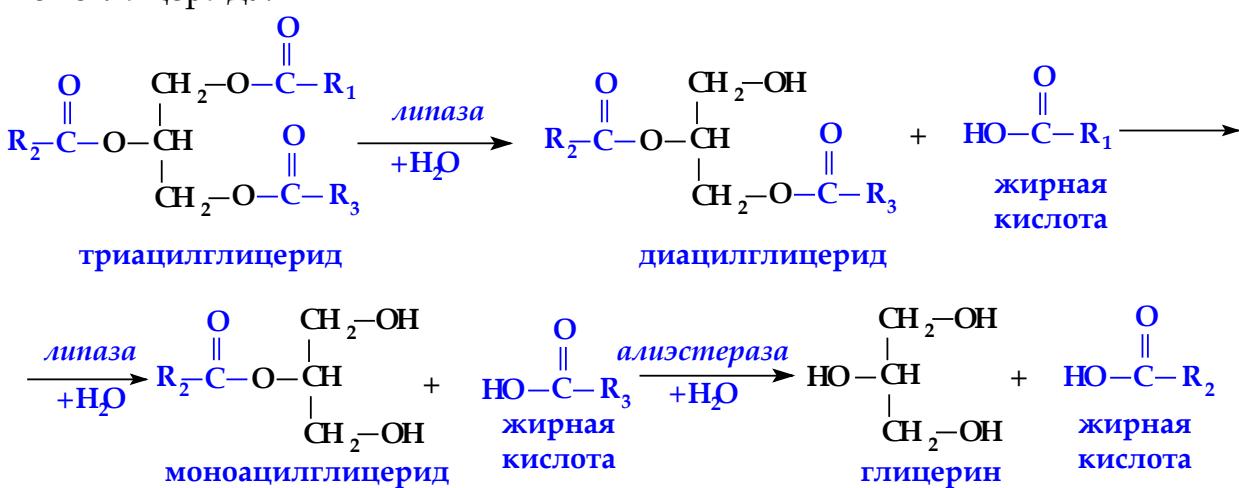
Характерным структурным компонентом большинства липидов являются высшие жирные кислоты. В состав жиров чаще всего входят кислоты с 16 – 18 атомами углерода, среди них имеются насыщенные и ненасыщенные высшие жирные кислоты.

### 4.5.1. КАТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

Распад жиров (триглицеридов) начинается с их гидролиза, в результате чего образуются глицерин и высшие жирные кислоты. Гидролиз триглицеридов, входящих в состав пищи, у высших животных происходит преимущественно в тонком кишечнике и катализируется липолитическими ферментами – панкреатическими липазами, вырабатываемыми поджелудочной железой.

Эти ферменты бывают двух типов: одни из них специфичны в отношении эфирных связей в  $\alpha$ -положении триглицерида, другие гидролизуют связи в  $\beta$ - положении.

Полный гидролиз триглицеридов идет ступенчато: сначала быстро гидролизуются  $\alpha$ -связи, а потом уже идет медленный гидролиз  $\beta$ -моноацилглицерида:



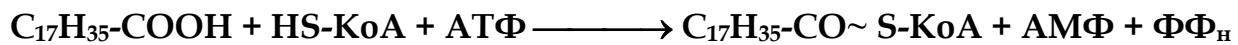
Глицерин независимо от того, поступит ли он на ресинтез жиров или будет претерпевать дальнейший распад, прежде всего фосфорилируется. Донором остатка фосфорной кислоты в этой реакции служит АТФ. Образующийся фосфоглицерин в основном расходуется на синтез новых молекул триглицеридов, но часть его окисляется с образованием диоксиацетонфосфата.

Диоксиацетонфосфат изомеризуется в 3-фосфоглицериновый альдегид, который затем вступает в обменные реакции.

Высшие жирные кислоты распадаются преимущественно путем  $\beta$ -

*окисления*, получившего такое название потому, что в молекуле жирной кислоты окисление протекает по  $\beta$ -углеродному атому, при этом от кислоты отщепляется двухуглеродный фрагмент. Ненасыщенные высшие жирные кислоты (олеиновая, линоловая, линоленовая и др.) предварительно восстанавливаются до предельных кислот. Окисление предельных высших жирных кислот осуществляется ступенчато. Все реакции многостадийного окисления ускоряются специфическими ферментами.  $\beta$ -Окисление высших жирных кислот у млекопитающих происходит во многих тканях, в первую очередь в печени, почках и сердце.

*Первым этапом*  $\beta$ -окисления высших жирных кислот является их активирование путем образования соединения с коэнзимом А (HS-КоА). Эта реакция протекает в цитоплазме с использованием энергии АТФ и приводит к образованию ацилкоэнзима А (ацил-СКоА). Взаимодействие высших жирных кислот с коэнзимом А ускоряется специфическими лигазами — ацил-СКоА-сингетазами:



*Вторая стадия* распада высших жирных кислот состоит в окислении ацилкоэнзима А при посредстве ацил-СКоА-дегидрогеназы, содержащей ФАД<sup>+</sup> в качестве кофермента (рисунок 4.14, реакция 1).

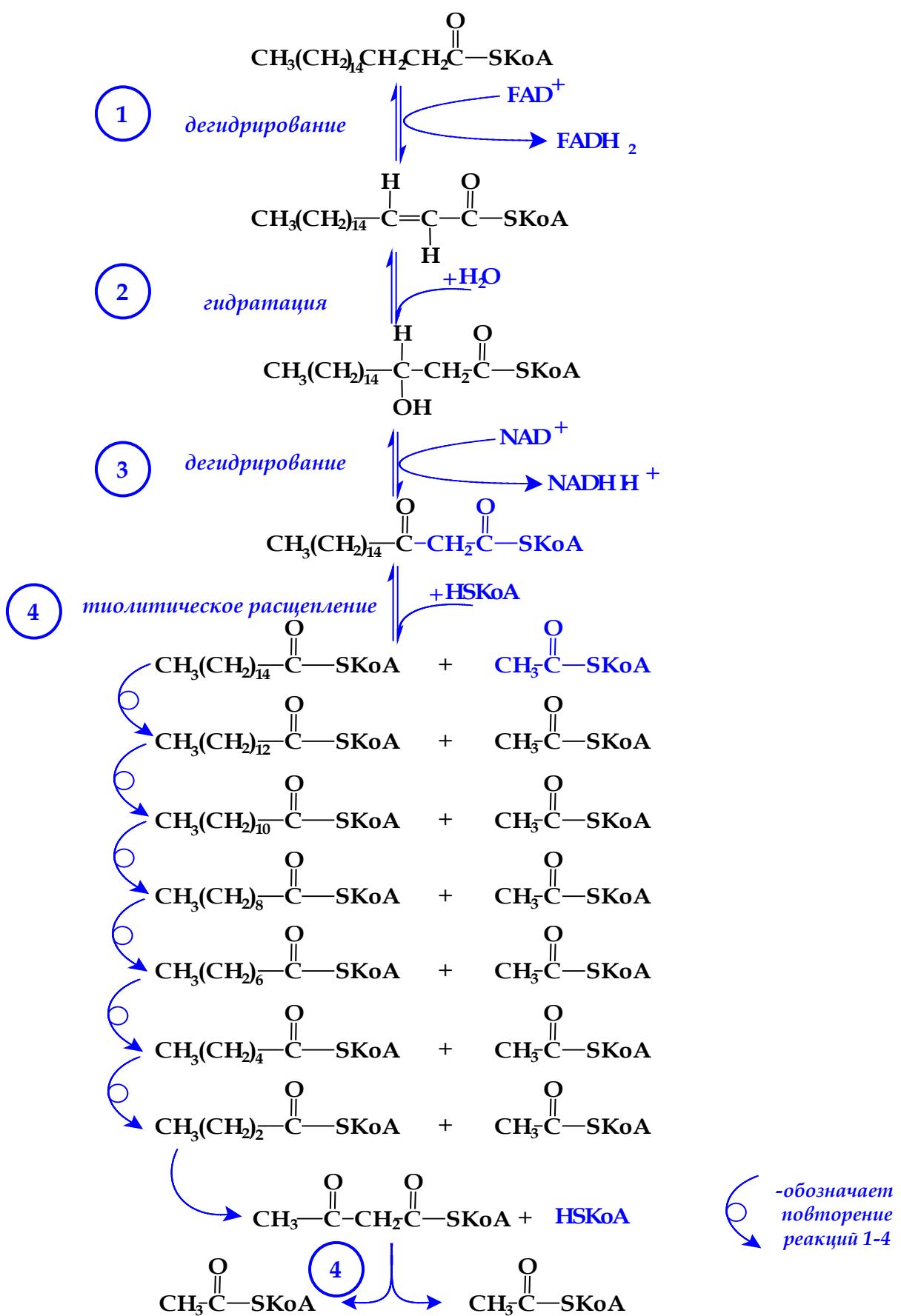
*Третья стадия* окисления высших жирных кислот состоит в присоединении молекулы воды (гидратация) по месту двойной связи дегидроацил-КоА. Эта реакция ускоряется соответствующими гидролиазами (еноил-СКоА-гидратазами) (реакция 2).

*Четвертая стадия* распада высших жирных кислот заключается в их новом окислении путем отнятия двух атомов водорода (дегидрирование) в  $\beta$ -положении по отношению к карбоксильной группе (реакция 3). Реакция катализируется оксидоредуктазой, но (в отличие от первой стадии окисления) с участием НАД<sup>+</sup> в качестве кофермента.

*Пятая стадия* распада заключается в переносе  $\beta$ -кетоацил-СКоА-ацильной группировки на новую молекулу коэнзима А. Этот процесс ускоряется соответствующей ацилтрансферазой, называемой тиолазой, поскольку реакция по существу представляет расщепление связи  $-\text{C}-\text{C}-$  с присоединением по месту разрыва элементов HS-группы (тиолиз или тиолитическое расщепление) (реакция 4).

В результате описанных выше реакций молекула высшей жирной кислоты (стеариновой в рассматриваемом примере) укорачивается на два углеродных атома, и образуются пальмитиновая и уксусная кислоты в виде производных коэнзима А (пальмитил- и ацетил-СКоА). Этот процесс многократно повторяется. Так, пальмитил-СКоА снова дегидрируется, затем гидратируется, еще раз дегидрируется и расщепляется на  $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{-CO-S-KoA}$  и новую молекулу ацетил-СКоА. В свою очередь  $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{-CO-S-KoA}$  дает  $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{-CO-S-KoA}$  и еще молекулу ацетил-СКоА и т.д. (рисунок 4.14).

Окончательным продуктом  $\beta$ -окисления высших жирных кислот в организме является ацетил-СКоА.



**Рисунок 4.14 - Реакции  $\beta$ -окисления жирных кислот  
(на примере стеариновой кислоты)**

$\beta$ -Окисление высших жирных кислот протекает в митохондриях, в липопротеидной мемbrane которых расположены ансамбли ферментов, обеспечивающих ряд индивидуальных реакций, составляющих процесс  $\beta$ -окисления. Поскольку в митохондриях локализованы также ферменты дыхательного цикла, ведущие передачу атомов водорода и электронов на кислород сопряжено с окислительным фосфорилированием,  $\beta$ -окисление высших жирных кислот является источником энергии для синтеза АТФ.

В процессе распада пальмитиновой кислоты проходит 7 циклов  $\beta$ -окисления, в каждом из которых образуются 5 молекул АТФ (посредством восстановленных ФАДН<sub>2</sub> и НАДНН<sup>+</sup>).

При окислении пальмитата до ацетил-SKoA образуются 35 молекул АТФ. Восемь молекул ацетил-SKoA дают в результате полного сгорания в цикле Кребса  $8 \cdot 12 = 96$  молекул АТФ. Одна молекула АТФ затрачивается на активирование пальмитата. Следовательно, энергетический эффект составляет 130 молекул АТФ.

Если бы ацетил-SKoA накапливался в организме, то запасы HS-KoA быстро исчерпалась бы, и окисление высших жирных кислот остановилось. Этого не происходит, так как HS-KoA быстро освобождается из состава ацетил-SKoA в результате следующих процессов:

- ацетил-SKoA включается в ЦТК, где окисляется до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O;
- ацетил-SKoA используется для синтеза полициклических спиртов (стеролов) и соединений, содержащих изопреноидные группировки;
- ацетил-SKoA является универсальным донором ацетильных групп для реакций ацетилирования (синтез ацетилхолина, N-ацетилглюкозамина и т.п.).

