**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Казахский национальный университет им. аль Фараби**

**ОСНОВЫ БИОЭНЕРГЕТИКИ**

**(Учебное пособие)**

**Алматы, 2016 г.**

**Содержание**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Предисловие…………………………………………………………………. | | | 3 |
| 1. | Цели и задачи изучения дисциплины ……………………………….. | | 4 |
| 2. | Элементный состав живой природы и термодинамические  принципы биоэнергетики…………………………………………….. | | 5 |
| Контрольные вопросы………………………………………………………. | | | 12 |
| 3. | Важнейшие биоорганические соединения живой природы………... | | 13 |
|  | 3.1. | Аминокислоты, белки, ферменты…………………………….. | 13 |
|  | 3.2. | Коферменты……………………………………………………. | 19 |
|  | 3.3. | Структура НАД и НАД(Ф)-зависимых ферментов…………. | 26 |
|  | 3.4. | Флавопротеины………………………………………………... | 33 |
|  | 3.5. | Углеводы……………………………………………………….. | 35 |
|  | 3.6. | Липиды…………………………………………………………. | 38 |
|  | 3.7. | Надмолекулярные комплексы………………………………… | 40 |
|  | 3.8. | Структура клеток………………………………………………. | 44 |
| Контрольные вопросы………………………………………………………. | | | 47 |
| 4. | Основные процессы биоэнергетики…………………………………. | | 48 |
|  | 4.1. | Фотосинтез……………………………………………………… | 48 |
|  | 4.2. | Катаболизм и анаболизм………………………………………. | 50 |
|  | 4.3. | Три основных закона биоэнергетики Скулачева…………….. | 53 |
|  | 4.4. | Макроэргические соединения………………………………… | 54 |
|  | 4.5. | Субстратное фосфорилирование……………………………… | 55 |
|  | 4.6. | Дыхательная цепь……………………………………………… | 56 |
|  | 4.7. | Цепь переноса электронов и компоненты дыхательной цепи. | 58 |
|  | 4.8. | Структурная организация дыхательной цепи………………... | 58 |
|  | 4.9. | Переносчики электронов………………………………………. | 60 |
|  | 4.10. | Электроферментативные процессы в биологических мембранах………………………………………………………. | 61 |
|  | 4.11. | Термогенез……………………………………………………… | 73 |
| Контрольные вопросы……………………………………………………….. | | | 76 |
| 5. | Иммобилизация ферментов…………………………………………... | | 76 |
|  | 5.1 | Сорбционные методы иммобилизации ферментов………….. | 79 |
|  | 5.2. | Ковалентные методы иммобилизации ферментов…………... | 84 |
| Контрольные вопросы………………………………………………………. | | | 89 |
| 6. | Использование принципов биоэнергетики в электроферментативных процессах………………………………….. | | 90 |
|  | 6.1. | Регенерация коферментов в природе и технике……………... | 90 |
|  | 6.2. | Биологические топливные элементы и электроферментативные реакторы……………………………. | 91 |
|  | 6.3. | Электроферментатинные методы анализа……………………. | 102 |
| Контрольные вопросы……………………………………………………….. | | | 108 |
| Тесты к учебному пособию…………………………………………………. | | | 108 |
| Список литературы…………………………………………………………... | | | 121 |

**ПРЕДИСЛОВИЕ**

В основе жизнедеятельности организмов основная роль отводится биоэнергетическим процессам. Согласно законам термодинамики энергия не может быть не создана, ни уничтожена, она может лишь быть преобразована из одной формы в другую. Известно, что основным источником жизни на Земле является солнечный свет. Для растений и большинства автотрофных организмов свет является источником жизненной энергии, гетеротрофные организмы получают энергию в виде пищи. Световая фаза растений и фотосинтезирующих бактерий используется для биосинтеза органических веществ из воды и углекислого газа (СО2). В процессе фотосинтеза из 6 молекул СО2 синтезируются молекулы углеводов - глюкозы или фруктозы. Протоны и электроны, необходимые для восстановления веществ получаются из воды, при этом кислород, образующийся в процессе фотосинтеза, поступает в атмосферу. В фотосинтезе упорядоченно расположенные молекулы хлорофилла, которые выполняют светособирающую функцию, поглощают энергию Солнца и переносят её к высокоорганизованной ассамблее упакованных молекул пигментов в хлоропластах. Далее энергия солнца расходуется на синтез макроэргического соединения аденозинтрифосфата (АТФ) при участии кофермента никотинамидадениндинуклеотид фосфата (НАДФН).

Процесс расщепления воды реализуется по уравнению НАДФ+ + 2Н2О ↔ Н2О2 + НАДФН + Н+ и далее Н2О2 ↔ 0,5О2 + Н2О. Таким образом, окисленная форма кофермента НАДФ+ получив квант света, один протон и два электрона, преходит в восстановленную форму кофермента НАДФН. Кроме того, частично энергия расходуется на фосфорилирование аденозиндифосфата (АДФ) в результате чего синтезируется молекула АТФ.

В последующей темновой фазе фотосинтеза восстановленная форма кофермента НАДФН,используя энергию АТФ участвует в синтезе углеводов из СО2 — глюкозу, фруктозу или полисахариды – крахмал, целлюлозу. Включение СО2 в молекулу рибулозо-1,5-дифосфата с расщеплением этой молекулы и образованием двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты протекает с помощью двух молекул НАДФНдо двух молекул 3-фосфоглицеринового альдегида и дальнейшим их превращением в молекулу гексозы. Таким образом, получая 4 электрона молекулы СО2 образуют одноуглеродные фрагменты углеводов НСОН из которых затем синтезируются и другие органические соединения, например, белки и липиды.

Реализация описанных выше процессов возможно для неравновесных открытых систем, в результате чего живую клетку можно отнести к изотермической химической машине, которая для своего существования извлекает из внешней среды свободную химическую энергию. При этом химическая энергия затем преобразуется в процессе биосинтеза в клеточные компоненты, осмотическую работу, механическую работу, а также для сокращения и передвижения.

**1. Цели и задачи изучения дисциплины**

Дисциплина «Основы биоэнергетики» входит в перечень дисциплин образовательной программы по специальности «6М011300-Биология» в соответствии с дисциплиной «Методика преподавания биоэнергетики».

Биоэнергетика является важным разделом биологии, она связанна с многими науками, особенно с биофизикой, биомедициной, биохимией, химией природных соединений, молекулярной биологией, энзимологией, биотехнологией, биоинженерией, экологией.

Целью преподавания дисциплины является ознакомление студентов с основными закономерностями трансформации энергии в живых системах и использование полученных знаний в научной и практической профессиональной деятельности.

В задачи курса входит:

Ознакомление студентов с современными теоретическими знаниями о молекулярных механизмах превращениях энергии в живых системах; механизмах регуляции энергообмена; основных энергозапасающих и энергозатратных процессах и реакциях, связанных с жизненно важными функциями организма; методами иммобилизации ферментов, в том числе на электропроводных носителях с целью переноса электронов в активный центр биокатализаторов, формирование представлений о возможностях применения полученных знаний по биоэнергетике при решении задач биотехнологии и биоинженерии.

В результате изучения дисциплины студенты должны:

- овладеть необходимыми теоретическими знаниями об основных закономерностях трансформации энергии в клетке;

- знать механизмы окислительного и фотосинтетического фосфорилирования, молекулярные механизмы процессов энергетического сопряжения;

- освоить механизмы электроферментативных процессов, протекающих в биологических мембранах;

- иметь представления о механизмах регуляции энергетического обмена в норме и при патологии;

- использовать принципы биоэнергетики при моделировании электроферментативных процессов in vitro, а также применять полученные знания при решении задач биотехнологии и биоинженерии.

Для ознакомления студентов с современными достижениями науки в области биоэнергетики. При написании учебного пособия были использованы материалы более чем 500 оригинальных печатных работ, а также результаты собственных научных исследований, опубликованные в монографии П.П.Гладышева, Ю.А.Шаповалова, В.П.Квасовой «Реконструированные оксидоредуктазные системы».

**2. Элементный состав живой природы и термодинамические**

**принципы биоэнергетики**

Установлено, что элементный состав биологических объектов существенно отличается от химического состава земной атмосферы и верхней континентальной коры. Из обнаруженных в природе 103 химических элементов, в живые организмы входят лишь 22, причем только 16 встречаются во всех классах организмов (см. таблицу 1).