Основная масса природных липидов содержит жирные кислоты с четным числом атомов углерода. Однако в липидах растений некоторых морских организмов присутствуют жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода в цепи. Кроме того, у жвачных животных, в процессе переваривания углеводов в рубце образуется большое количество пропионовой кислоты, которая содержит три атома углерода. Жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода окисляются таким же образом, что и кислоты с четным числом атомов, с той лишь разницей, что на последнем этапе  $\beta$ -окисления образуется одна молекула ацетил-SKoA и одна молекула пропионил-SKoA. Последний затем карбоксилируется и включается в дальнейшее окисление в форме сукцинил-SKoA (рисунок 4.15).

Расщепление ненасыщенных жирных кислот в ходе  $\beta$ -окисления происходит через дополнительные стадии гидратации по месту двойной связи между вторым и третьим атомами углерода.

Обязательным условием в таком случае является наличие *транс*-двойной связи. В случае *цис*-изомера жирной кислоты необходим дополнительный фермент — *цис-транс*-изомераза. D-изомер, образующийся в ходе гидратации *цис*-связи, преобразуется ферментом эпимеразой в L-форму жирной кислоты. После таких преобразований цикл  $\beta$ -окисления продолжается.

жается как обычно (рисунок 4.16).

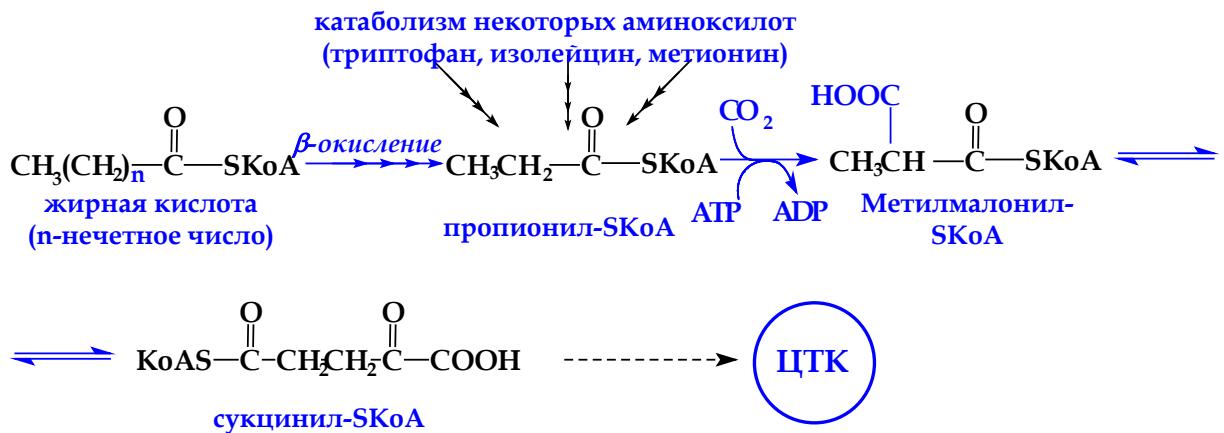


Рисунок 4.15 -  $\beta$ -Окисление жирных кислот с нечетным числом атомов углерода в цепи (конечные стадии)

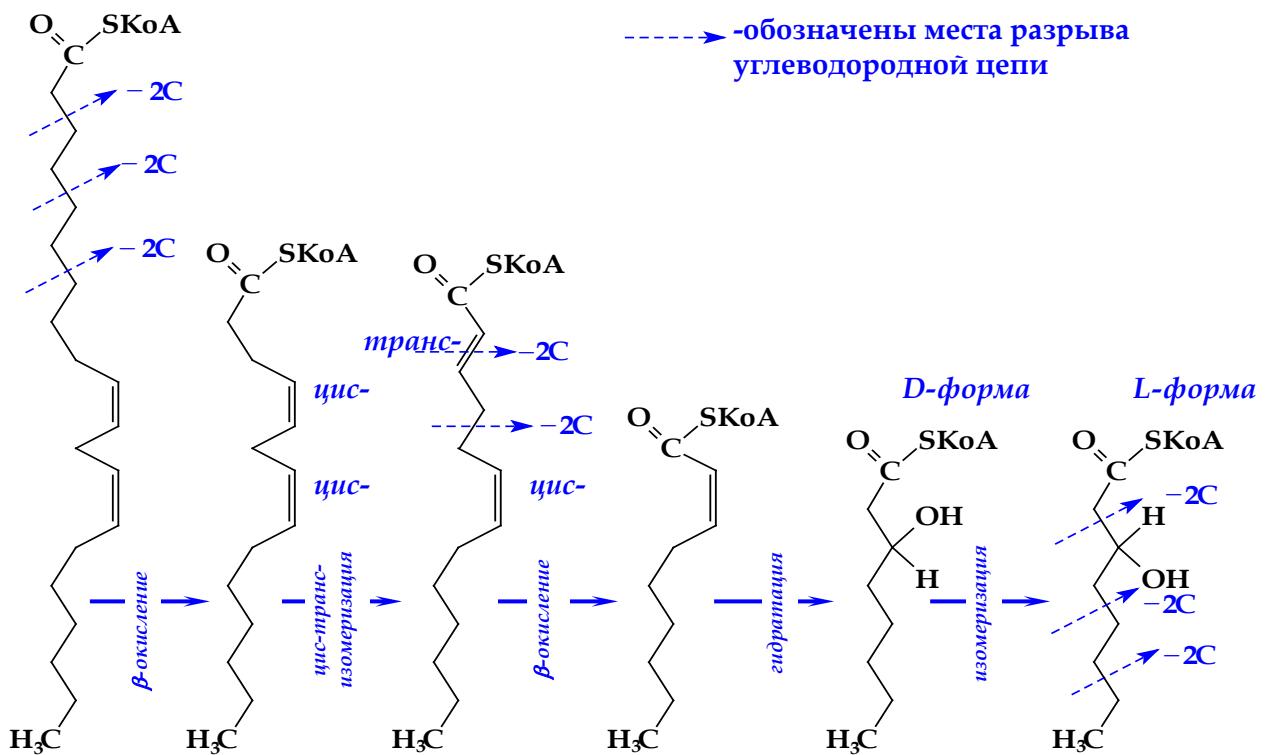


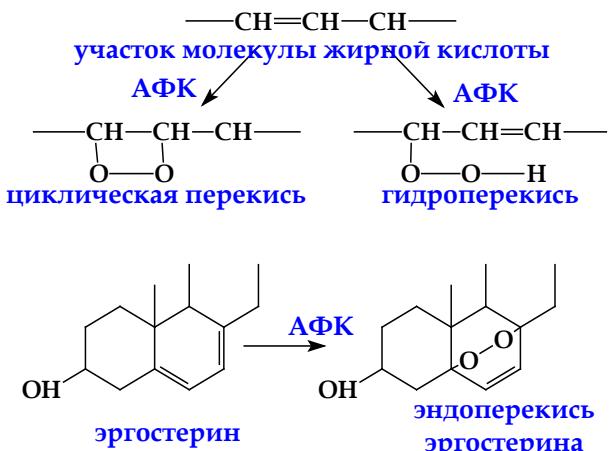
Рисунок 4.16 - Дополнительные реакции  $\beta$ -окисления ненасыщенных жирных кислот

Липиды, в особенности жирные кислоты, могут неферментативно, под влиянием различных веществ окисляться до пероксидов (особенно характерен этот процесс для ненасыщенных жирных кислот). Такой процесс называется перекисным окислением липидов.

На рисунке 4.17 изображены примеры образования перекисей липидами различной природы.

Чрезмерное свободнорадикальное окисление липидов приводит к прогорканию масел, а в организме – к поражению мембран клеток, инактивации ферментов, накоплению биологически инертных полимеров.

При избыточном количестве липидов в пище, заболевании диабетом



**Рисунок 4.17 - Химизм перекисного окисления липидов**

в моче.

образуются кетоновые (или ацетоновые) тела, представляющие собой смесь ацетона, ацетоуксусной кислоты и  $\beta$ -гидроксибутиратов.

В норме образуется небольшое количество кетоновых тел. В небольших количествах они выделяются почками или преобразуются в ацетил-SKoA (в сердце, мышцах, мозгу, но не в печени).

Избыточное накопление кетоновых тел вызывает кетонурию – повышенное содержание последних

#### 4.5.2. АНАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

Долгое время считали, что биосинтез высших жирных кислот осуществляется путем обращения реакций  $\beta$ -окисления высших жирных кислот. Однако было обнаружено, что хотя исходным соединением для синтеза высших жирных кислот является ацетил-SKoA, механизм биосинтеза высших жирных кислот существенно отличается от простого обращения реакций  $\beta$ -окисления.

Полный синтез насыщенных жирных кислот осуществляется в растворимой части цитоплазмы. Процесс синтеза катализируется особым синтазным комплексом, называемым *синтазой высших жирных кислот*. Этот мультиферментный комплекс имеет молекулярную массу 400-560 кДа и состоит он из двух идентичных полипептидных цепей (димер). Каждая из цепей (мономеров) длиной около 2300 аминокислотных остатков образует в третичной структуре три домена и в их составе 7 субдоменов, одним из которых является ацилпереносящий белок (АПБ), а шести остальным присуща определенная ферментативная функция.

Ацилпереносящий белок служит «якорем», к SH-группе которого в ходе удлинения цепи жирной кислоты прикрепляются ацильные промежуточные продукты. Ацилирование субдомена АПБ осуществляется путем образования тиоэфирной связи.

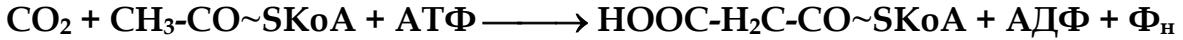
Еще одной особенностью биосинтеза жирных кислот является его пространственная компартментализация. Если  $\beta$ -окисление жирных кислот протекает в митохондриях, то их биосинтез протекает в цитоплазме. Только жирные кислоты с длиной цепи более 16 атомов углерода синтезируются в митохондриях, здесь же протекает процесс превращения насыщенных кислот в ненасыщенные.

Ацетил-SKoA образуется в клетке преимущественно в процессе внутримитохондриального окисления. Известно, что митохондриальная мембрана не проницаема для ацетил-SKoA, а потому в клетке имеются его спе-

циальные переносчики, а если быть точнее целые транспортные системы: ацил-карнитиновая и цитрат-транспортная системы.

Процесс биосинтеза высших жирных кислот с участием синтазы высших жирных кислот включает ряд этапов.

*Первым этапом* в синтезе жирных кислот является образование малонил-SKoA из ацетил-SKoA и CO<sub>2</sub> (АТФ-зависимое карбоксилирование):

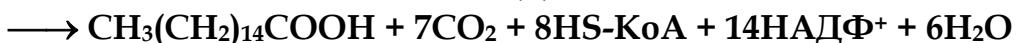


*Вторым этапом* в синтезе жирных кислот можно считать активацию ацетил-SKoA путем присоединения его к SH-группе АПБ. Подобным образом идет образование малонил-АПБ. Реакции катализируются ферментом траснацилазой.

*Третьим этапом* синтеза является собственно конденсация ацетил-АПБ и малонил-АПБ, в результате чего под действием конденсирующего фермента 3-кетоацилсинтетазы образуется 3-кетобутирил-АПБ (ацетоацетил-АПБ). Дальнейшие превращения наглядно представлены на рисунке 4.18.

Завершается первая стадия синтеза перемещением насыщенного ацильного радикала на свободную SH-группу цистеина, а новая молекула малонил-SKoA взаимодействие с HS-АПБ, цикл повторяется вновь еще шесть раз, и каждый новый остаток малоната, декарбоксилируясь, встраивается в углеродную цепь до тех пор, пока не образуется 16-углеродный пальмитоил-АПБ. Завершается синтез жирной кислоты гидролитическим отщеплением HS-АПБ под действием деацилазы, не входящей в состав синтазы жирной кислоты.

Суммарное уравнение реакции образования пальмитиновой кислоты при участии синтазы имеет следующий вид:



Синтез наиболее распространенных моноеновых жирных кислот (пальмитолеиновой и олеиновой) протекает в клетках печени непосредственно из их предшественников – пальмитиновой и стеариновой кислот. В этом процессе молекулярный кислород выступает в роль акцептора водорода жирной кислоты и НАДФН·H<sup>+</sup>. Реакция катализируется мультиферментным комплексом десатуразой.

### *Синтез триглицеридов (жиров).*

Исходными веществами при синтезе триглицеридов являются 1-фосфоглицерин и ацил-КоА. Синтез осуществляется посредством реакций трансацилирования. 1-Фосфоглицерин образуется при фосфорилировании глицерина или при восстановлении фосфодиоксиацетона. Ацил-SKoA возникает в процессе синтеза высших жирных кислот, а также путем активирования высших жирных кислот при β-окислении.

В начале синтеза жиров путем реакции трансацилирования в две стадии синтезируется фосфатидная кислота.

Суммарный процесс описывается на рисунке 4.19.

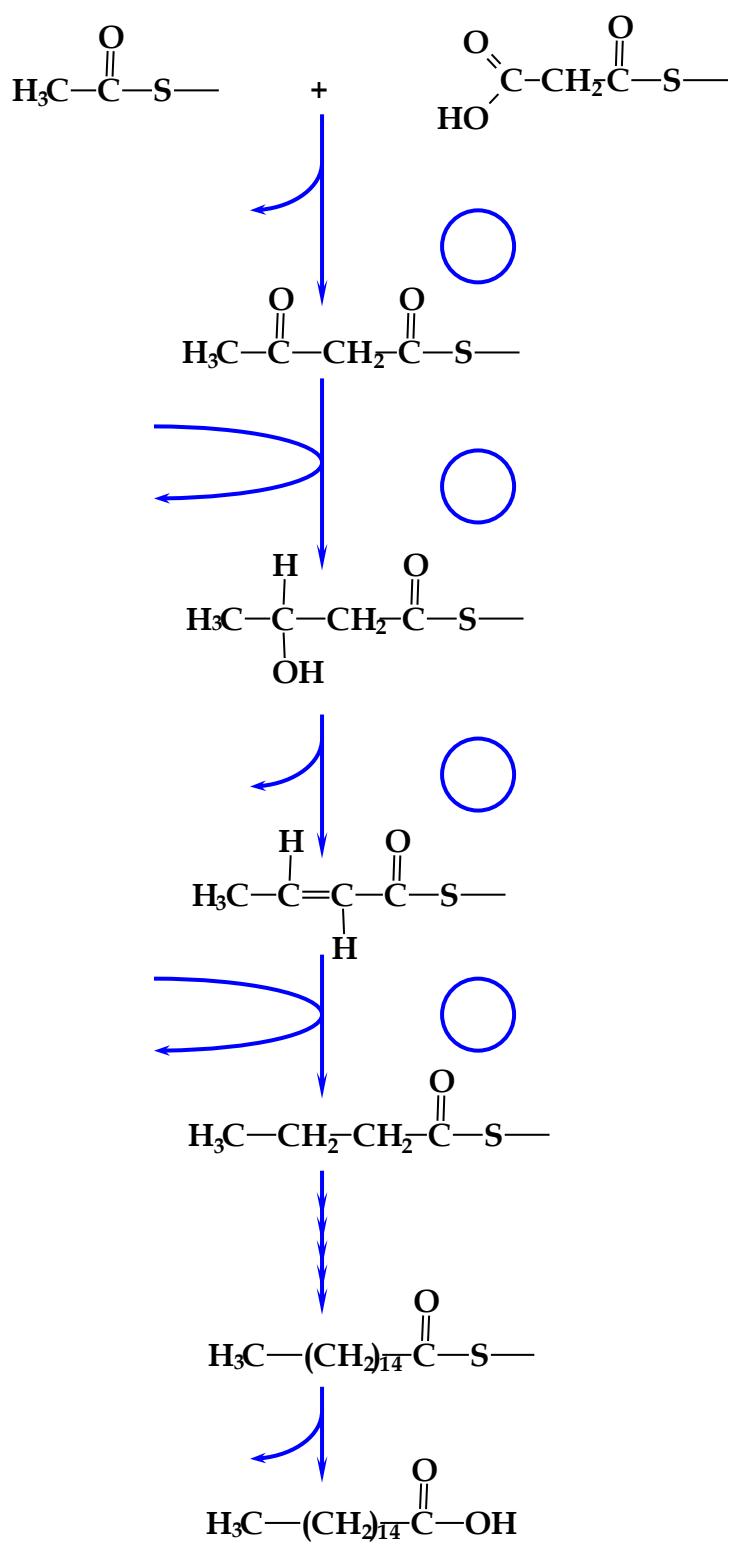


Рисунок 4.18 – основные этапы биосинтеза жирных кислот

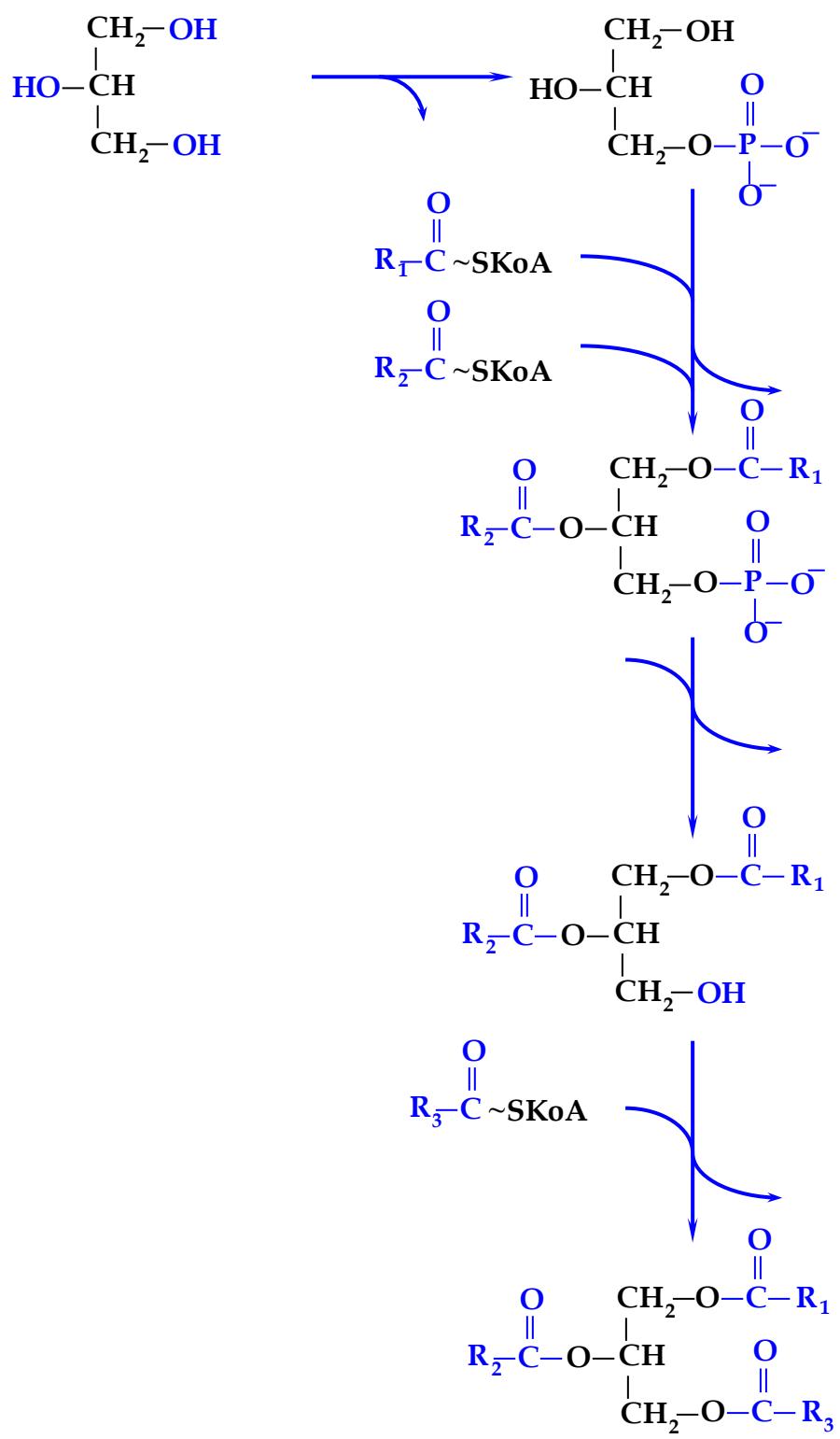


Рисунок 4.19 – Биосинтез триацилглицеролов

## 4.6. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЗМА ОТДЕЛЬНЫХ КЛАССОВ СОЕДИНЕНИЙ

Живой организм и его функционирование находятся в постоянной зависимости от окружающей среды. Интенсивность обмена с внешней средой и скорость внутриклеточных процессов обмена веществ поддерживают постоянство внутренней среды и целостность организма.

Обмен веществ в организме протекает не хаотично, он интегрирован и тонко настроен. Все превращения органических веществ, процессы анаболизма и катаболизма тесно связаны друг с другом. В частности, процессы синтеза и распада взаимосвязаны, координированы и регулируются нейрогормональными механизмами, придающими химическим процессам нужное направление. В организме, как и в живой природе, не существует самостоятельного обмена белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот. Все превращения объединены в целостный процесс метаболизма, подчиняющийся закономерностям взаимозависимости и взаимообусловленности, допускающий также взаимопревращения между отдельными классами органических веществ. Подобные взаимопревращения диктуются физиологическими потребностями, а также целесообразностью замены одних классов органических веществ другими в условиях блокирования какого-либо процесса при патологии.

Несмотря на огромное разнообразие пищевых веществ (белки, жиры, углеводы), число химических реакций, обеспечивающих их превращения (распад) и образование энергии, «удивительно мало». Эти закономерности свойственны как организму животных и человека, так и микроорганизмам и растениям.

В настоящее время экспериментально обосновано существование четырех главных этапов распада молекул углеводов, белков и жиров, которые интегрируют образование энергии из основных пищевых источников.

На I этапе полисахариды расщепляются до моносахаридов (обычно гексоз); жиры распадаются на глицерин и высшие жирные кислоты, а белки – на составляющие их свободные аминокислоты. Указанные процессы в основном являются гидролитическими, поэтому освобождающаяся в небольшом количестве энергия почти целиком используется организмами в качестве тепла.

На II этапе мономерные молекулы (гексозы, глицерин, жирные кислоты и аминокислоты) подвергаются дальнейшему распаду, в процессе которого образуются богатые энергией фосфатные соединения и ацетил-КоА. В частности, при гликолизе гексозы расщепляются до пировиноградной кислоты и далее до ацетил-КоА. Этот процесс сопровождается образованием ограниченного числа богатых энергией фосфатных связей путем субстратного фосфорилирования. На этом этапе высшие жирные кислоты аналогично распадаются до ацетил-КоА, в то время как глицерин окисляется по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты и далее до ацетил-КоА. Для аминокислот ситуация на II этапе несколько отлична. При пре-

имущественном использовании аминокислот в качестве источника энергии (при дефиците углеводов или при сахарном диабете) некоторые из них непосредственно превращаются в метаболиты лимоннокислого цикла (глутамат, аспартат), другие – опосредованно через глутамат (пролин, гистидин, аргинин), третьи – в пируват и далее в ацетил-КоА (аланин, серин, глицин, цистеин). Наконец, ряд аминокислот, в частности лейцин, изолейцин, расщепляется до ацетил-КоА, а из фенилаланина и тирозина, помимо ацетил-КоА, образуется оксалоацетат через фумаровую кислоту.

II этап можно назвать этапом образования ацетил-КоА, являющегося по существу единственным (общим) промежуточным продуктом катаболизма основных пищевых веществ в клетках.

На III этапе ацетил-КоА (и некоторые другие метаболиты, например ацетоглутарат, оксалоацетат) подвергаются окислению («сгоранию») в цикле ди- и трикарбоновых кислот Кребса. Окисление сопровождается образованием восстановленных форм НАДН $\cdot$ Н<sup>+</sup> и ФАДН<sub>2</sub>.

На IV этапе осуществляется перенос электронов от восстановленных нуклеотидов на кислород (через дыхательную цепь). Он сопровождается формированием конечного продукта – молекулы воды. Этот транспорт электронов сопряжен с синтезом АТФ в процессе окислительного фосфорилирования.

Помимо взаимных переходов между разными классами веществ в организме, доказано существование более сложных форм связи. В частности, интенсивность и направление любой химической реакции определяются ферментами, т.е. белками, которые оказывают непосредственное влияние на обмен липидов, углеводов и нукleinовых кислот. В свою очередь синтез любого белка-фермента требует участия ДНК и всех 3 типов рибонукleinовых кислот: тРНК, мРНК и рРНК. На рисунке 4.20 схематически изображена взаимосвязь обмена белков, углеводов и липидов, примеры взаимных переходов отдельных структурных элементов белков, жиров, углеводов и нукleinовых кислот в процессе их превращений и обмена.

Помимо прямых переходов метаболитов этих классов веществ друг в друга, существует тесная энергетическая связь, когда энергетические потребности могут обеспечиваться окислением какого-либо одного класса органических веществ при недостаточном поступлении с пищей других.

Перечисленными примерами абсолютно не исчерпывается все многообразие взаимопревращений органических веществ, которые постоянно совершаются в живых организмах. Здесь приведены лишь главные, магистральные каналы и пути превращения общих классов веществ и указаны ключевые субстраты и ферментные системы, обеспечивающие постоянство химических компонентов и тканей и динамичность живых структур.