Таблица 1. Содержание химических элементов в литосфере земли и объектах живой природы

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Химический  элемент |  | Электро-отрица-тельность,  χ | Хим. состав  атмосферы у земной поверхности, объемн. конц. % | Состав верхней континентальной коры,% от массы | Содержание в биологических объектах,  % |
| Водород | Н2 | 2,7 | 0,00005 | 1,00 | 8-10 |
| Углерод | C | 5,19 | 0,0314 | 0,35 | 15-18 |
| Азот | N2 | 6,67 | 78,084 | 0,04 | 1,5-3,0 |
| Кислород | O2 | 8,11 | 20,9476 | 49,13 | 65-75 |
| Фтор | F2 | 9,915 |  | 0,08 | 0,0001 |
| Натрий | Na | 0,65 |  | 2,4 | 0,02-0,03 |
| Магний | Mg | 1,54 |  | 2,35 | 0,02-0,03 |
| Фосфор | P | 4,55 |  | 0,125 | 0,2-1,0 |
| Сера | S | 5,77 |  | 0,1 | 0,15-0,2 |
| Хлор | Cl2 | 7,04 |  | 0,2 | 0,05-0,10 |
| Калий | K | 0,51 |  | 2,35 | 0,15-0,4 |
| Кальций | Ca | 1,15 |  | 3,25 | 0,04-2,00 |
| Титан | Ti | 1,57 |  | 0,61 | 0,001-0,0001 |
| Железо | Fe | 1,72 |  | 4,2 | 0,01-0,015 |
| Медь | Cu | 2,30 |  | 0,005 | 0,0002 |
| Цинк | Zn | 1,87 |  | 0,0083 | 0,0003 |
| Селен | Se | 5,13 |  | 0,000005 | следы |
| Иод | I2 | 5,25 |  | 0,0001 | следы |

Ряд элементов способны притягивать к себе электроны других атомов, образуя общие электронные пары, которые могут быть охарактеризованы электроотрицательностью химических элементов. Самую высокую степень электроотрицательности имеют галогены и сильные окислители, низкую - металлы ([s-элементы](https://ru.wikipedia.org/wiki/S-%D1%8D%D0%BB%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%8B) [I группы](https://ru.wikipedia.org/wiki/1_%D0%B3%D1%80%D1%83%D0%BF%D0%BF%D0%B0_%D1%8D%D0%BB%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B2)). Бенсон рекомендовал для величины электроотрицательности (χ) атомов пользоваться более точным названием «ковалентный потенциал». Значения электроотрицательностей атомов в практической шкале χ приведены в таблице 1 и на рис. 1. Возможность образования ионной связи, при которой более электроотрицательный атом полностью «забирает» себе валентные электроны можно определить из уравнения.

, (1)

где  ω - степень ионности связи в химической структуре; Δχ— разность электроотрицательностей атомов элементов образующих связь.

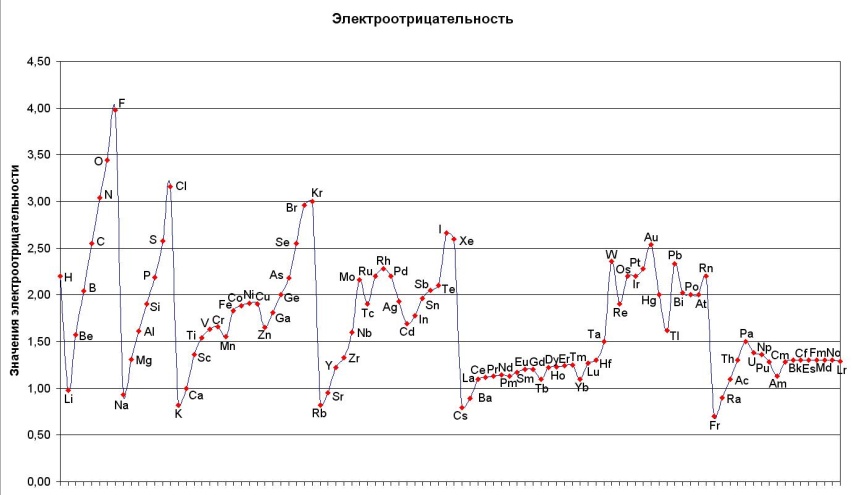


Рис. 1. Значения электроотрицательности химических элементов

В зависимости от количественного содержания химических элементов в организмах живых существ их разделяют на три группы. Г**руппу макроэлементов образуют:** водород, кислород, углерод, азот на их долю приходится 98% веществ массы клетки. Все эти химические элементы способны легко реагировать друг с другом, заполняя внешние электронные оболочки, образуя химические связи. Для водорода необходимо присоединить 1 электрон, кислороду - 2, азоту -3 и углероду - 4. Кроме того, три элемента: азот, кислород и углерод, способны образовывать как одинарные, так и двойные связи, благодаря чему значительно возрастает количество построенных из этих элементов химических соединений. Ковалентно связанные атомы углерода, азота, кислорода и водорода способны формировать диэлектрические каркасы огромного количества разных органических молекул. В ряде случаев молекулы веществ, построенные из вышеперечисленных химических элементов, относящиеся к группе неметаллов приобретают свойства электропроводности и образуют комплексы с переносом зарядов, возбуждаются под действием электромагнитного излучения, что нашло своё отражение в биоэлектрокаталитических процессах, протекающих в живой клетке.

Существенная роль в функционировании живой клетки отводится **микроэлементам:** натрию, кальцию, фосфору, сере, калию, хлору, железу, цинку, марганецу, кобальту, меди, никелю, йоду, фтору. В сумме они составляют 1% от 0массы клеток. При низком содержании этих элементов в клетке возникают различные заболевания. Нехватка йода у человека приводит к возникновению заболевания щитовидной железы, а недостаток железа может вызвать анемию. Содержащиеся в клетках следовые количества атомов (менее 10-12%) называют **ультрамикроэлементами. К** группе таких химических элементов относят: бром, золото, селен, серебро, ванадий и ряд других элементов. Эти элементы необходимы для нормального функционирования организмов, например, дефицит селена, может привести к возникновению раковых заболеваний, а недостаток бора вызывает заболевания у растений.

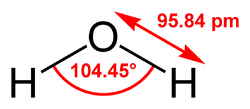
Таким образом, ещё задолго до возникновения жизни на Земле на основе группы макроэлементов, под воздействием внешней условий уже были образованы основные химические соединения, которые использовались затем при формировании живой материи. Углерод, водород и кислород оказались наиболее подходящими для образования живой материи потому, что они являются самыми легкими среди элементов, образующих ковалентные связи.

В основе жизнедеятельности клеток в качестве основной среды используется неорганическое вещество – вода, которая с некоторыми солями в среднем составляет около 80% от массы клеток. Её содержание в клетке может изменяться в зависимости от вида клетки и её возраста. Благодаря своим необычным физико-хиимическим свойствам вода существенно отличается от других растворителей. Первые клетки возникли в океане вблизи извергающихся вулканов и в процессе дальнейшего развития научились использовать уникальные свойства воды. Относительно других растворителей вода характеризуется высокой температурой кипения, плавления, удельной теплоемкостью, а также высокой теплотой испарения, плавления, теплопроводностью и поверхностным натяжением. Эти свойства воды объясняются тем, что молекулы воды более прочно связаны друг с другом, чем молекулы других растворителей за счет наличия водородных связей между молекулами воды, которые обеспечивают её высокую структурированность. Водородное связывание возникает между электроотрицательным атомом кислорода и атомом водорода.  Водородная связи примерно в 20 раз слабее ковалентной связи в связи с этим для неё характерна меньшая прочность. Поэтому водородные связи относительно легко образуются и легко разрываются. Даже при 100°С между молекулами воды существует достаточно сильное взаимодействие.

Высокая теплоемкость воды обеспечивает предохранение клетки от резких колебаний температуры на Земле. Высокая теплота испарения используется живыми организмами для предохранения от перегрева. Испарение жидкости растениями и животными является защитной реакцией на повышение температуры. Высокая теплопроводность воды обеспечивает равномерным распределением теплоты между отдельными частями организма. Вода практически несжимаема, что придает клетке способность значительной упругости и сохранение исходной эргономичной формы.

Угол связи в молекуле НОН составляет 104,45°, атомы водорода при этом в молекуле воды несут положительный заряд, а атомы кислорода — отрицательный.

**-**



**+**

Таким образом, отрицательный заряд сосредоточен на одной стороне, а положительный заряд — на другой образуя диполь. Диполи определяют свойства воды как растворителя гидрофильных веществ, содержащих заряженные группы. К гидрофильным соединениям в клетке относят соли, низкомолекулярные органические соединения, углеводы, белки, нуклеиновые кислоты. В клетке имеются также вещества, которые не имеют заряженных групп, которые не растворяются в воде, например, липиды (жиры), их называют гидрофобными. Липиды, формируют двумерные структуры (мембраны), которые почти непроницаемые для воды.

Важнейшим свойством воды является то, что она вступает во многие химические реакции, протекающие в клетке, а также реакцию гидролиза. Вода способна к диссоциации, когда от её молекулы отрываются гидроксильный ион (ОН-) и протон (Н+).

Н2O ↔ Н+ + OH-

Важную роль в жизнедеятельности клетки играют растворенные в воде соли, образованные катионами калия, натрия, магния, кальция и др., а также анионами соляной, серной, угольной и фосфорной кислот.

Для многих катионов характерно неравномерное распределение ионов между клеткой и окружающей ее средой. Для поддержания этого состояния клетка затрачивает существенную часть образующейся в ней энергии. Неравномерное распределение ионов между клеткой и окружающей ее средой необходимо для осуществления многих важных биохимических процессов, в том числе для проведения возбуждения по нервным и мышечным клеткам, осуществления сокращения мышц.

Следует отметить, что неорганические вещества, содержатся в живых организмах, могут находиться в твердом состоянии. Так, например, кости человека и животных сформированы в основном фосфатами кальция и магния. Известно, что раковины моллюсков построены из карбоната кальция.

Основным отличительным признаком биоорганических соединений является содержание в них углерода. Важными среди них для живой природы представляют низкомолекулярные органические кислоты, свободные жирные кислоты и их эфиры, спирты, кетоны, аминокислоты, азотистые основания и др. Большая часть основных структур (каркасов) клетки построена с помощью полимерных высокомолекулярных соединений, образованных низкомолекулярными повторяющимися мономерами, связанными друг с другом ковалентной связью. К биополимерам (полимеры, встречающиеся в живой природе) относятся белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды. Макромолекулы биополимеров образуют надмолекулярные комплексы, например, ферментные комплексы, рибосомы, сократительные системы с молекулярной массой от 106 до 109 дальтон, которые затем формируют органеллы клетки: ядро, митохондрии, хлоропласты, лизосомы и т.д.