Таким образом, скорость распада одних питательных веществ и биосинтеза других прежде всего определяется физиологическим состоянием и потребностями организма в энергии и метаболитах. Благодаря динамичности и координации метаболической активности обеспечивается макро- и микроскопическое постоянство всех форм живого. Выяснение фундамен-

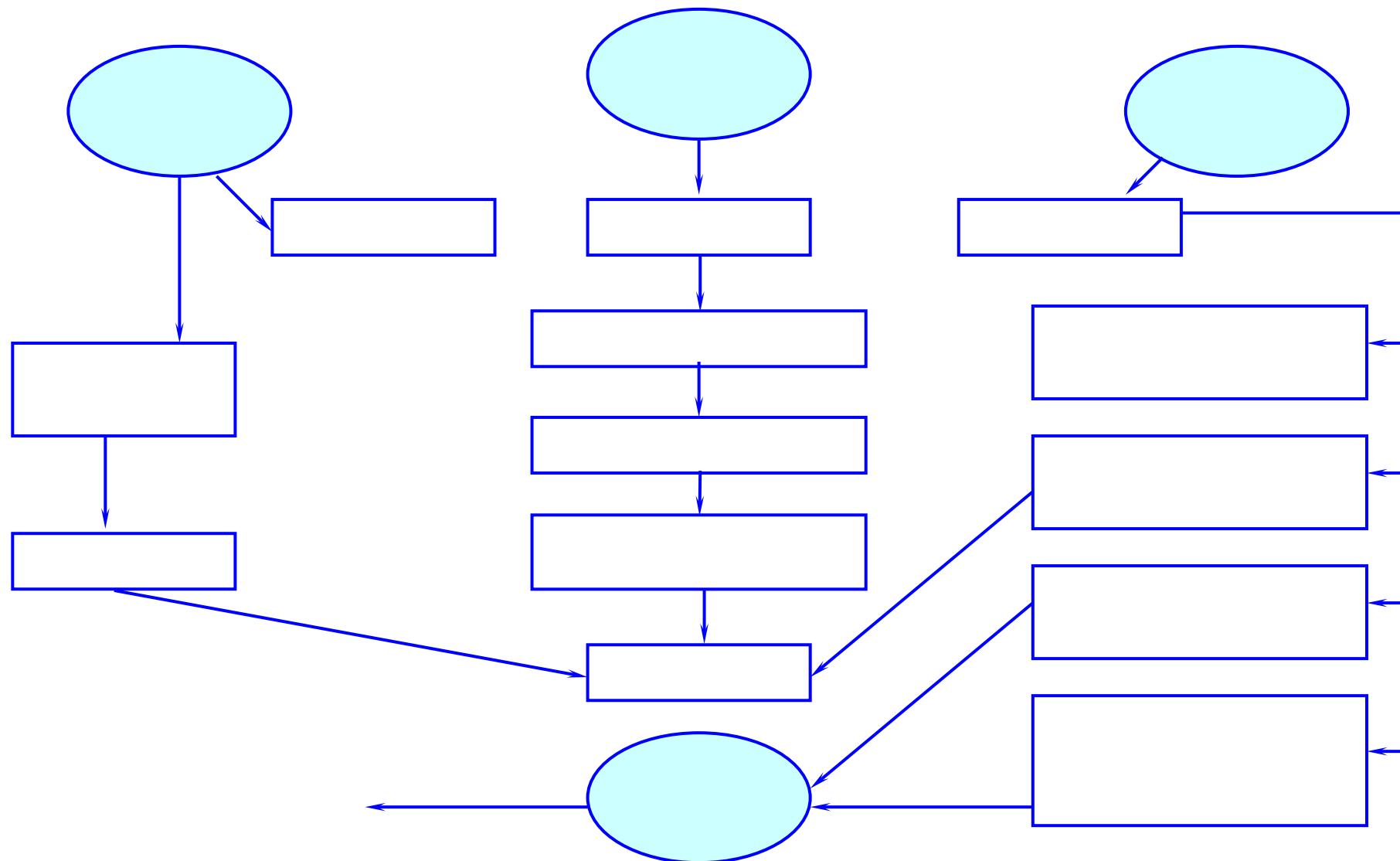


Рисунок 4.20. Схематическое изображение взаимосвязи обмена белков, углеводов и липидов

тальных проблем структуры и функций отдельных биомолекул может служить основой для раскрытия как молекулярных механизмов химических процессов, лежащих в основе состава и функций отдельных клеток и целостного организма, так и процессов, обеспечивающих биологическую индивидуальность живых организмов. Любые нарушения этого динамического статуса организма сопровождаются развитием патологии, тяжесть и продолжительность которой будут определяться степенью повреждения структуры и функций отдельных молекулярных и надмолекулярных компонентов клеток.

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Дайте определение понятиям метаболизм, катаболизм, анаболизм.
2. Что такое митохондрии? Дайте им краткую характеристику. Какова роль дыхательной цепи митохондрий в метаболизме клетки?
3. Опишите основные этапы расщепления белков. Какие ферменты принимают непосредственное участие в этом процессе?
4. Опишите основные типы превращений аминокислот.
5. Дайте характеристику основных путей анabolизма аминокислот.
6. Дайте определение процессам гидролиза и фосфоролиза углеводов. Какие ферменты принимают участие в этих процессах?
7. Что такое гликолиз? Дайте краткую характеристику этому процессу.
8. Дайте краткую характеристику циклу трикарбоновых кислот.
9. Дайте краткую характеристику пентозофосфатному пути окисления глюкозы.
10. Охарактеризуйте основные пути синтеза (анabolизма) углеводов.
11. Опишите основные этапы расщепления нуклеиновых кислот. Какие ферменты принимают участие в этом процессе?
12. Перечислите сходные черты механизма синтеза азотистых оснований (пуриновых и пиримидиновых).
13. Опишите основные этапы расщепления липидов. Какие ферменты принимают участие в этом процессе?
14. Дайте краткую характеристику процессу  $\beta$ -окисления жирных кислот. Опишите основные этапы  $\beta$ -окисления высших жирных кислот.
15. Опишите основные этапы процесса биосинтеза высших жирных кислот. Какие ферменты принимают участие в этом процессе?

## РАЗДЕЛ III. ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОХИМИИ

### ГЛАВА 5. БИОХИМИЯ В ТЕХНОЛОГИИ

#### 5.1. БРОЖЕНИЕ МОЛОЧНОГО САХАРА

В основе изготовления целого ряда продуктов лежат процессы глубокого распада сахаров под действием микроорганизмов, называемые брожением. Вместе с тем процессы брожения могут быть причиной порчи пищевых продуктов (излишняя кислотность, вспучивание творога, сметаны, сыра и т.д.). Существует несколько типов брожения, в частности молочного сахара – лактозы, различающихся составом конечных продуктов.

Начальным этапом почти всех типов брожения является расщепление олиго- и полисахаров до мономерных звеньев: молочного сахара – на глюкозу и галактозу под влиянием фермента лактазы  $\beta$ -галактозидазы; сахарозы – на глюкозу и фруктозу, под влиянием фермента сахаразы; малтозы – на два остатка глюкозы, под влиянием фермента малтазы и т.п.. Далее брожению подвергается глюкоза или фруктоза. Галактоза не сбраживается или ферментируется слабо, обычно при участии уридинифосфатглюкозы она переходит в глюкозо-1-фосфат, который после изомеризации в глюкозо-6-фосфат включается в схему превращения глюкозы:



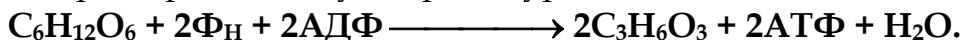
Некоторые микроорганизмы могут сбраживать непосредственно лактозу, переводя ее в фосфорные эфиры.

Все типы брожения до образования пировиноградной кислоты идут с получением одних и тех же промежуточных продуктов и по одному и тому же пути – пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Дальнейшие превращения пировиноградной кислоты могут идти в разных направлениях, которые будут определяться специфическими особенностями данного микроорганизма и условиями среды. Конечными продуктами брожения могут быть молочная, уксусная, пропионовая, масляная кислоты, спирт, ароматические вещества, диоксид углерода и другие соединения. Всем истинным процессам брожения свойственно общее правило: восстановленная на первой стадии форма НАД (за счет окисления 3-фосфоглицеринового альдегида) снова окисляется на второй стадии, передавая водород любому акцептору. Это может быть пировиноградная кислота, ацетилфосфат, ацетальдегид, диа-

цетил, ацетоин и т.д. Таким образом, наблюдается сопряжение стадий окисления и восстановления с точным соблюдением эквивалентности.

## Молочнокислое брожение

Молочнокислое брожение глюкозы является основным процессом при изготовлении заквасок, сыра и кисломолочных продуктов, а молочнокислые бактерии — наиболее важной группой микроорганизмов для молочной промышленности. Процесс молочнокислого брожения каждой гексозы молочного сахара выражается суммарным уравнением



Наряду с молочной кислотой могут образовываться и побочные продукты брожения.

Молочнокислые бактерии по характеру продуктов сбраживания глюкозы относят к *гомоферментативным* или *гетероферментативным*. Гомоферментативные бактерии, как показывает их название, образуют главным образом молочную кислоту (более 90%) и лишь незначительное количество побочных продуктов. Гетероферментативные бактерии около 50% глюкозы превращают в молочную кислоту, а остальное количество — в этанол, уксусную кислоту и CO<sub>2</sub>. Однако провести резкую границу между гомо- и гетероферментативными молочнокислыми бактериями по образующимся продуктам брожения иногда бывает трудно. Так, отмечены факты образования отдельными штаммами гомоферментативных молочнокислых бактерий от 8 до 30% побочных продуктов, а гетероферментативные бактерии под воздействием ряда факторов могут вести себя как гомоферментативные.

Более характерным признаком при делении молочнокислых бактерий на группы является путь сбраживания глюкозы. Гомоферментативные бактерии сбраживают глюкозу по гликолитическому пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, гетероферментативные — пентозофосфатным путем.

*Гомоферментативное молочнокислое брожение.* Механизм гомоферментативного молочнокислого брожения глюкозы к настоящему времени изучен подробно. Превращение глюкозы в пищевиноградную кислоту идет в результате последовательных реакций гликолиза (см. стр. 101). В заключительной реакции пищевиноградная кислота восстанавливается до молочной кислоты под действием фермента лактатдегидрогеназы. Роль восстановителя при этом играет НАДН·Н<sup>+</sup>, образовавшийся в реакции окисления 3-фосфоглицеринового альдегида (см. рис. 4.8).

Следовательно, при гомоферментативном молочнокислом брожении из 1 моля глюкозы образуются 2 моля молочной кислоты (с одновременным синтезом 2 моля АТФ).

При сбраживании глюкозы молочнокислыми бактериями могут образоваться два оптических изомера молочной кислоты: левовращающий D(-)-лактат и правовращающий L(+) лактат:



Изомеры отличаются расположением водородных атомов и гидроксильных групп у асимметрического атома углерода, отмеченного звездочкой, — первый лактат имеет группу OH справа и называется D-изомером (от лат. *dexter* — правый), второй имеет ее слева и поэтому назван L-изомером (от лат. *laevus* — левый).

L-лактат является промежуточным продуктом обмена веществ в человеческом организме и легко превращается в пищевиноградную кислоту, которая окисляется до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O в цикле трикарбоновых кислот или используется для синтеза гликогена. D-лактат, наоборот, очень медленно распадается в организме, а новорожденные его вовсе не утилизируют. Поэтому продукты для вскармливания грудных детей не должны содержать D-форму молочной кислоты или содержать ее мало. Следовательно, для приготовления детских кисломолочных смесей следует сочетать штаммы микроорганизмов, образующие L(+) или DL-молочную кислоту, например, бифидобактерии и ацидофильную палочку (а при производстве йогурта — термофильный стрептококк и болгарскую палочку).

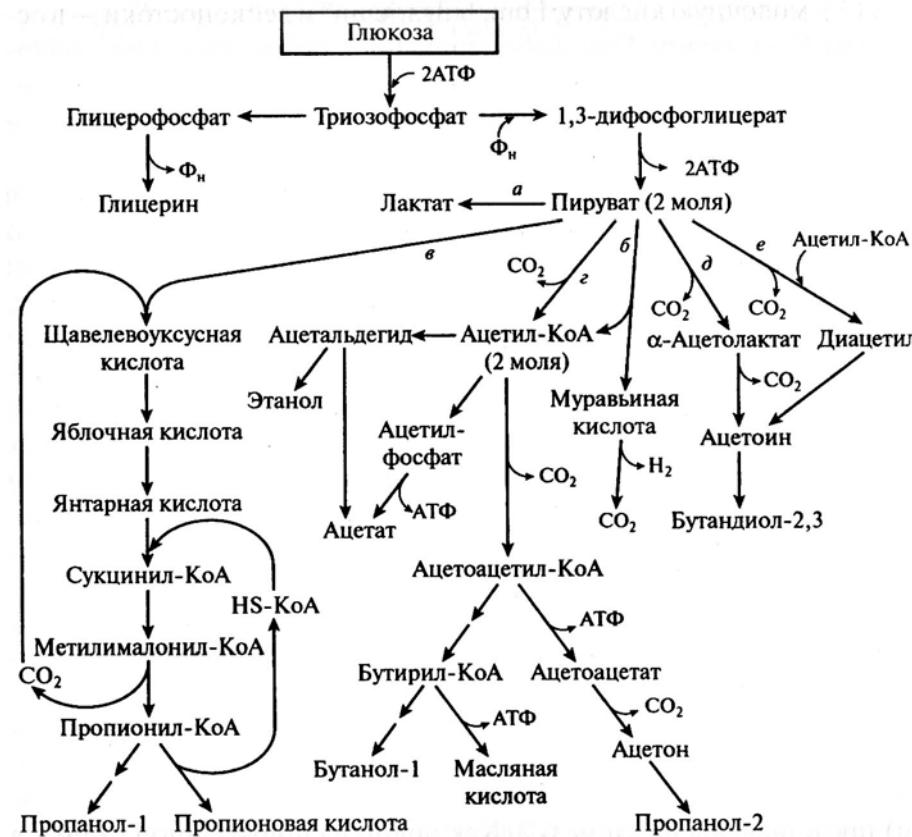
Молочная кислота может быть не единственным конечным продуктом гомоферментативного молочнокислого брожения. Ход брожения часто изменяется в зависимости от конкретных условий (наличия CO<sub>2</sub>, кислорода, pH, температуры среды и т.д.). Возможные метаболические пути превращения глюкозы гомоферментативными молочнокислыми бактериями (а также другими бактериями и дрожжами) представлены на рисунке 5.1. Как видно из приведенной схемы, в качестве побочных продуктов могут образовываться летучие и нелетучие органические кислоты, глицерин, ацетальдегид, спирты, ацетон, ацетоин, диацетил, диоксид углерода и др.

Например, некоторые виды молочнокислых бактерий сбраживают часть глюкозы в этиanol, уксусную и муравьиную кислоты (рисунок 5.1, путь б). Сначала глюкоза превращается в пищевиноградную кислоту, которая затем расщепляется на ацетил-КоА и муравьиную кислоту (последняя может распадаться на CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>). Далее половина молекул ацетил-КоА переходит в уксусную кислоту, другая половина — в этиanol.

Данный путь сбраживания глюкозы характерен для таких нетипичных молочнокислых бактерий, как кишечная палочка *E. coli*. Суммарная реакция брожения глюкозы этими бактериями имеет следующий вид:



Часть глюкозы может превращаться в янтарную, пропионовую, яблочную и другие органические кислоты (путь б'). Могут образовываться ацетон, изопропиловый и бутиловый спирты, а также масляная кислота (путь г').



**Рисунок 5.1 - Возможные варианты превращения глюкозы по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнasa (по Мецлеру, с изменениями)**

Возможно также превращение глюкозы в ароматические вещества: ацетоин, бутандиол-2,3-диацетил (пути *δ* и *e*). Однако эти вещества образуются из глюкозы лишь в небольших количествах. Более значительное их количество образуется при сбраживании лимонной кислоты.

*Гетероферментативное молочнокислое брожение.* Бактерии группы лейконостоков и гетероферментативные молочнокислые палочки не могут сбраживать глюкозу по гликолитическому пути, для ее расщепления они используют пентозофосфатный (фосфоглюконатный, или гексозомонофосфатный шунт) путь. Это объясняется отсутствием у них ключевого фермента альдолазы, необходимого для расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на две молекулы триозофосфата. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы представлен на рисунке 5.2.

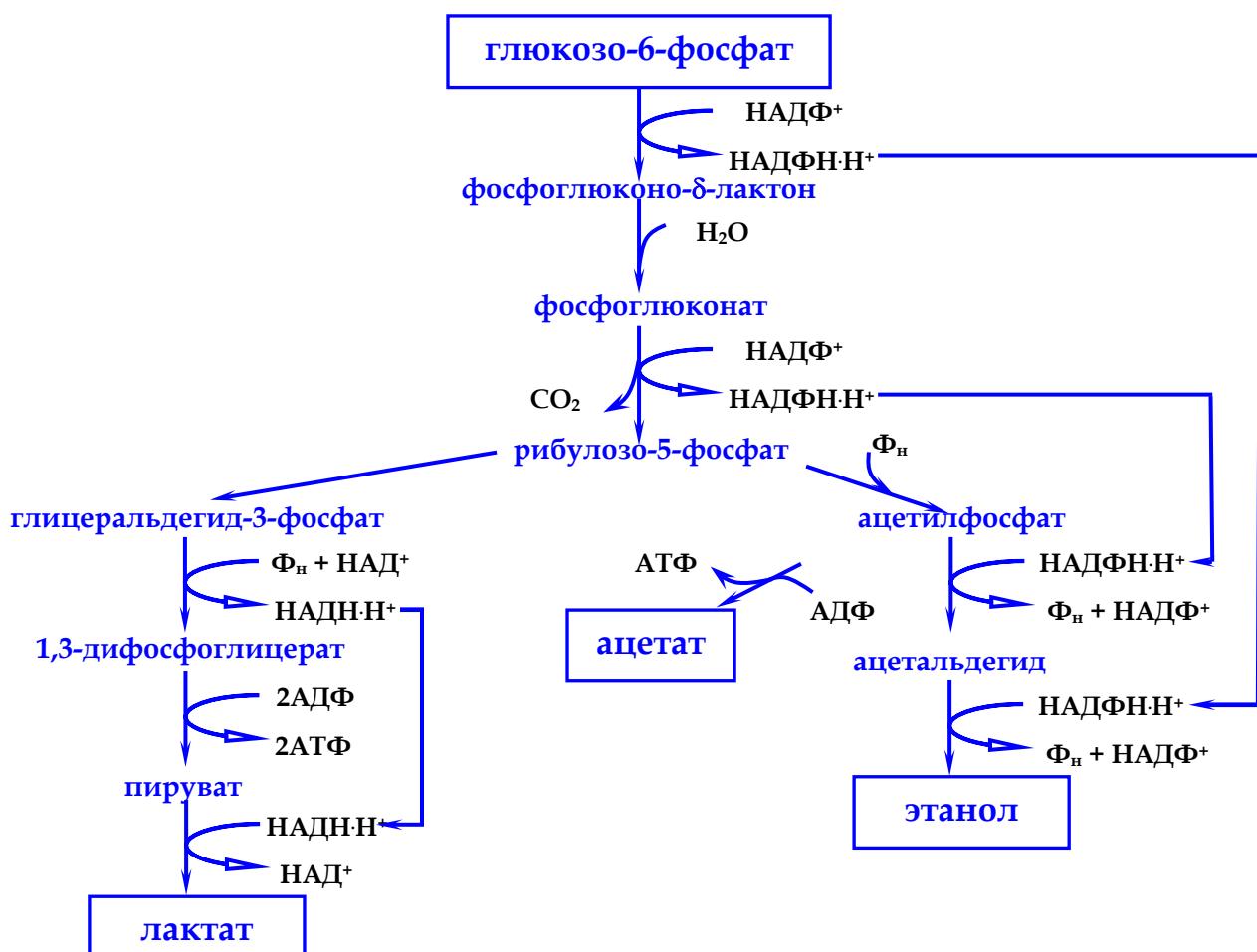


Рисунок 5.2 – Пентозофосфатный путь расщепления глюкозы гетероферментативными молочнокислыми бактериями

Сначала происходит дегидрирование глюкозо-6-фосфата, катализируемое дегидрогеназой (глюкозо-6-фосфат – дегидрогеназой), которая в качестве акцептора водорода использует НАДФ<sup>+</sup> или НАД<sup>+</sup>.

Затем 6-фосфоглюконовая кислота подвергается окислительному декарбоксилированию (при участии фермента 6-фосфоглюконат – дегидрогеназы) с образованием рибулозо-5-фосфата и восстановленной формы НАД или НАДФ. Рибулозо-5-фосфат под действием изомеразы да-

лее превращается в рибозо-5-фосфат. Образовавшийся пентозофосфат при участии фосфокетолазы расщепляется на 3-фосфоглицериновый альдегид и ацетилфосфат, которые соответственно превращаются в лактат и этанол.

В ходе реакций по пентозофосфатному пути из каждого моля глюкозы образуются моль молочной кислоты, моль этанола и  $\text{CO}_2$ :



Энергетический баланс брожения глюкозы, протекающего по этому пути, составляет одну молекулу АТФ. В аэробных условиях возможно образование двух молекул АТФ, тогда ацетил-фосфат превращается не в этанол, а в уксусную кислоту (см. рис. 5.2).

*Фруктозо-6-фосфатный путь расщепления глюкозы бифидобактериями.* Бифидобактерии в отличие от пентозофосфатного пути превращают глюкозу не в глюкозо-6-фосфат, а во фруктозо-6-фосфат, который далее расщепляется фосфокетолазой на эритрозо-4-фосфат и ацетилфосфат (рисунок 5.3). Затем эритрозо-4-фосфат и фруктозо-6-фосфат под действием ферментной системы перестройки Сахаров превращается в два моля пентозофосфата (ксилулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата). Далее пентозофосфат расщепляется на ацетил-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат, который переходит в пируват.

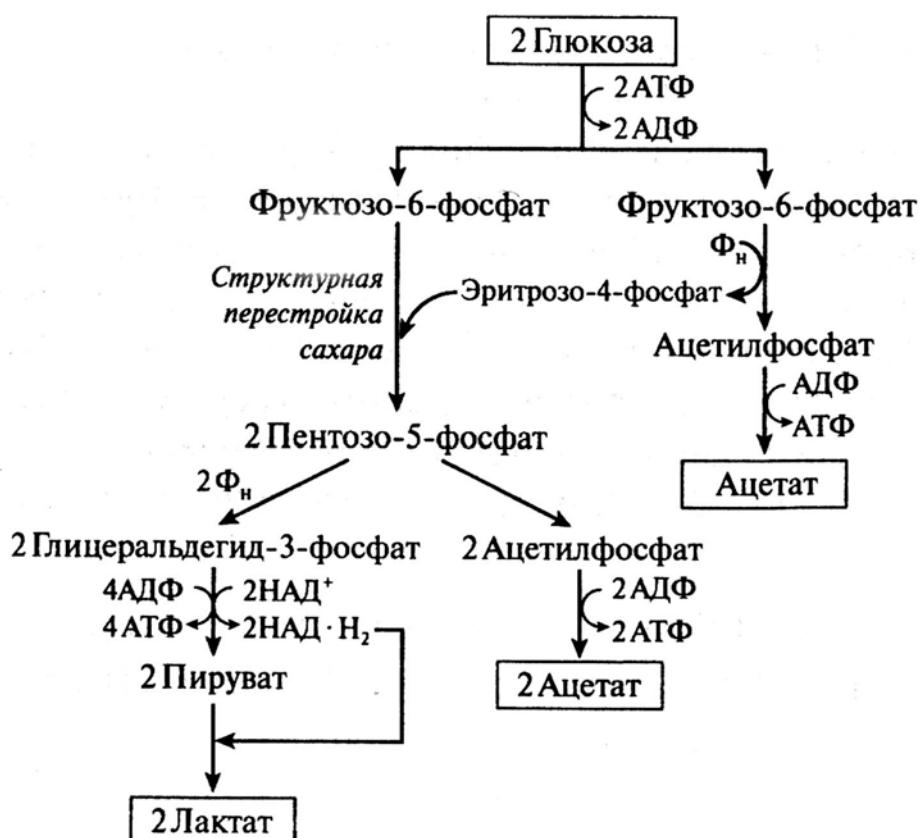


Рисунок 5.3 – Путь сбраживания глюкоза бифидобактериями

На последней стадии пируват восстанавливается до лактата (или расщепляется до ацетата и формиата). Таким образом, образование уксусной и молочной кислот происходит в молярном отношении 3:2. Выход АТФ со-

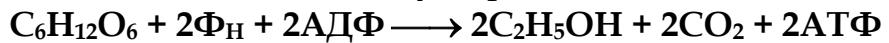
ставляет  $2^{1/2}$  моля на 1 моль глюкозы. Цитраты бифидобактерии не используют.