**Термодинамические принципы биоэнергетики**

Материальные процессы и взаимодействия в них объединены общим понятием энергии. Основным свойством различных форм энергии является движение. При переходе одной формы движения в другую, энергия исчезнувшего движения находится в эквивалентной количественной взаимосвязи с энергией вновь возникшего движения. Любой термодинамический анализ энергетических превращений начинается с определения границ исследуемой физической системы, что находиться вне системы называют окружающей средой. В биологических системах энергия может переходить из системы в окружающую среду и обратно. В основу термодинамического изучения любой системы рассматривается начальное и конечное его энергетическое состояние после достижения равновесия. Энергия конкретной формы движения количественно выражается через физические параметры и описывается уравнением состояния. Как правило, количество энергии зависит от поддающихся измерению параметров: температуры, давления, массы и др. Энергетический баланс изменений начального и конечного состояния системы описывается первым законом термодинамики, согласно которому общая энергия системы и окружающей среды остается постоянной. Энергия в ходе химических реакций, физических или биологических процессов не может появляться или исчезать, она переходит из одной формы в другую, а именно: световую, электрическую, механическую, химическую или тепловую. Закон сохранения и превращения энергии является универсальным, применимым для крупных материальных тел, биологических систем, процессов, протекающих с участием одной, нескольких или большого числа молекул.

Хаотическое столкновение молекул двух соприкасающихся тел является причиной возникновения тепловой энергии, которое может сопровождаться световым излучением. Если в системе наблюдается упорядоченный процесс движения большого числа молекул под действием сил, например, поля тяготения, электрического поля, давления такой вид движения может быть определен величиной произведенной работы. Следовательно, теплота и работа дают качественную и количественную характеристику передачи движения от одной формы к другой. Второй закон термодинамики является экспериментально подтвержденным физическим принципом, который накладывает ограничения на возможные самопроизвольные направления процессов, которые могут протекать в [термодинамических системах](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%BD%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F_%D1%81%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%B0), т.е. система стремится самопроизвольно перейти в состояние с максимальной термодинамической вероятностью.

Мерой характеризующей величину разупорядоченности процессов в материальном мире считается энтропия, которая имеет максимальное значение при достижении состояния равновесия. Равновесие определяют как состояние системы, при котором не наблюдается каких либо изменений (физических или химических) при постоянных параметрах: температуре, давлении, концентрации компонентного состава. Процессы, протекающие без изменения энтропии, называют обратимыми, а процессы сопровождающиеся ростом энтропии – необратимыми. Реальные физические, а также процессы жизнедеятельности являются необратимыми. Энтропия имеет математическое выражение, которое определяется функцией состояния ΔS = ΔQ/T и имеет размерность кал/°С, где ΔS изменение энтропии, ΔQ – изменение количества тепла, T – температура.

Энтропию физических процессов не всегда возможно измерить или вычислить. В связи с этим для определения величины энтропии используют уравнение, которое объединяет первый и второй законы термодинамики, вводя при этом третью функцию, которую называют свободной энергией. Свободную энергию ΔG при постоянной температуре и давлении можно определить из уравнения

ΔG = ΔH - TΔS, (2)

где ΔH – энтальпия, теплосодержание (приращение функции), Т – абсолютная температура, ΔS – изменение энтропии.

Таким образом, в химических процессах одновременно действуют два противоположных фактора - энтропийный (TΔS) и энтальпийный (ΔH). Суммарный эффект этих противоположных факторов в процессах, протекающих при постоянном давлении и температуре определяет изменение энергии Гиббса ΔG. Формулу (2) можно представить в виде ΔH = ΔG + TΔS, некоторое количество теплоты расходуется на увеличение энтропии TΔS, которая затрачена для совершения работы, её называют связанной энергией. Другая часть тепла ΔG свободная и может быть использована для совершения работы, поэтому эту энергию называют свободной энергией Гиббса. По характеру изменения свободной энергии Гиббса можно установить принципиальную возможность реализации химического процесса. При ΔG < 0 химическая реакция принципиально возможна (в реальных условиях реакция может не начаться по кинетическим причинам), в то время как при ΔG > 0 процесс не возможен, при ΔG = 0 система находится в состоянии химического равновесия.

Изменение энтальпии ΔH (теплосодержания) можно определить из уравнения

ΔН = ΔЕ - ΔРV, (3)

где ΔЕ - изменение общей энергии системы, Р- давление, V – объем.

Принимая, что в биологических объектах биохимические реакции протекают в разбавленных растворах, где давление и объем ΔРV имеют постоянную величину равную нулю. В этом случае из уравнения (3) видно, что ΔН = ΔЕ. Подставляя последнее значение в (2) получим

ΔG = ΔЕ – TΔS или ΔЕ = ΔG + TΔS (4)

Зная общую энтропию системы и окружающей среды или свободную энергию самой системы, возможно, предвидеть направление биохимической процессов. Таким образом, вышеописанный способ расчета свободной энергии осуществляется по изменениям энтальпии и энтропии. Стремление энтропии к максимуму, является движущей силой любых материальных процессов.

Изменение свободной энергии Гиббса ΔG можно определить по величинам констант равновесия из уравнения.

aA + bB ↔ cC + dD, (5)

где а, b, c, d – количество участвующих в реакции веществ А, B, C, D, соответственно. Константа равновесия уравнения (5) будет равна

, (6)

где k1 и k-1 – константы скорости прямой и обратной реакций, соответственно.

Принимая во внимание (5) ΔG можно определить из уравнения

, (7)

где [A], [B], [C], [D] - молярные концентрации; R – газовая постоянная (1,987 кал·моль-1· град-1),Т – абсолютная температура и - изменение стандартной свободной энергии. Изменение стандартной свободной энергии при рН 7,0 обозначается символом . При = 0 свободная энергия минимальна и дальнейших изменений не происходит. Подставляя это значение в уравнение (7), получим

, (8)

или

(9)

Подставив (6) в (9) получим уравнение, которое связывает изменение свободной энергии Гиббса в ходе химической реакции с её константой равновесия

, (10)

или , (11)

Величину изменения стандартной свободной энергии можно определить по величинам свободных энергий образований. Изменение стандартной свободной энергии реакции есть разность между стандартной свободной энергией исходных (r) веществ и стандартной свободной энергией продуктов (р) реакции

(12)

Согласно уравнению (12) свободная энергия для реакции (5) имеет вид:

(13)

Под стандартной свободной энергией данного соединения понимают то количество свободной энергии, которое может высвободиться при полном его разрушении.

Используя уравнение (11) возможно рассчитать для любой химической реакции для которой известна , которую возможно получить из данных экспериментальных исследований. При определении стандартной свободной энергии учитывают разницу между изменением стандартной свободной энергии и величиной, полученной в результате непосредственного измерения.

Расчет стандартной свободной энергии повеличинам окислительно-восстановительных потенциалов для обратимой окислительно-восстановительной реакции состоящей из двух

Ared + Box ↔ Bred + Aox (14)

электродных реакций Ared ↔ Aox и Bred ↔ Box определяется следующими уравнениями:

(15)

или

(16)

Из уравнения (15) и (16) можем написать

) (17)

и

(18)

Учитывая, что , получаем ,

В биохимических реакциях расчет по изменениям энтальпии и энтропии имеет важное практическое значение. Если для реакции при данной температуре определены значения и ΔH0, то величина изменения стандартной энтропии может быть найдена по уравнению

(19)

Известно, что изменение энтропии при денатурации белков чрезвычайно высоки в пределах от +10 до - 30 энтр.ед/моль, что говорит о высокой степени структурной организации белков в нативном состоянии и разрушении этой организации при тепловой денатурации. По величинам и ΔH0  возможно идентифицировать природу кислотных и основных групп биокатализаторов.

Многие реакции в живой природе протекают с потреблением энергии. В связи с этим биохимически важные вещества разделяют на высокоэнергетические и низкоэнергетические. Вещества, которые имеют большую отрицательную величину свободной энергии гидролиза, относят к высокоэнергетическим. Принято считать, что высокоэнергетические вещества при рН 7 имеют величину энергии гидролиза более отрицательную чем – 7 ккал/моль. К важнейшему высокоэнергетическому соединению, участвующему в биохимических процессах живой клетке относят аденозин-5ʹ-трифосфат или АТФ. При гидролизе 1 моля АТФ до аденозин-5ʹ-дифосфата (АДФ) и неорганического фосфата выделяется более 7,3 ккал свободной энергии. Также, важными биохимическими соединениями являются ацетилфосфаты и аминоацетиладенилаты, которые имеют стандартные свободные энергии, соответственно, - 10,5 и -13,3 ккал. Для веществ: креатинфосфата и аргининтрифосфата, выполняющих функцию энергетического «депо» свободная стандартная энергия гидролиза составляет ~ - 10,3 ккал. Группа тиоловых эфиров, например, кофермент А, который принимает участие в переносе ацильной группы имеет стандартную свободную энергию ~ - 8 ккал/моль, фосфоенолпируват имеет ккал.

**Контрольные вопросы**

1. Перечислите основную г**руппу макроэлементов, входящих в состав живых клеток.**

**2. Перечислите микроэлементы, участвующие в процессах, протекающих в живой клетке.**

**3. Понятие электроотрицательности химических элементов.**

4. Роль воды в процессах жизнедеятельности клеток.

5. Что изучает термодинамика?