Бифидобактерии имеют низкую  $\beta$ -галактозидазную активность и плохо развиваются в молоке. Для стимуляции их роста целесообразно в закваски вводить культуры термофильного стрептококка обладающего повышенной  $\beta$ -галактозидазной активностью.

### Спиртовое и другие виды брожения глюкозы

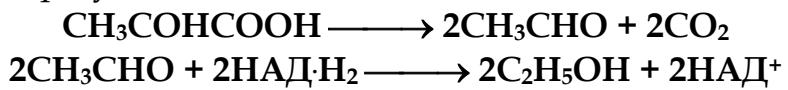
Спиртовое и пропионовокислое брожения наравне с молочнокислым брожением не менее важны при производстве некоторых кисломолочных напитков и твердых сыров. Вместе с тем маслянокислое брожение является причиной возникновения пороков (порчи) многих молочных продуктов и особенно сыров, вызывая получение неправильного рисунка и позднее всputчивание продукта.

*Спиртовое брожение.* Спиртовое брожение глюкозы имеет место при выработке кефира, кумыса, курунги и других кисломолочных продуктов. Возбудителями спиртового брожения являются дрожжи родов *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Fabospora*, *Torulopsis* и др. Они сбраживают глюкозу с образованием этанола и диоксида углерода:



Выход АТФ при спиртовом брожении составляет 2 моля на 1 моль глюкозы.

Превращение глюкозы в пировиноградную кислоту на первой стадии спиртового брожения идет по гликолитическому пути аналогично гомоферментативному молочнокислому брожению (см. схему 1). Однако вместо восстановления до молочной кислоты она подвергается декарбоксилированию под действием пируватдекарбоксилазы с образованием  $\text{CO}_2$  и уксусного альдегида. Уксусный альдегид далее вступает во взаимодействие с НАД- $\text{H}_2$ , образовавшимся ранее при окислении 3-фосфоглицеринового альдегида. В результате образуется этанол:



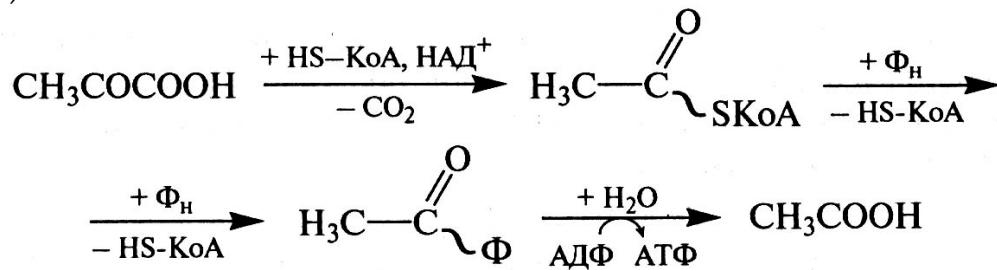
Кроме этанола и диоксида углерода дрожжи могут образовывать в небольшом количестве другие спирты (изобутиловый, пропиловый, глицерин и др.), уксусную, пропионовую, янтарную и молочную кислоты, а также ацетальдегид, ацетон и диацетил.

*Окисление спирта уксуснокислыми бактериями.* При совместном культивировании дрожжей и уксуснокислых бактерий, например, при использовании кефирных грибков происходит неполное окисление части накопившегося этанола до уксусной кислоты (с образованием более 5% кислоты):



*Пропионовокислое брожение.* Возбудителем брожения являются пропионовокислые бактерии рода *Propionibacterium*, которые превращают

глюкозу или молочную кислоту в пропионовую и уксусную кислоты с выделением диоксида углерода. Одновременно образуется небольшое количество янтарной кислоты, ацетоина и дикацетила. Если брожение начинается с глюкозы, то процесс до образования пировиноградной кислоты идет аналогично гомоферментативному молочнокислому брожению. Если же брожению подвергается молочная кислота, то путем дегидрирования (с помощью лактатдегидрогеназы) она также превращается в пировиноградную кислоту. В дальнейшем одна часть пировиноградной кислоты подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА, который через ацетилфосфат переходит в уксусную кислоту (в реакциях участвуют ферменты пируватдегидрогеназа, фосфотрансацетилаза и ацетаткиназа):



Другая часть пировиноградной кислоты путем карбоксилирования (при участии карбоксилтрансферазы, которая обратимо переносит карбоксильную группу от метилмалонил-КоА на пируват) превращается в щавелевоуксусную кислоту. Далее щавелевоуксусная кислота восстанавливается в яблочную, которая в свою очередь восстанавливается в янтарную кислоту. Янтарная кислота через сукцинил-КоА и метилмалонил-КоА превращается в пропионил-КоА, который расщепляется с образованием пропионовой кислоты (см. аналогичные этапы на рис.5.1, путь β):



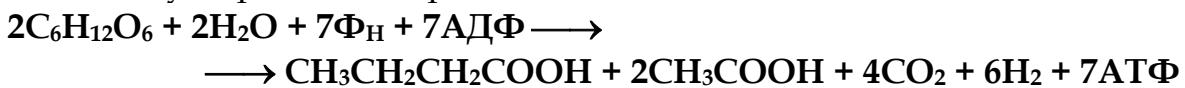
Суммарное уравнение пропионовокислого брожения глюкозы (если одна треть молекул глюкозы превращается в уксусную кислоту, а две трети – в пропионовую) имеет следующий вид:



Общий энергетический выход составляет  $2^{2/3}$  моля АТФ на 1 моль глюкозы.

Пропионовокислое брожение углеводов и молочной кислоты играет важную роль в процессе созревания твердых сыров с высокой температурой второго нагревания.

**Маслянокислое брожение.** Брожение происходит в молочных продуктах под действием маслянокислых бактерий, сбраживающих как глюкозу, так и молочную кислоту. Известно несколько типов маслянокислого брожения, различающихся образуемыми продуктами. Так, конечными продуктами одного из типов брожения являются масляная и уксусная кислота, диоксид углерода и водород:



Выход АТФ оказывается равным  $3^{1/2}$  моля на 1 моль глюкозы. До образования пировиноградной кислоты брожение идет по гликолитическому пути. Затем пировиноградная кислота декарбоксилируется до ацетил-КоА. Одна часть молекул ацетил-КоА переходит в ацетилфосфат и далее в уксусную кислоту (см. путь г на рис.5.1). Другая часть ацетил-КоА конденсируется в ацетоацетил-КоА, который через ряд реакций превращается в масляную кислоту, обладающую в больших концентрациях неприятным пропоркльм запахом.

При другом типе маслянокислого брожения наблюдается образование бутилового, изопропилового спиртов и ацетона (см. рис. 5.1, путь г).

Таким образом, в процессе маслянокислого брожения наряду с масляной кислотой образуется ряд побочных веществ, часто обладающим резким, неприятным запахом, а также большое количество газов. Маслянокислое брожение – нежелательный процесс в молочной промышленности; продукты жизнедеятельности маслянокислых бактерий являются причиной появления в кисломолочных продуктах неприятного вкуса, запаха и позднего вспучивания сыров.

## 5.2. БИОХИМИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Широта и разнообразие областей применения материалов на основе целлюлозы и ее производных связаны с возможностью направленного изменения их свойств прежде всего за счет использования химических реакций с участием функциональных групп и связей полимерной цепи.

Химические свойства целлюлозы определяются наличием гликозидных связей между элементарными звеньями (реакции деструкции) и гидроксильных групп (реакции окисления, этерификации - синтеза сложных эфиров и О-алкилирования - синтеза простых эфиров). Характерный пример реакции деструкции целлюлозы - реакция кислотного гидролиза, конечным продуктом которого является глюкоза. Именно эта реакция лежит в основе одного из промышленных методов получения этилового спирта (гидролиз целлюлозосодержащих отходов с последующим спиртовым брожением гидролизата). Наблюдаются две резко отличающиеся по скорости стадии гидролитической реакции: первая, на которой происходит гидролиз аморфных участков структуры, и вторая, со значительно более низкой скоростью, на которой реакция идет за счет расщепления гликозидных связей, находящихся на концах кристаллитов.

Фрагменты структуры, образующиеся по окончании первой стадии гидролиза, - микрокристаллическая целлюлоза - представляют собой иглоподобные частицы, длина которых зависит от типа исходной целлюлозы и обусловлена размером ее кристаллитов. Так, для хлопковой целлюлозы величина степени полимеризации этих фрагментов (так называемая предельная СП после гидролиза, Level-off-DP) равна 200-300, древесной - 120-280, целлюлозы вискозных волокон - 30-50.

Микрокристаллическую целлюлозу в виде белого сыпучего порошка применяют в качестве наполнителя при приготовлении таблеток лекарственных препаратов, добавок в формовочную массу в производстве керамических и фарфоровых изделий, для стабилизации водоэмульсионных красок. При диспергировании микрокристаллической целлюлозы в воде сначала образуется молокоподобная взвесь, постепенно приобретающая консистенцию крема. В таком виде микрокристаллическую целлюлозу используют в косметической и фармацевтической промышленности, в виде добавок в пищевые продукты (мороженое, соусы).

Реакции взаимодействия целлюлозы с различными окислителями ( $\text{NaClO}$ ,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{HIO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) приводят к образованию производных, содержащих карбонильные и карбоксильные группы. При этом наибольший интерес представляет действие соединений, обеспечивающих преимущественное окисление определенных гидроксильных групп элементарного звена. К таким окислителям относится иодная кислота (метапериодат натрия)  $\text{HIO}_4$ , при взаимодействии целлюлозы с которой происходит окисление вторичных гидроксильных групп элементарного звена до альдегидных, сопровождающееся разрывом связи между вторым и третьим атомами углерода элементарного звена.

К окислителям преимущественно избирательного действия относится также оксид азота (IV), под действием которого происходит окисление в основном первичных гидроксильных групп элементарного звена до карбоксильных, приводящее к образованию так называемой монокарбоксилцеллюлозы. Степень окисления целлюлозы оксидом азота (IV) зависит от природы окислителя. 15-20% общего количества окисленных гидроксильных групп приходится на долю вторичных OH-групп, окисляющихся до карбонильных. Параллельно протекает также, хотя и в незначительной степени, процесс образования нитрата целлюлозы (сложного эфира целлюлозы и азотной кислоты).

Невысокая устойчивость диальдегидцеллюлозы к действию щелочных реагентов и даже воды ограничивает области ее практического применения. Так, диальдегидцеллюзу используют в медицине в качестве полимерной матрицы для иммобилизации ферментов. Перспективным является применение в этой же области монокарбоксилцеллюлозы, являющейся эффективным гемостатическим материалом, обеспечивающим быстрое прекращение кровотечения из капиллярных сосудов. Важным свойством монокарбоксилцеллюлозы для применения в медицине является ее способность практически полностью рассасываться в тканях живого организма.

К важнейшим классам производных целлюлозы, широко применяемым в различных отраслях промышленности, относятся ее сложные и простые эфиры. Для получения сложных эфиров в качестве этерифицирующих реагентов используют сильные кислоты, ангидриды и хлорангидриды кислот. При синтезе простых эфиров целлюлозы в качестве О-алкилирующих реагентов могут выступать алкилгалогениды, диалкильсульфаты и соединения, содержащие напряженные гетероциклы или поляризованный двойную связь.

Свойства сложных и простых эфиров целлюлозы, во многом определяющие области их применения, зависят от большого числа факторов, из которых к числу основных следует отнести сравнительную реакционную способность гидроксильных групп и связанное с ней распределение заместителей между OH-группами элементарного звена, влияние структуры целлюлозы на степень замещения эфиров, характер распределения заместителей вдоль цепи, растворимость эфиров и другие их свойства.

Одной из важных характеристик эфиров целлюлозы, с которой связаны способы их переработки в изделия и области практического применения, является их растворимость. Именно путем переработки растворов ксантогената целлюлозы формуют вискозные волокна и пленку (целлофан), переработкой растворов ацетатов целлюлозы - ацетатные и триацетатные волокна и пленку для кино- и фотопромышленности. Переработка композиций на основе эфиров целлюлозы (ацетатов, ацетобутиратов и нитратов целлюлозы, этилцеллюлозы), содержащих небольшое количество высококипящих растворителей (пластификаторов), используется в технологии получения эфироцеллюлозных пластмасс (этролов). Водорастворимые простые эфиры целлюлозы (метил-, карбоксиметилцеллюлоза, а также

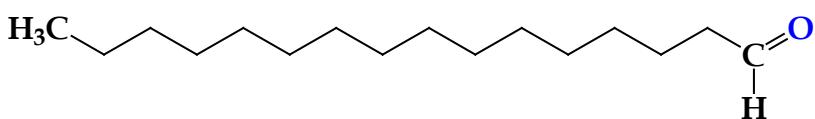
смешанные эфиры - метилгидроксиэтил-, метилгидроксипропилцеллюлоза) используются в качестве веществ, регулирующих вязкость водных растворов и дисперсий - буровых растворов в нефте- и газодобывающей промышленности, дисперсий красителей в текстильной промышленности, строительной индустрии, в медицине и пищевой промышленности - при приготовлении мазей, кремов, зубной пасты, мороженого, фруктовых соков, в промышленности синтетических моющих средств.

Зависимость растворимости некоторых эфиров целлюлозы, например ацетилфталилцеллюлозы, от кислотности (щелочности) растворителя используется в фармацевтической практике для создания покрытий для таблеток. Легкая растворимость этого эфира целлюлозы в ацетоне позволяет получить прозрачную достаточно прочную пленку, нерастворимую в кислой среде, но растворимую в водных растворах с  $\text{pH} > 7$ . Эта пленка обеспечивает сохранение активности неустойчивых в кислой среде (в желудочном соке) лекарств и хорошее всасывание их в кишечнике, где поддерживается щелочная среда.

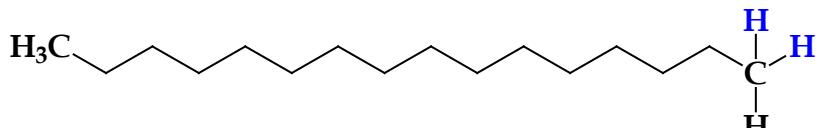
### 5.3. ИСКУССТВЕННЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ЖИРЫ

Очень давно человек обнаружил, что растительные и животные жиры обладают ценными свойствами и могут быть использованы не только как продукты питания.

Химики нашли вещества, которые оказались по своему строению очень похожими на жирные кислоты, выделяемые из природных жиров. Обнаружены они были среди продуктов, получаемых из нефти. Имеются в виду высокомолекулярные парафиновые углеводороды – вещества, входящие в состав известного всем парафина. Так, очень незначительно, например, отличие в строении пальмитиновой кислоты и парафинового углеводорода – гексадекана:



пальмитиновая кислота



гексадекан

Сравнение этих веществ показало, что для получения искусственных жирных кислот нужно к парафиновым углеводородам «прибавить» кислород, то есть окислить их. На этом и основано производство заменителей пищевых жиров. Жирные кислоты получаются из недефицитных продуктов переработки нефти.

Но если принцип синтеза жирных кислот очень прост, то сам процесс их получения достаточно сложен. Промышленный синтез жирных кислот представляет собою крупное современное производство. Оно состоит из трех этапов: окисления парафина и получения так называемой смеси сырых кислот, их «облагораживания» (очищения от примесей) и, наконец, разделения «облагороженной» смеси на отдельные фракции жирных кислот.

Окисление парафина производится в больших аппаратах – колоннах, заполненных расплавленным парафином, в массе которого находится катализатор. Снизу с помощью распыляющего устройства подают сильную струю воздуха, который проходит сквозь толщу парафина. В результате кислород соединяется с парафиновыми углеводородами и превращает их в жирные кислоты.

В составе парафина находится много различных углеводородов с числом атомов углерода от 18 до 36. Они вступают во взаимодействие с кислородом с разной скоростью; кроме того, при этом наблюдается множество побочных реакций. В результате наряду с жирными кислотами выделяется ряд менее ценных веществ. Поэтому после реакции окисления производят очистку жирных кислот от примесей. Окисленный парафин откачивают и промывают; при этом теплая вода уносит из него отработанный катализа-

тор и некоторые ненужные вещества. Чтобы отделить жирные кислоты от основной массы всех остальных веществ, не вступивших в реакцию, парафин подается в смеситель, где обрабатывается раствором соды. При этом жирные кислоты превращаются в мыльный раствор. Затем на втором этапе производства эту смесь подвергают тепловой обработке: она нагревается в печи под высоким давлением до 320 °C и подается в испаритель. Здесь вода и еще оставшиеся в составе кислот вредные примеси испаряются, уносятся вверх и попадают в холодильник, а «облагороженный» раствор стекает вниз. Он направляется в мешалку, где обрабатывается серной кислотой в присутствии сульфата натрия. Серная кислота, разрушая мыло, выделяет жирные кислоты в свободном состоянии, так сказать, возвращает им нормальный вид. Далее жирные кислоты промываются и сушатся. И, наконец, наступает третий, последний этап производства. Смесь жирных кислот проходит через вакуум-аппараты, при этом из нее выделяются отдельные, необходимые промышленности фракции жирных кислот. Процесс этот совершаются многократно. Подобным способом вырабатывается большое количество жирных кислот – до 920 килограммов из одной тонны парафина. Так в общих чертах осуществляется синтез жирных кислот.

Отходы, получаемые при «облагораживании» жирных кислот, не выбрасываются. В составе этих веществ находится углерод, водород и кислород – те элементы, из которых «строится» жирные кислоты. В дальнейшем они используются поэтому как сырье: смешиваются с новой порцией парафина и вместе с ним снова подвергаются окислению. Синтетические жирные кислоты почти лишены цвета, запаха и посторонних примесей. Они мало отличаются от кислот, выделенных из растительных и животных жиров.

В наши дни искусственные жирные кислоты все более заменяют природные жиры в разных отраслях промышленности. Они используются в производстве мыла вместо дефицитного кокосового масла, с помощью которого раньше изготавливались высокосортные туалетные сорта, а также вместо хлопкового масла и саломаса (гидрированный растительный жир), использовавшегося для производства бытового хозяйственного мыла.

Из синтетических жирных кислот приготовляются теперь различные смазочные материалы, которые вырабатывались прежде из растительных жиров. Синтетические кислоты успешно конкурируют с природными при изготовлении высококачественных олиф. Искусственные жиры – ценнейший материал в производстве резины: они заменяют необходимую для этого стеариновую кислоту, которую выделяют из дорогостоящего стеарина.

## 5.4 БИОХИМИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Одним из перспективных направлений, стоящих на стыке биохимии и современной биотехнологии является технология создания иммобилизованных ферментов. Ферменты, а даже целые ферментные системы, широко используются в различных отраслях промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т.д.

Ферменты как вещества белковой природы весь восприимчивы к действиям окружающей среды (температура, свет и т.п.), именно по этой причине они весьма неустойчивы при хранении. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от субстратов и продуктов реакций. Выход из данной ситуации был предложен в начале XX века когда Дж. Нельсон и Е. Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде свою катализическую активность. Принцип создания иммобилизованных ферментов заключается в прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранный систему.

Прикрепление (иммобилизация) ферментов к носителю осуществляется адсорбционно, химической связью или путем механического включения фермента в органический или неорганический гель (в капсулу и т. п.). При этом прикрепление молекулы фермента ведется за счет функциональных групп, не входящих в активный центр фермента и не участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса.

В качестве носителя иммобилизованного фермента могут выступать вещества органической и неорганической природы; зернистой или волокнистой структуры; пластинчатой, трубчатой, шарообразной (капсулярной) формы и т.д.

Необходимо отметить, что органические носители (низко- и высоко-молекулярные) могут быть как синтетического, так и природного происхождения. Синтетические полимерные носители подразделяют на группы в связи с химическим строением основной цепи макромолекул: полиметиленовые, полиамидные, полиефирные. Природные полимерные органические носители, получившие наибольшее распространение, делят в соответствии с их биохимической классификацией на 3 группы: полисахаридные, белковые и липидные.

Наиболее часто для иммобилизации используются такие полисахариды, как целлюлоза, декстран, агароза и их производные. Целлюлоза гидрофильтра, имеет много гидроксильных групп, что позволяет модифицировать её, замещая эти группы (см. п. 5.3). Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза, в результате которого разрушаются аморфные участки. На их место для сохранения пористости между кристаллическими участками вводят химические сшивки. Гранулированную целлюлозу легко превратить в различные ионообменные производные, такие как ДЭАЭ-целлюлоза, КМЦ и др.

Широкое распространение получили природные носители на основе декстрана, имеющие общее «сефадексы». При высыпывании они легко сжимаются, в водных же растворах способны к сильному набуханию. Пористость образуемых сефадексами гелей может регулироваться степенью полимеризации углевода, а также характером и числом сшивок (чаще всего «сшивка» осуществляется формальдегидом). Подобные водорастворимые препараты часто используются как носители лекарственных средств в медицине и фармакологии.

Белки в качестве носителей обладают рядом достоинств: вместительны, способны к биодеградации, могут применяться в качестве тонкой (толщиной 80 мкм) мембранны. Иммобилизацию ферментов на белковых носителях проводят как в отсутствии, так и в присутствии сшивящих агентов. Белки используются и в фундаментальных биологических исследованиях, и в медицине. К недостаткам белков в качестве носителей относят их высокую иммуногенность (за исключением коллагена и фиброна). Наиболее для иммобилизации используются структурные (кератин, фибрин, коллаген), двигательные (миозин) и транспортные (альбумин) белки.

Синтетические полимерные носители применяются для ковалентной и сорбционной иммобилизации ферментов, для получения гелей, микрокапсул. Они могут иметь макропористую, изопористую структуру, а также гетеропористую структуру. Для получения полимерных гидрофильных носителей широко используется акриламид - производное акриловой кислоты.

Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками:

- иммобилизованный фермент может быть легко отделен от реакционной среды, что позволяет приостановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, или получать чистый от фермента продукт;
- реакцию можно проводить непрерывно, регулируя ее скорость, а также выход продукта;
- возможно изменение ряда свойств иммобилизованного фермента (специфичность, зависимость активности фермента от значений pH среды, ионного состава, действия денатурирующих агентов);
- возможна регуляция активности иммобилизованных ферментов путем изменения свойств самого носителя.

## **Методы иммобилизации ферментов**

Существует два основных метода иммобилизации ферментов: физический и химический.

Физическая иммобилизация ферментов представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема. При физической иммобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями. Существует четыре типа связывания ферментов:

- адсорбция на нерастворимых носителях;
- включение в поры геля;
- пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембранны);
- включение в двухфазную среду, где фермент растворим и может находиться только в одной из фаз.

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из существующих способов иммобилизации ферментов. Этот способ достаточно прост и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем. После отмычки неадсорбировавшегося белка иммобилизованный фермент готов к использованию. Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий между носителем и поверхностными группами белка. Вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы носителя и функциональных групп на поверхности молекулы фермента

Преимуществами метода адсорбционной иммобилизации является его простота, доступность и дешевизна сорбентов, выступающих в качестве носителей. Им также можно придать любую конфигурацию и обеспечить требуемую пористость. При адсорбционном связывании можно решить и проблему очистки фермента, так как связывание белка с носителем во многих случаях достаточно специфическое. К недостаткам адсорбционной иммобилизации следует отнести низкую прочность связывания фермента с носителем, отсутствие общих рекомендаций, позволяющих сделать правильный выбор носителя и оптимальных условий иммобилизации конкретного фермента.

Некоторых из перечисленных затруднений можно избежать при иммобилизации ферментов путем включения в гели. Суть этого метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т.е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой обычно приходится значительная часть всего объема геля. Например, широко применяемые гели полимеров акриловой кислоты в зависимости от концентрации полимера и его природы содержат от 50 до 90% воды.

Для иммобилизации ферментов в геле существует два основных способа. При одном из них фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента. В реакционную смесь

часто добавляют также бифункциональные (содержащие в молекуле две двойные связи) спивающие агенты, которые придают образующемуся полимеру структуру трехмерной сетки. В другом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в гелеобразное состояние. Способ иммобилизации ферментов путем включения в полимерный гель позволяет создавать препараты любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя. Метод универсален, применим для иммобилизации практически любых ферментов, полиферментных систем, клеточных фрагментов и клеток. Фермент, включенный в гель, стабилен, надежно защищен от инактивации вследствие бактериального заражения, так как крупные клетки бактерий не могут проникнуть в мелкопористую полимерную матрицу. В то же время, эта матрица может создавать значительные препятствия для диффузии субстрата к ферменту, снижая катализическую эффективность иммобилизованного препарата, поэтому для высокомолекулярных субстратов данный метод иммобилизации не применим вообще.