6. Что происходит с энергией в ходе химических реакций, физических или биологических процессов?

7. Первый закон термодинамики.

8. Какая величина характеризует разупорядоченность процессов в материальном мире?

9. Второй закон термодинамики.

10. Понятие энтропии, математическое описание энтропии.

11. Понятие свободной энергии и формула для её определения.

12. Понятие энтальпии и формула для её определения.

13. Стандартная свободная энергия.

14. Определение величины стандартной свободной энергии по величинам свободных энергий образований.

15. Расчет стандартной свободной энергии повеличинам окислительно-восстановительных потенциалов

16. Сколько энергии выделяется при гидролизе 1 моля АТФ?

### 3. Важнейшие биоорганические соединения живой природы

### 3.1. Аминокислоты, белки, ферменты

Среди биоорганических соединений, представленных в клетке, основными являются белки: на их долю приходится около 50% сухого вещества. В состав всех белков входят углерод, водород, кислород, азот и сера. В некоторых белках присутствуют элементы фосфор, железо, магний, цинк, медь, марганец. Характерная особенность белков — их большая молекулярная масса: она колеблется в пределах от нескольких тысяч до сотен тысяч и даже миллионов дальтон. Мономером, то есть структурной единицей любого белка являются аминокислоты, для которых характерно сходное, но не совсем одинаковое строение. В настоящее время известно, свыше 150 различных аминокислот, встречающихся в организмах, но все они происходят от 20 аминокислот формирующих белки (см. рис.2).

Из рисунка 2 видно, что молекулы аминокислот состоит из двух частей. Одна часть содержит аминогруппу (-NН2), присоединенную к атому углерода, и другую, карбоксильную группу (-СООН). Вторая часть молекулы аминокислоты, называется боковой цепью или радикалом. Она имеет разную структуру у различных аминокислот. Боковые радикалы могут быть заряжены отрицательно или положительно, содержать ароматические кольца и гетероциклические структуры, гидрофобные группировки, гидроксильные

(-ОН) группы или атомы серы.

В белковых молекулах последовательно расположенные молекулы аминокислот соединяются друг с другом ковалентно, образуя длинные неразветвленные полимерные цепи. Аминокислоты в цепи расположены таким

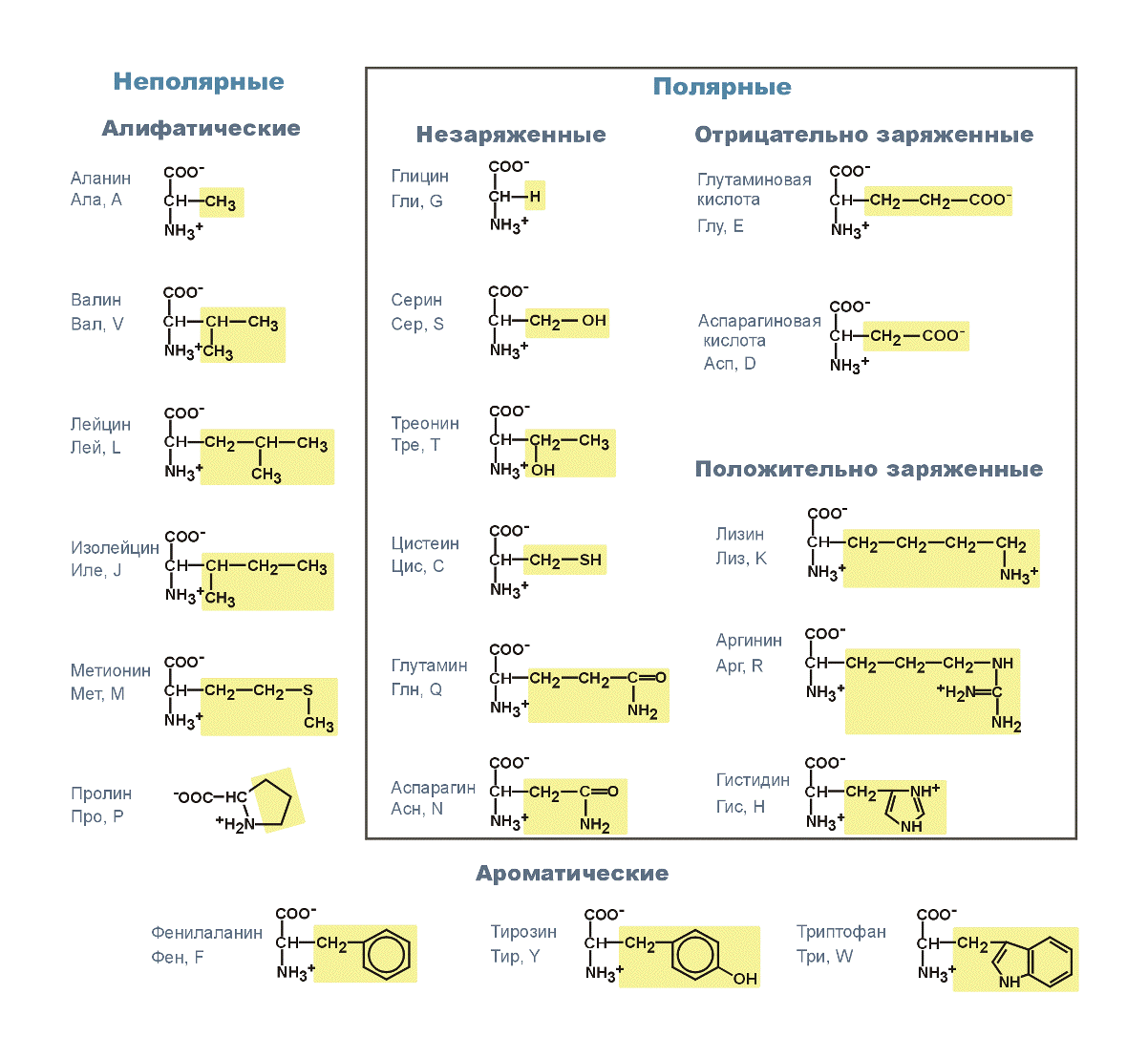


Рис. 2. Химические структуры аминокислот

образом, что аминогруппа одной аминокислоты взаимодействует с карбоксильной группой другой. При взаимодействии двух этих групп выделяется молекула воды и образуется пептидная связь рис.3. Если пептид

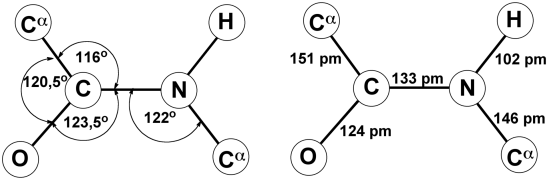


Рис. 3. Пептидная связь

состоит из двух аминокислот, его называют дипептидом, из трех — трипептидом. Молекулы белка могут содержать сотни и даже тысячи аминокислотных остатков. Таким образом, белки представляют собой полипептиды. Нужно отметить, что белковые молекулы представляют собой

не беспорядочно построенные полимеры различной длины, каждая белковая молекула характеризуется определенной последовательностью аминокислот, которая определяется структурой гена, кодирующего данный белок.

Последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка определяет его первичную структуру, то есть его формулу. Общее число различных белков, встречающихся у всех видов живых организмов, составляет величину порядка 1010-1012. Важнейшей задачей современной биологии является определение первичной структуры белков, а также установление зависимости между первичной структурой и функциональной активностью белков. Поскольку последовательность аминокислот задается структурой гена, то первичную структуру белков в настоящее время определяют выясняя последовательность нуклеотидов в соответствующем гене, используя для этого методы генной инженерии.

Белковая молекула в нативном (неповрежденном) состоянии обладает характерной для нее пространственной структурой, или конформацией (рис.4).

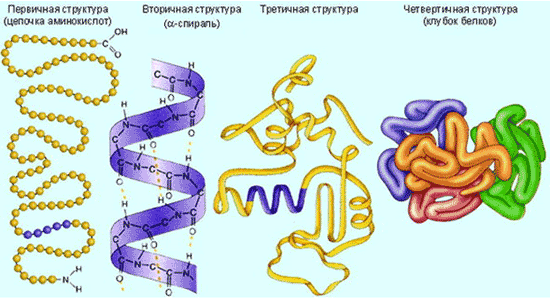


Рис. 4. Четыре уровня организации белковой молекулы

Она определяется тем, как сворачивается полипептидная цепь белка в растворе. Чаще всего отдельные участки полипептидной цепи сворачиваются в спираль (α-спираль) или образуют зигзагообразные структуры, располагающиеся антипараллельно, так называемый складчатый слой, или β-структуру. Образование α-спирали и β-структуры приводит к формированию вторичной структуры белка. При этом боковые цепи аминокислот располагаются с наружной стороны спирали или зигзагообразной структуры. Спиральная структура стабилизируется водородными связями, которые образуются между NH-группами, находящимися на одном витке и CO-группами, расположенными на другом витке спирали. Эти водородные связи параллельны оси спирали. Структура типа складчатого слоя также стабилизируется за счет водородных связей, которые образуются между параллельными слоями. Хотя водородные связи слабее ковалентных, присутствие их в значительном количестве делает структуры типа α-спирали или β-складчатого слоя достаточно прочными. Спиральные участки и структуры типа складчатого слоя подвергаются дальнейшей упаковке, в результате чего формируется третичная структура белка. На этом этапе растворимые белки обычно образуют глобулярную структуру, имеющую вид клубка, в которой заряженные аминокислотные остатки оказываются на поверхности, а гидрофобные аминокислотные остатки - внутри клубка. При этом зачастую сближаются аминокислотные остатки, которые в полипептидной цепи расположены далеко друг от друга. Для каждого белка характерен свой способ упаковки, который задается уже на уровне первичной структуры данного белка, то есть зависит от порядка расположения аминокислот в полипептидной цепи. Многие белки состоят из нескольких полипептидных цепей одинаковой или различной структуры. При объединении таких цепей образуется сложный белок, для которого характерна четвертичная структура. Такие белки называют олигомерами, а входящие в состав олигомера отдельные полипептидные цепи - мономерами.

Большая часть белковых молекул способна сохранять свою биологическую активность, то есть способность выполнять свойственную им функцию только в узком диапазоне температур и кислотности среды. При повышении температуры или изменении кислотности до экстремальных значений в структуре белков происходят изменения, которые называют денатурацией. Примером денатурации является свертывание белка яйца, наблюдающееся при его варке. При денатурации не происходит разрыва ковалентных связей, но разрушается характерная для данного белка четвертичная, третичная и вторичная структура. В результате чего в денатурированном состоянии полипептидные цепи белков образуют случайные и беспорядочные клубки и петли. Белки при изменении рН раствора способны приобретать положительный или отрицательный заряд в зависимости от константы ионизации функциональных групп радикала, а также концевых амино- и карбоксильной групп. Состояние белка, при котором количество ионизированных положительных и отрицательных функциональных групп одинаково называют электронейтральным или изоэлектрической точкой, которую обозначают pI.

**Функции белков**. Для белков характерно значительное разнообразие функций. Самую большую и наиболее важную по биологическому значению группу белков составляют белки-ферменты, которые являются катализаторами, ускоряющими протекание различных химических реакций.

Вторая по величине группа белков представлена белками, являющимися структурными элементами клетки. К ним относится фибриллярный белок коллаген, главный структурный белок, входящий в состав соединительной и костной ткани. Другие типы белков являются компонентами сократительных и двигательных систем. Таковы, например, актин и миозин, два главных элемента сократительной системы мышц. Из структурных белков формируется цитоскелет клетки, представляющий собой пучки фибриллярных белков, соединяющих различные органеллы клетки друг с другом и с плазматической мембраной клетки.

Некоторые белки выполняют транспортную функцию, они способны связывать и переносить с током крови различные вещества. Наиболее известным из таких белков является гемоглобин, который находится в эритроцитах позвоночных и связываясь с кислородом осуществляет его перенос из легких в ткани. Сывороточные липопротеиды переносят с током крови сложные липиды, а сывороточный альбумин - свободные жирные кислоты.

К транспортным белкам относятся белки, встроенные в биологические мембраны и осуществляющие перенос различных веществ через эти мембраны. В обычных условиях клеточная мембрана слабо проницаема для таких веществ как К+, Na+, Са2+ поскольку поры, сформированные белками-каналами закрыты. Однако некоторые воздействия, например, электрические импульсы или биологически активные вещества, связывающиеся с каналами открывают пору, вследствие чего ион, способный проникать через этот канал, перемещается с одной стороны мембраны на другую в направлении уменьшения концентрации. Перемещение ионов в противоположном направлении осуществляется с затратой энергии другими транспортными белками мембраны, называемыми ионными насосами.

В специализированных клетках растений и животных осуществляется синтез специальных регуляторов или гормонов, часть из которых (но не все) являются белками, регулирующими различные физиологические процессы. Наиболее известным из них является инсулин — гормон, вырабатываемый в поджелудочной железе и регулирующий уровень глюкозы в клетках организма. При недостатке инсулина в организме возникает заболевание известное как сахарный диабет.

Кроме того, белки способны осуществлять защитную функцию. При попадании в организм животных или человека вирусов, бактерий, чужеродных белков или других полимеров происходит синтез специальных защитных белков, которые называют антителами или иммуноглобулинами. Эти белки связываются с чужеродными полимерами. Связывание антител с белками вирусов или бактерий подавляет их функциональную активность и останавливает развитие инфекции. Антитела обладают уникальным свойством, способны отличать чужеродные белки от собственных белков организма. Такой механизм защиты организма от возбудителей заболеваний называют иммунитетом. Иммунитет к инфекционным заболеваниям можно создать путем инъекции очень небольших количеств некоторых биополимеров, входящих в состав микроорганизмов или вирусов, являющихся возбудителями данной болезни. При этом образуются антитела, которые впоследствии способны защитить организм, если он подвергнется заражению данным микроорганизмом или вирусом. Многие живые существа для обеспечения защиты выделяют белки, которые называют токсинами, являющиеся сильными ядами.

При недостатке питания у животных резко усиливается распад белков до входящих в его состав аминокислот, последние после соответствующих превращений могут использоваться в качестве источника энергии (энергетическая функция белков).

Часть бактерий и все растения способны синтезировать все 20 аминокислот, входящих в состав белков. Однако животные в процессе эволюции потеряли способность синтезировать 10 особо сложных аминокислот, которые они должны получать с растительной и животной пищей. Эти аминокислоты получили название - незаменимые. Они входят в состав растительных и животных белков, получаемых с пищей, которые в пищеварительном тракте расщепляются до аминокислот. В клетках из этих аминокислот строятся собственные белки, характерные для данного организма. Отсутствие в пище незаменимых аминокислот вызывает тяжелые нарушения обмена веществ.

Ферменты и их роль в процессе жизнедеятельности. При той температуре и кислотности среды, которая характерна для клетки скорость большинства химических реакций невелика. Однако реально в клетке реакции протекают с очень большой скоростью. Это достигается за счет присутствия в клетке специальных катализаторов - ферментов, которые значительно увеличивают скорость химических реакций. Ферменты - самый крупный и специализированный класс белков. Именно ферменты обеспечивают протекание в клетке многочисленных реакций, из которых складывается клеточный обмен веществ. В настоящее время известно более нескольких тысяч ферментов, которые подразделяются на шесть классов.

1. Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции)
2. Трансферазы (перенос функциональных групп)
3. Гидролазы (реакции гидролиза)
4. Лиазы (присоединение по двойным связям)
5. Изомеразы (реакции изомеризации)
6. Лигазы (образование связей за счет АТФ)

Каталитическая эффективность ферментов необычайно велика: они способны ускорять реакции в миллионы раз. Каталитическая активность фермента определяется не всей его молекулой, а определенным участком молекулы фермента, который называется его активным центром. Известно, что химический катализ чаще всего осуществляется за счет образования комплекса превращаемого в процессе реакции вещества (субстрата) с катализатором. В процессе ферментативной реакции субстрат взаимодействует с ферментом, причем связывание субстрата осуществляется именно в активном центре. Для ферментов характерно пространственное соответствие между субстратом и активным центром, они подходят друг к другу, «как ключ к замку». Таким образом, ферменты характеризуются субстратной специфичностью, поэтому каждый фермент обеспечивает протекание одной или нескольких реакций одного типа. В случае, если фермент катализирует реакцию только с одним субстратом, в этом случае говорят, что фермент обладает абсолютной субстратной специфичностью.

Связывание субстрата с ферментом (образование фермент-субстратного комплекса) сопровождается перераспределением электронного облака, окружающего превращаемое в процессе реакции вещество (субстрат), за счет взаимодействия с аминокислотами фермента, которые участвуют в формировании активного центра. Вследствие этого отдельные связи между атомами в молекуле субстрата ослабляются и разрушаются значительно легче, чем в растворе. В других случаях (реакции, при которых происходит образование связи) две молекулы субстрата сближаются в активном центре фермента настолько, что между ними легко образуется химическая связь. При денатурации фермента его каталитическая активность исчезает, так как нарушается структура активного центра.

**3.2. Коферменты**

Каталитическую функцию в клетке наряду с белками вы­полняют универсальные органические вещества небелковой природы. К числу наиболее важных окислительно-восстановительных коферментов отно­сятся никотинамидадениндинуклеотид (НАД), никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФ), флавинадениндинуклеотид (ФАД), флавинмононуклеотид (ФМН), кофермент Q или убихинон (КоQ) и др. Известно также большое число ферментов, в активный центр которых входят металлы (железо, медь, кобальт, марганец), которые также участвуют в превращении субстратов в процессе каталитического акта.