Общий принцип иммобилизации ферментов с использованием мембран заключается в том, что водный раствор ферmenta отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой перегородкой. Полупроницаемая мембрана легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но непреодолима для крупных молекул ферmenta. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембранны и ее природой. Водный раствор ферmenta можно включать внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (микрокапсулирование). При двойном эмульгировании получается водная эмульсия из капель органического раствора полимера, содержащих, в свою очередь, еще более мелкие капли водного раствора ферmenta. Через некоторое время растворитель затвердевает, образуя сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них ферmentом. Если вместо водонерастворимого отвердевающего полимера используются жидкие углеводороды с высокой молекулярной массой, метод называется иммобилизацией путем включения в жидкие мембранны. К модификациям метода иммобилизации ферментов с использованием полу-проницаемых оболочек относятся также включение в волокна (при этом вместо капель, содержащих ферменты, получаются нити) и включение в липосомы. Применение систем мембранныго типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием ферmenta. Метод, как и предыдущий, достаточно универсален, т.е. применим как ферментам, так и к клеткам, а также их фрагментам. Благодаря высокому отношению поверхности к объему и малой толщине мембранны удаётся избежать значительных диффузионных ограничений скорости ферментативных реакций. Основной недостаток мембранных систем - невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

При иммобилизации ферментов с использование систем двухфазного типа ограничение свободы перемещения фермента в объеме системы достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Субстрат и продукт ферментативного превращения распределяются между обеими фазами в соответствии с их растворимостями в этих фазах. Природа фаз подбирается таким образом, что продукт накапливается в той из них, где фермент отсутствует. После завершения реакции эту фазу отделяют и извлекают из нее продукт, а фазу, содержащую фермент, вновь используют для проведения очередного процесса. Одним из важнейших преимуществ систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

Главным отличительным признаком химических методов иммобилизации является то, что путем химического взаимодействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между белком и носителем. Препараты иммобилизованных ферментов, полученные с применением химических методов, обладают по крайней мере двумя важными достоинствами. Во-первых, ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает высокую прочность образующегося коньюгата. При широком варьировании таких условий, как pH и температура, фермент не десорбируется с носителя и не загрязняет целевых продуктов катализируемой им реакции. Это особенно важно при реализации процессов медицинского и пищевого назначения, а также для обеспечения устойчивых, воспроизводимых результатов в аналитических системах. Во-вторых, химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность. Химическая иммобилизация ферментов является искусством, уровень которого определяется, в первую очередь, умением экспериментатора. Основная задача экспериментатора заключается в формировании новых ковалентных связей в молекуле фермента при использовании его функциональных групп, несущественных для проявления его каталитической активности. При химической модификации фермента его активный центр желательно защищать. При сопоставлении различных приемов иммобилизации химические методы для крупномасштабных биотехнологических процессов кажутся малопривлекательными из-за сложности и дороговизны. В промышленных процессах обычно используются те или иные методы физической иммобилизации.

### **Применение иммобилизованных ферментов**

Особенно ощутимый вклад иммобилизованные ферменты внесли в тонкий органический синтез, в анализ, в медицину, в процессы конверсии энергии, в пищевую и фармацевтическую промышленности.

Для синтетической органической химии важно то, что в двухфазных реакционных средах фермент сохраняет катализическую активность даже при исключительно малом содержании воды, поэтому равновесие катализируемой реакции (выход продукта) экспериментатор может регулировать в широких пределах, подбирая нужный органический растворитель. Иммобилизованные ферменты дали толчок к созданию принципиально новых методов "безреагентного" непрерывного анализа многокомпонентных систем органических (в ряде случаев и неорганических) соединений.

В будущем важную роль в контроле окружающей среды и в клинической диагностике должны сыграть такие методы, как биолюминесцентный анализ и иммуноферментный анализ.

В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью. Иммобилизационные подходы способствуют решению проблемы направленного транспорта лекарств в организме.

Проблемы биоконверсии массы и энергии в настоящее время пытаются решить микробиологическим путем. Тем не менее иммобилизованные ферменты вносят ощутимый вклад в осуществление фотолиза воды и в биоэлектрокатализ.

Заслуживает внимание и использование иммобилизованных ферментов в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья.

Иммобилизованные ферменты могут использоваться и как усилители слабых сигналов. На активный центр иммобилизованного фермента можно подействовать через носитель, подвергая последний ультразвуковой обработке, механическим нагрузкам или фотохимическим превращениям. Это позволяет регулировать катализическую активность системы фермент - носитель под действием механических, ультразвуковых и световых сигналов. На этой основе были созданы механо- и звукочувствительные датчики и открыт путь к бессеребряной фотографии.

Промышленные процессы с применением иммобилизованных ферментов внедрены прежде всего в пищевую и фармацевтическую промышленность. В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L-аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др.

В медицине иммобилизованные ферменты используются также как лекарственные препараты, особенно в тех случаях, когда необходимо локальное воздействие. Кроме того, биокатализаторы широко используются в различных аппаратах для перфузационной очистки различных биологических жидкостей. Возможности и перспективы использования в медицине ферментов в иммобилизованном состоянии гораздо шире, чем достигнутые на сегодняшний день, именно на этом пути медицину ждет создание новых высокоэффективных методов лечения.



## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Белясова Н.А. Биохимия и молекулярная биология: Учеб. пособие. - Мн.: Книжный дом, 2004. - 416 с.
- 2 Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2002. - 704 с.
- 3 Биологическая химия: учеб. Пособие для студ. Высш. Учеб. заведений /Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Снавастьянова и др.; Под ред. Н.И. Ковалевской. - М.: Издательский центр «Академия», 2005. - 256 с.
- 4 Биохимия: Практикум /Н.Е. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, А.Н. Васильев и др. - Киев: Высшая школа, 1988. - 125с.
- 5 Биохимия: Сборник задач и упражнений/Н.Е. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, А.Н. Васильев и др. - Киев: Высшая школа, 1988. - 104с.
- 6 Вавилова Т.П., Евстафьева О.Л. Биохимия в вопросах и ответах: Учеб. пособие для студентов мед. вузов. - М.: ВЕДИ, 2005. - 128 с.
- 7 Кнопре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. - 3-е изд., испр. - М.: Высш. шк., 2000. - 470 с.
- 8 Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. - М.: Мир, 2000. - 469 с.
- 9 Комов В.П. Биохимия: уче. для вузов/ В.П. Комов, В.Н. Шведова. - М.: Дрофа, 2004. - 638 с.
- 10 Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Оптические методы анализа. - Воронеж: Изд-во ВГУ, 1989. - 228 с.
- 11 Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Титриметрические методы анализа. - Воронеж: Изд-во ВГУ, 1986. - 244 с.
- 12 Лабораторный практикум по биотехнологии. Ч.1 / В.В. Ревин, Д.А. Кадималиев, А.А. Московскин и др. - Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2000. - 292 с.
- 13 Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1985.
- 14 Мецлер Д. Биохимия / перев. с англ. А.Е. Браунштейн, Л.М. Гинодман, Е.С. Северин. В 3-х т. - М.: Мир, 1980.
- 15 Основы биохимии: учеб. для студ. биол. спец. ун-тов/А.А. Анисимов, А.Н. Леонтьева, И.Ф. Александрова и др.; под ред. А.А. Анисимова. - М.: 1986. - 551 с.
- 16 Основы биохимии: учеб. пособие: в 2 ч. Ч.1/ Л.Я. Лабзина, Э.В. Романова, Э.П. Санаева, Е.Н. Бубнова. - Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2004. - 228 с.
- 17 Плакунов В.К. Основы энзимологии. - М.: Колос, 2002. - 128 с.
- 18 Страйер Л. Биохимия: В 3-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1985.
- 19 Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. - М.: Высшая школа, 1982. - 318 с.
- 20 Роговин З.А. Химия целлюлозы. М.: Химия, 1972.
- 21 Роговин З.А., Гальбрайх Л.С. Химические превращения и модификация целлюлозы. М.: Химия, 1979.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

---

- Авитаминоз – 70  
Аденилатная система – 95  
Аденилатциклаза - 67  
Активаторы – 34  
Активный центр - 24  
Аллостерический центр – 24  
Альдозы – 37  
Амилоза – 43  
Амилопектин - 43  
Аминирование – 97  
Аминокислота - 9  
Анаболизм – 86  
Антивитамины – 71  
Антикодон - 52  
Апофермент - 24  
Ассимиляция – см. анаболизм  
Ацилглицеролы – 57  
Ацилпереносящий белок – 122  
Белок – 13  
Брожение – 104  
Витамины –  
Воска – 58  
Восстанавливающие сахара – 41  
Гексозы – 37  
Ген-оператор – 83  
Ген-регулятор - 83  
Генетический код - 78  
Гетерополисахарид – 44  
Гиалуроновая кислота – 44  
Гидролиз – 100  
Гипервитаминоз – 70  
Гиповитаминоз – 70  
Гистон – 19, 46, 51, 85  
Гликоген – 44  
Гликогенолиз – 104  
Гликолиз – 89, 100, 107  
Гликолипиды – 64  
Гомополисахарид – 43  
Гормон – 63  
Гуанилатциклаза - 67  
Дегидрирование – 118  
Дезаминирование – 95  
Дезоксирибонуклеазы – 112  
Декарбоксилирование – 95, 104  
Денатурация – 21  
Дисахарид – 36  
Диссимилляция – см. катаболизм  
ДНК – 46, 48  
Домен - 17  
Дыхательная цепь митохондрий – 89, 91  
Жирные кислоты - 54  
Изоионная точка - 22  
Изоферменты – 25  
Изоэлектрическая точка – 15, 21  
Изоэнзимы – см. изоферменты  
Ингибиторы – 34  
Индуктор – 84  
Инициация – 74, 76, 79  
Интроны – 77  
Катаболизм – 86  
Катализ – 24  
Катализатор - 28  
Кератосульфат – 45  
Кетозы – 27  
Кетоновые тела – 122  
Кодон – 52, 77  
Комплементарность - 49  
Константа Михаэлиса – 32, 34  
Кофактор – 23  
Кофермент – 24  
Коэнзим – см. кофермент  
Коэффициент окислительного фосфорилирования - 93  
Крахмал – 43  
Кэпирование - 76  
Липид – 54  
Макроэлементы - 6  
Макроэрги - 87  
Мальтоза – 41  
Метаболизм – см. обмен веществ  
Металлоферменты - 35  
Микроэлементы - 6  
Митохондрия – 89  
Моносахарид – 36  
Мультифермент - 25  
Мутаротация - 41  
Невосстанавливающие сахара – 41  
Нейтральные липиды – см. ацилглицеролы  
Нуклеазы - 112

- Нуклеиновые кислоты – 46, 74  
 Нуклеозиды – 47  
 Нуклеотиды – 46, 47  
 Обмен веществ – 86  
 $\beta$ -Окисление – 117, 119  
 Окислительное фосфорилирование – 88  
 Олигомер - 19  
 Олигосахарид – 41  
 Пентоза – 37  
 Пентозофосфатный путь – 100, 107  
 Пептид - 12  
 Пептидная связь - 15  
 Переаминирование – 95  
 Пираноза - 37  
 Полипептид – см. белок  
 Полисахариды – 42  
 Полисома – 74  
 Промотор - 84  
 Простетическая группа – 24  
 Протеин – см. белок  
 Протеолиз - 35  
 Процессинг – 77  
 Регуляция -35, 64, 83  
 Рекогниция – 79  
 Ренатурация – 21  
 Репликация – 74  
 Репрессор - 84  
 Рибозимы – 81  
 Рибонуклеаза – 112  
 Рибосома – 53, 80  
 РНК – 46, 51  
 Сахароза – 42  
 Свободная энергия - 87  
 Свободное окисление - 88  
 Сопряженное окисление – 88  
 Специфичность – 29  
 $\alpha$ -Спираль белка – 16  
 Сплайсинг – 77  
 Стероиды – 61  
 Стоп-кодоны – 78, 81  
 $\beta$ -Структура белка – 17  
 Субстратное фосфорилирование – 88  
 Субъединица – 19, 80  
 Терминация – 74, 76, 81  
 Термолабильность ферментов – 29  
 Тиолиз - 118  
 Транскрипция - 76  
 Транслокация - 81  
 Трансляция – 79  
 Триплет – 78  
 Углевод – 36  
 Фермент - 23  
 Фолдинг – 83  
 Фосфолипид – 58  
 Фосфорилирование – 87  
 Фосфоролиз – 99  
 Фрагменты Оказаки – 74  
 Фураноза – 37  
 Хеликаза - 74  
 Хиральный центр – 12, 37  
 Холофермент – 24  
 Холоэнзим – см. холофермент  
 Хондроитинсульфат - 45  
 Целлюлоза - 43  
 Цикл Кребса - 105  
 Цепь переноса электронов – 91  
 Цитратный цикл – см. цикл Кребса  
 Цикл трикарбоновых кислот – см. цикл Кребса  
 Шапероны - 83  
 Экзоны - 77  
 Экзонуклеазы – 112  
 Экзопептидазы - 94  
 Элонгация – 74, 76, 80  
 Эндонуклеазы – 112  
 Эндопептидазы – 94  
 Энергия активации - 31  
 Энзим – см. фермент  
 Энзимология - 23