**Коферменты НАД, НАДФ.** Катализ с участием двухсубстратных ферментов всегда сопровождается окислением или восстановлением кофермента и восстановлением или окислением субстрата, соответственно. В НАД и НАДФ (рис. 5) реакционноспособной частью кофермента является никотинамидное

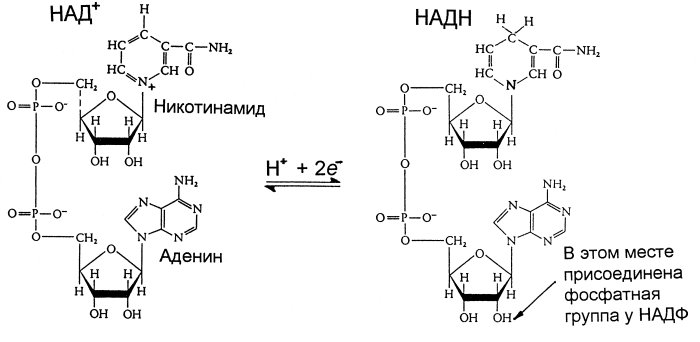
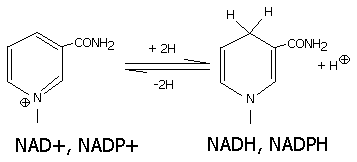


Рис. 5. Строение кофермента НАД

кольцо. При окислении суб­страта никотинамидный нуклеотид - НАД+ присоединяет ион водорода и два электрона - эквиваленты гидридиона. Кофермент ФАД также способен присоединять два электрона, од­нако его отличает способность присоединять изоаллоксазиновым кольцом два теряемых субстратом атома водорода. НАД, является косубстратом многих ферментов класса оксидоредуктаз, он содержится в: печени, сердце, почках, над­почечниках, молочных железах, головном мозге, в меньших количествах встречается в листьях растений, дрожжах. Кофермент НАД, участвует в катализе многих жизненно важных процессов, в превращениях углеводов, жиров и белков, в био­логическом окислении и фотосинтезе, в цикле витамина А и т.д. Принимает участие в окислительном фосфорилировании, гликолизе, многочисленных формах брожения с участием микроорганизмов. Основная его функция - перенос электро­нов по дыхательной цепи от субстрата к кислороду. Молекула НАД состоит из двух гетероциклов- пиридинового и аденинового, соединенных цепочкой из двух остат­ков рибозы и остатка пирофосфорной кислоты. Адениновый цикл молекулы участвует в фиксации кофермента в катали­тическом кармане апофермента. В окислительно-восстановительных реакциях НАД обратимо гидрируется либо окисляется с присоединением или отдачей соответственно двух электронов и протона:



В окисленной форме НАД+ содержит в пиридиновом кольце положительно заряженный атом азота, обусловлива­ющий смещение электронной плотности в нуклеотиде к азоту. Благодаря этому у углерода в положении 4 возникает поло­жительный заряд, определяющий присоединение отрицательно заряженного гидридного иона и последующее восстановление кофермента. Было установлено, что атом углерода в положении 4 более положителен чем все осталь­ные атомы кольца, что в основном и определяет его повы­шенную реакционную способность.

Изотопным методом доказано, что при вступлении в реакцию никотинамианое кольцо проявляет стереоспецифичность. Это связано с тем, что две стороны плоскости кольца неравноценны вследствие наличия боковой амидной группы в положении 3, относительно которой и проявляется асимметричность. Для НАД стереоспецифичность принято разделять на два типа - А и В:

D H

R N R N

H D

CONH2 CONH2

Тип А (или α) Тип В (или ß**)**

Например, тип А является стереоспецифическим для АА изоформы АДГ, тип В - для ВВ изоформы этого фермента. В связи с этим отмечается наличие соответственно спиртовой и стероидной активности у образованных фермент-кофакторных комплексов.

Получены данные, указывающие на то, что помимо атома водорода в положении С4 заместитель в положении 3 пиридинового цикла участвует как в связывании кофактора, так и в последующем взаимодействии НАД с субстратами.

При изучении флюоресценции НАДН, было об­наружены две полосы поглощения при 260 и 340 нм (рис.6). Одна принадлежит аденину, другая- восстановленному никотинамиду.

ε ·106 , cм2 /моль

15

10

5

НАДН

НАД

0

260 300 340 λ, (ммк)

Рис. 6. Спектр поглощения окисленного и восстановленного НАД

Так как поглощение энергии может быть вызвано никотинамидным кольцом, был сделан вывод о переносе энергии с аденина на никотинамид. Дальнейшие исследования показали, что перенос энергии возможен лишь для изогнутой (сложен­ной) конформации молекулы НАД, в которой плоскости аденина и никотинамида сближены и параллельны β - конформация. В случае вытянутой молекулы кофермента (α-конформация) перенос энергии с аденина на никотинамид затруднен. Обнаружено, что каталитической активностью обладает лишь β-конформация.

Большой практический значение имеют исследования мо­лярной абсорбции растворов β - НАД, лежащие в основе количественного анализа окисленной и восстановленной форм кофермента (рис. 6). При длине волны 260 нм поглощают как окисленная, так и восстановленная формы НАД. Молярная абсорбция (Е) при температуре 25°С для НАД+ равна 17,4·103, а для НАДН при тех же условиях - 14,1 · 10 см-1, При 340 нм поглощает только восстановленная, форма НАД с Е=6,2·103 м-1·см-1. Отношение Е260/Е340 для чистого НАДН равно 2,265. Величина этого отношения, определяемая экспериментально, может служить критерием чистоты препаратов НАДН. Вместе с тем максимум поглощения, а также его интенсивность в значительной степени зависят от полярности используемой среды.

Изучались и другие свойства НАД, в частности, изменение коэффициента экстинкции в зависимости от температуры в области 15-35°С (рис.7). На основании этих данных вычислялся процент изменения экстинкции в исследуемом интервале температур. Было найдено, что при 340 нм и температуре выше 20°С это изменение приблизи­тельно равно 0,27% на 1°С, Однако эту поправку используют редко. НАД при возбуждении ультрафиолетовым светом с дли­нами волн 260 и 340 нм флюоресцирует с максимумом излучения при 460 нм. Квантовый выход флюоресценции для β -

ΔD·103, cм-1

20

0

1

2

-20

3

4

-40

320 340 360 λ, (ммк)

Рис. 7. Зависимость оптической плотности НАДН от температуры: 1 - 20°С, 2 - 25°С, 3 - 30°С, 4 - 35°С. Концентрация НАДН соответствовала 136 ммк в растворе с рН=7,6

формы НАДН при 260 нм больше, чем для α-формы. Для НАД характерна оптическая активность. Например, α-изомер НАДН и НАД+ в водной среде имеет /α/25° = +14,31, а для β-НАДН /α/25°= -34,8. Обычно применяемые биологические препараты, кроме β-изомера, содержат 10-15% неактивного α-изомера. Потенциометрическим титрованием кофермента НАД гидрооксидом натрия различной концентрации при температуре 25°С определили значение термодинамической константы равновесия рКа, равное 3,88±0,02.

Стабильность окисленной и восстановленной форм ко­фермента в растворах при различных значениях pH отличается (рис.8).

2

8

15

60

1

2

8

30

120

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | НАДН 60°С |  |  |  | НАД 100°С |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  | РО4 |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  | НАД 60°С |  |  |  |  |  | Время, мин |  |
| НАДН 23°С |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  | НАД 38°С |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

+210

Для потери 5% Для потери 99%

log k (час-1)

+110

0

-1

-2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 рН

Рис. 8. Скорость разрушения кофермента в окис­ленной НАД и восстановленной НАДН формах в зависимости от pH бу­ферных растворов и температуры

Восстановленная форма кофермента НАД относительно стабильна в щелочных растворах и неустойчива в кислых. Отмечается, что при длительном хранении восста­новленная форма подвергается окислению. Окисленная форма кофермента НАД+ стабильна в кислых растворах, но малоустойчива в щелочных. Зависимость скорости разрушения НАД+ и НАДН от pH раствора и температуры представлена на рис. 8. На разрушение НАДН влияют некоторые соли, содержа­щиеся в растворе. Например, при pH 10 раствора и темпе­ратуре 60°С натриевые соли соляной, щавелевой, серной, фосфорной и малеиновой кислот разрушают НАДН в количестве от 40 до 100%. При замораживании растворов восстановленной формы кофермента получают продукт неустановленного строения, действующий как сильный ингибитор ферментативных реакций. Таким же сильным действием обладают примеси, присутствующие в промышленном препарате кофермента. Из 12 сопутствующих коферменту веществ - 11 являются ингибиторами.

При исследовании ферментативных реакций НАД-зависимых ферментов важная роль отводится изучению особенностей взаимодействия кофермента с апоферментом. Полагают, что взаимодействие НАД и апофермента осуществляется по связи SH-группы апофермента с никотинамидным нуклеотидом кофермента по 4-му положению углеродного атома. Появление широкой полосы поглощения при 360 нм объясняется образованием комплекса с переносом заряда между коферментом и апоферментом. Пользуясь полуэмпирическим методом, японские исследователи изучили возможность переноса заряда в фермент-кофакторном комплексе. Учитывая, что кофермент взаимодействует с индольным остатком триптофана апофермента, был рассчитан электростатический потенциал, определяющий наиболее устойчивую и выгодную пространственную ориентацию комплекса аденин-никотинамид-индол. Энергетически оптимальные расстояния между плоскостями аденинового и никотинамидного нуклеотидов, а также никотинамидного нуклеотида и индола принимались равными 0,34 нм.

НАДН окисляется кислородом воздуха с образованием Н2О2 и при облучении медленными электронами с энергией 6-40 эв. Известно восстановление НАД+ боргидридом и тиосульфатом натрия. При восстановлении НАД+ электрохимическим путем, под действнем рентгеновских лучей или при взаимодействии с боргидридом натрия образуется кофермент с низкой или полностью отсутствующей коферментной активностью. Эту особенность связывают с образованием неактивного димера, причем димеризация протекает по 4-му положению пиридинового кольца кофермента:

СОNH2

N-R

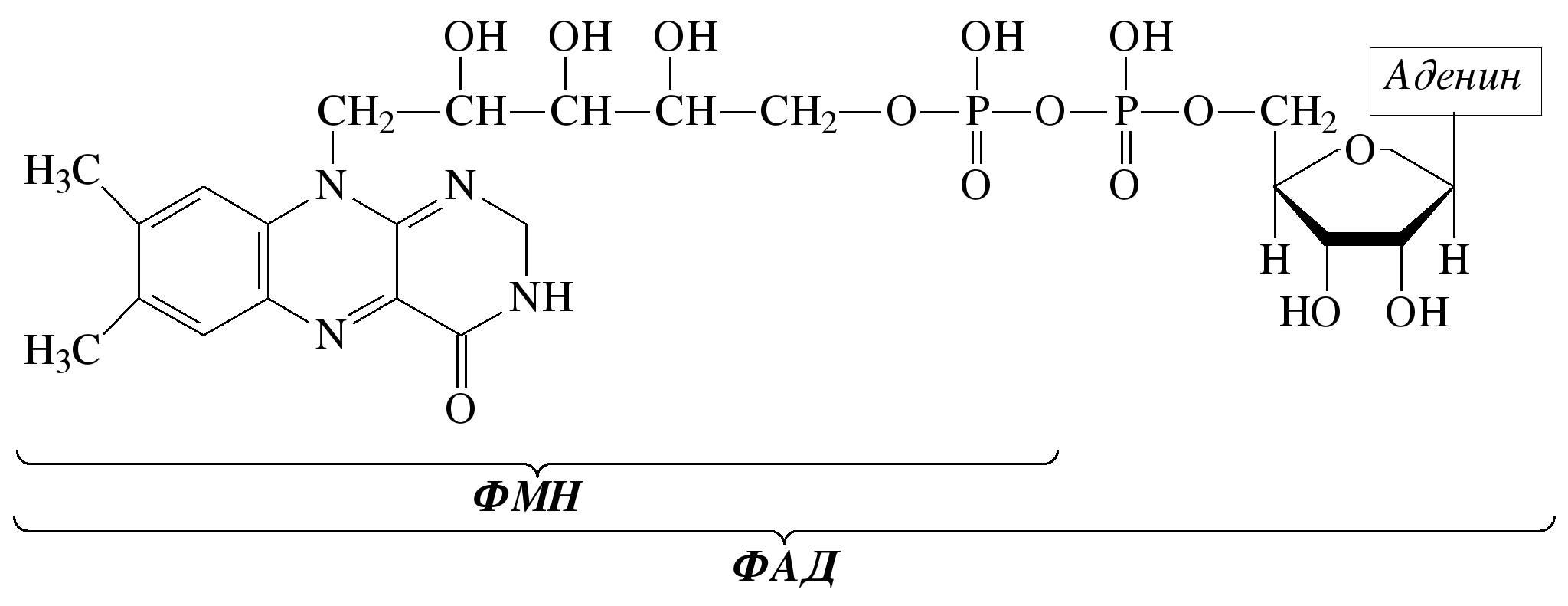
R-N

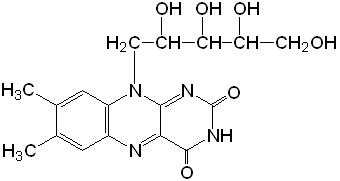
СОNH2

По активному 4-му углеродному атому никотинамид­ного кольца, НАД присоединяет нуклеофильные агенты: пируват, диоксиацетон, меркаптаны, гидроксиламин, а также анионы циана и сульфита. Установлено, что окисленная и восстановленная формы кофермента НАД конкурируют за место в ферментативном комплексе АДГ-НАД. В то время как конкуренция между этанолом и ацетальдегидом проявляется в значительно меньшей степени.

Кофермент НАДФ имеет очень близкие к НАД физико-химические свойства за исключением некоторых, связанных с наличием дополнительной фосфатной группы в положении 2 в остатке рибозы адениновой части молекулы (см. рис.5).

**Коферменты ФАД, ФМН.** Важная роль в клетке отводится флавиновым коферментам, имеющим химическую структуру, представленную на рис. 9.

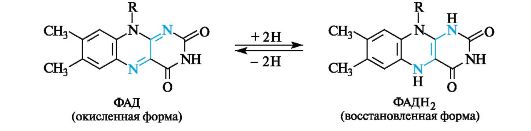




Рибофлавин (витамин В2)

Рис. 9. Структура флавиновых соединений

Известны два типа флавиновых коферментов: флавинмонуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). Считается, что основная функция флавиновых коферментов - это их участие в ферментативных окислительно- восстановительных реакциях, в которых флавины связывают одно- и двухэлектронные системы и цитохромы в дыхательной цепи. Предшественником обоих коферментов является рибофлавин (витамин B2). Участие ФАД в окислительно-восстановительных процессах связано с восстановлением изоаллоксазинового кольца, согласно схеме



Считают, что реакция восстановления ФАД протекает в две стадии. В результате переноса е- на ФАД образуется семихиион (свободный радикал), который затем присоединяет второй электрон, переходя в восстановленную форму кофермента. Эквимолекулярная смесь окисленной и восстановленной форм флавинов образует радикалы

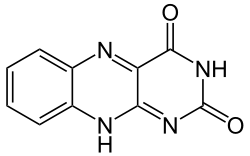
ФАД+ + ФАДН·Н ↔ 2ФАДН.

Доля образования радикалов минимальна при нейтральном значении pH. Константа (К) образования радикала для 3-алкилфлавина равна 2,3·10-2, а для рибофлавина - 1,5·10-2. Используя эти значения констант и рКа различных, форм кофермента можно определить равновесную концентрацию радикалов при любом значении pH. В таблице 2 приводятся значения рКа, а также другие характеристики окисленной, полувосстановленной и восстановленной форм флавинов.

Таблица 2. Характеристики окисленной, полувосстановленной и восстановленной форм флавинов (F.Muller)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Окисленный флавин | Полувосстановленный | Семихинон | Восстановленный  дегидрофлавин |
|  | | | |
| Желтый  λ = 450 нм  рКа =0; рКа =10; | Катион радикал: красный  λ = 490 нм  рКа =2,3 | Радикал нейтральный: синий  λ = 560 нм  рКа =8,3-8,6 | Анион-радикал: красный  λ = 477 нм  рКа =6,2 и < 0 |

Молекула ФАД имеет две гетероциклические системы, соединенные гибкой пирофосфатной цепью (рис. 9), благодаря которой в водных растворах изоаллоксазиновый и адениновый нуклеотиды располагаются друг над другом, вследствие чего происходит гашение флюоресценции кофермента. Наблюдаемое сильное гашение флюоресценции в ФАД дало основание предположить образование комплекса с переносом заряда (КПЗ) между аденином и изоаллоксазином. Однако вопрос об образовании КПЗ между двумя нуклеотидами кофермента ФАД не нашел окончательного решения. Сомнения вызывает появление сигналов адениновых протонов в ЯМР-спектре ФАД в более сильном поле, чем у АМФ, в то время как образование КПЗ должно характеризоватъся появлением сигналов в слабом поле. Считают, что существование комплекса в ФАД с параллельным расположением циклов объясняется гидрофобным взаимодействием нуклеотидов. Строение комплекса аде­нина с изоаллоксазином может быть представлено следующим образом:



Окисленные формы ФАД и ФМН имеют полосу поглощения с максимумом при 450 нм, в то время как для восстановленных форм коферментов она отсутствует. Следует отметить, что адениновый нуклеотид ФАД не принимает участия в ферментативном акте, однако он играет важную роль в формировании необходимой конформации кофактора при его расположении в коферментной щели апоферментов.

**3.3. Структура НАД и НАД(Ф)-зависимых ферментов**

К оксидоредуктазам относится группа ферментов, контролирующая окислительно-восстановительные процессы, связанные с дыханием и брожением. Оксидоредуктазы включают ферменты трех групп: 1) оксидазы катализируют перенос атомов водорода или электронов с субстрата на кислород. При переносе одного, двух, четырех электронов образуются соответственно суперперекисный анион (О2-), перекись водорода, вода; 2) оксигеназы катализируют присоеди­нение одного или двух атомов кислорода к молекуле субстрата. В первом случае фермент относят к монооксигеназам, во втором биокатализаторы называют диоксигеназами; 3) дегидрогеназы катализируют реакцию, дегидрирования субстратов и используют в качестве кофакторов пиридинуклеотиды или флавиннуклеотиды, в связи с этим различают два типа дегидрогеназ. Реакции дегидрирования играют важную роль в процессах митохондриального окисления, сопряженного с фосфорилированием. Дегидрогеназы имеют различные окис­лительно-восстановительные потенциалы в соответствии с природой используемых ими субстратов.

Одной из наиболее изученных в структурном и физико­-химическом отношениях оксидоредуктазой является НАД-зависимая алкогольдегидрогеназа (АДГ) (КФ 1.1.1.1) Поэтому этот фермент представляет наибольший интерес как модель для исследований в области ферментной инженерии, где тре­буются глубокие знания тонкой структуры изучаемых объектов. В больших количествах АДГ содер­жится в дрожжах, в печени различных млекопитающих, в зернах высших растений и в некоторых других источниках. В метаболитических процессах, происходящих в при­роде, АДГ обратимо катализирует ряд окислительно-восстановительных процессов, в том числе окисление спиртов в альдегиды (кетоны) по следующей схеме:

АДГ

Спирт НАДН·Н

Альдегид (кетон) НАД+

В клетках АДГ участвует в превра­щении пировиноградной кислоты в этиловый спирт. Процесс начинается с образования ацетальдегида, протека­ющего под действием пируватдекарбоксилазы:

- СО2

СН3СОСООН СН3СНО**.**

Считают также, что фермент участвует в окислении спиртов, образующихся бактериологически в кишечном трак­те. Однако более детально физиологическая роль АДГ в организме не установлена. Выделенный из различного исходного сырья фермент АДГ отличается по своему составу и свойствам. Например, фермент из печени лошади имеет молекулярную массу 84000 дальтон, имеет два каталитических центра и состоит из двух субъединиц (рис.10). Молекула АДГ дрожжей имеет молекулярную массу 150000 дальтон, содержит четыре независимых каталитических центра и состоит из четырех субъединиц.

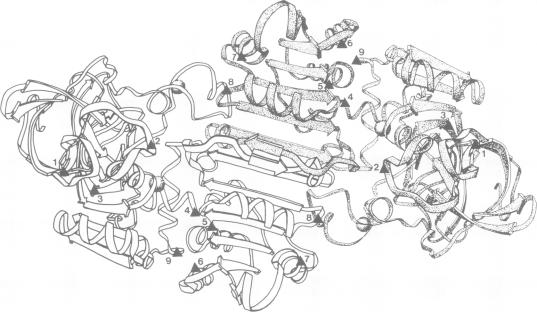


Рис. 10. Пространственная структура фермента АДГ из печени лошади

АДГ из дрожжей проявляет активность приблизительно в 100 раз выше фермента, выделенного из печени млекопитающих. В тканях бактерий и высших животных организмов обнаружено по два-три и более изоферментов АДГ, отличающихся по аминокислотному составу, последовательности расположения аминокислот, по отношению к ингибиторам, по термостабильности и другим свойствам. Соотношение различных изоферментов в организме изменяете в зависимости от его физиологического и патологического состояния. Были обнаружены 12 изоферментов АДГ, выделенных из печени лошади, семь из них были идентифицированы. Для трех основных изоферментов была характерна комбинация из двух форм субъединиц А и В: АА, АВ и ВВ (в ряде литературных источников приняты другие обозначения - ЕЕ, ES и SS). Для остальных ферментов характерны конформационные вариации этих двух форм, обусловливающих изомерность белка. Структуры субъединиц А (этанолактивная) и В (стероидактивная) подобны, но отличаются шестью аминокислотными остатками. Каждая из субъединиц, образующих изоэнзим АА АДГ печени лошади, содержит 374 аминокислотных остатка.

Субъединица белка включает два атома цинка, один из которых образует хелатный комплекс и формирует третичную структуру субъединицы. Другой

Остаток, N 17 94 101 110 115 366

А Цепь Glu Thr Arg Phe Asp Gly

В Цепь Gln Ile Ser Leu (Ser)\* Lys

\*Возможно отсутствие этого звена

атом цинка входит в активный центр и участвует в ферментативном акте. Субъединицы АДГ имеют по одному каталити­ческому центру. H.Eklund с соавторами, методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,24 нм опре­делили конформацию полипептидной цепи фермента. Было установлено, что фермент представляет эллипсоид размером 4,5х5,5х11,0 нм. Каждая субъединица фермента разделена глубокой активационной щелью, на дне гидрофобного кармана которой (2,0 нм от поверхности молекулы) находится атом цинка. По конфигурации и размерам активационная щель со­ответствует коферменту. Аминокислотные остатки от 176 до 318 формируют домейн, ответственый за связывание НАД. Каталитический домейн включает три непараллельные полипептидные цепи, образующие β – структуру. Cys46, His64, Cys174, входящие в кофермент-связывающую область, являются лигандами атома цинка, обладающего ка­талитическими свойствами. Четвертое координационное место занимается молекулой воды или гидроксильным ионом в за­висимости от pH среды. Молекула воды стабилизируется в ферментной системе при помощи водородных связей, которые устанавливаются с остатками Ser 48 и His 51. Эти связи имеют существенное значение в механизмах каталитических реакций.

Таким образом, на основании данных структурных по­следований было установлено, что каталитический домейн построен из аминокислотных остатков 1-174 и 319-374; он включает три главные области складчатой структуры βI, βII и βIII. Нити этих складок в основном антипараллельны. В четырех α-спиральных участках содержится до 19% аминокислотных остатков, а в β-структурных участ­ках, образующих три «складчатых листа», - около 32%. По­лярными группами вблизи каталитического центра являются Ser 48 и Tyr 178. Лигандами второго «некаталитического» атома цинка, входящего в состав субъединицы, являются четыре остатка цистеина: 97, 100, 103 и 111.

Изучение последовательности расположения аминокислот и их пространственной структуры в ферментах АДГ печени человека и лошади, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) собаки, а также D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (D-Г-3-Ф-ДГ) кальмара, свиньи и дрожжей привело к выводу о существовании трехмерной гомологии для НАД-зависимых дегидрогеназ. Было установлено точное структурное соответствие в полипептидной укладке аминокислотных остатков, образующих шесть нитей параллельно-слоистой складчатой структуры ферментов. Была найдена аналогия не только в слоисто-складчатой структуре, но и в большинстве спиралевых и петлевых участках ферментов, углах изломов пептидной цепи, близких для сравниваемых дегидрогеназ. Но наибольшее сходство отмечено для НАД-связываюших областей, что обусловливает аналогичность способов фиксации кофактора в кофермент-связывающем кармане. Таким образом, структурное подобие реакционных областей различных дегидрогеназ является достаточно строгим, что необходимо для образования фермент-кофакторного комплекса, закрепленного в процессе эволюции жизни на земле. Нужно отметить, однако, что, несмотря на полное соответствие трехмерной структуры НАД-зависимых ферментов, в последовательности расположения аминокислотных звеньев в цепи не было такого сходства. В качестве точки отсчета для сравнения слоисто-складчатой структуры ферментов M.G.Rossmаnn выбирал аминокислоты, находящиеся в структурно-эквивалентных положениях. Например, было обнару­жено, что глицин-199 в АДГ, глицин-28 в ЛДГ и глицин-7 в D-Г-3-Ф-ДГ находятся в структурно-эквивалентных положениях на конце нити βА.

Наличие трехмерной гомологии белков в кофермент-связывающей области объясняют общим их биологическим происхождением. Наблюдаемые отличия в аминокислотной последовательности следует, видимо, связывать с различиями в условиях их эволюции. Примерно было оценено время эволюции ферментов ЛДГ и D-Г-3-Ф-ДГ - оно прибли­зительно соответствует 3·109 лет. В генетическом аспекте предложена гипотеза, заключающаяся в том, что конформационная гомологичностъ структуры кофермент-связывающих областей различных НАД-зависимых дегидрогеназ определяется одним видом гена, в то время как для субстратсвязующих областей ферментов имеется множество отличающихся генов, характерных для каждого из ферментов.

Было предложено несколько механизмов каталитического действия АДГ. Исходя из структурных данных, считают, что более правильным механизмом окисления спирта является электрофильный катализ Теорелла (рис.11). Кофермент присоединяется к апоферменту в открытой конформации. Остатки АМР и никотинамида кофермента связываются в гидрофобных карманах, пирофосфатная часть расположена возле Ile 269 и образует со­левой мостик с Arg 47 боковой цепи белка. Кроме этого, кофермент соединяется с

а) ЕZn2+(H2O) + HAД+ ↔ EZn2+(OH)HAД+ + H+;

НАД+ НАД+ НАДH НАДH

-H2O

+H2O

б) Е + RCH2OH E E E + RCHO

Zn+OH Zn+OCH2R Zn2+OCHR Zn2+H2O

Рис.11. Механизм электрофильного катализа по Theorell

апоферментом за счет водородной связи между 02' рибозы и Asp223 и между амидной группой никотинамида и Thr178. Никотинамидный остаток располагается на расстоянии 0,45 нм от атома цинка (Zn), суб­страт связывается непосредственно с Zn по атому кислорода. При этом С1-атом субстрата располагается на расстоянии 0,35 нм от С4 атома никотинового кольца. В предложенном механизме (рис.11) молекула воды, связанная с Zn в фермент-кофакторном комплексе играет основную роль в катализе. Взаимодействие полученной таким образом, ферментативной системы со спиртом сопровождается образованием алкоголятиона. При этом выделяется молекула воды, сформированная из гидроксила каталитического комп­лекса и протона спирта. Под действием атома Zn в спир­товом остатке происходит перегруппировка атомов с отщеп­лением молекулы альдегида. Исследовав структурные раз­личия между апо- и холоферментом АДГ из печени лошади. H.Еklund и C.-I.Branden пришли к выводу, что при образовании комплекса с НАДН два кофермент-связывающих участка, образующих центр ди­мерной молекулы, сохраняют свою конформацию и ориента­цию внутри молекулы, тогда как каталитические участки поворачиваются относительно центра молекулы и щель между этими участками становится уже. При этом активный центр экранируется от раствора за счет трех факторов: поворота каталитических участков, смещения «петли» из остатков 53-57 и связывания кофермента и субстрата.

Как и большинство ферментов класса оксидоредуктаз, АДГ обнаруживает высокую каталитическую специфичность к коферменту НАД и пониженную - по отношению к другим субстратам, например, спирту и другим; карбонилсодержащим соединениям, причем влияние природы и строения боковой цепи спирта незначительно. Было исследовано окисление большой группы спиртовых субстратов: первичных алифатических спиртов, бензилового, коричного спиртов, а также перекиси водорода (таблица 3).

Таблица 3. Субстратная специфичность АДГ печени лошади

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Окисление в NаОН-глициновом буфере, рН 9,5-10,05 | | |
| Субстрат | Скорость мкМ·с-1 | Км (М) |
| н-Пропанол | 3,49-146 | 2,3 · 10-4 |
| Этанол | 9,47-135 | 0,53-2,4· 10-3 |
| д-Бутанол | 11,6 -215 | 2,2·10-4 |
| Аллиловый спирт | 192 | 4,1 ·10-4 |
| Фурфуриловый спирт | 108 | 1,4·10-4 |
| Бензиновый спирт | 118 | - |
| Циклогексанол | 13,4-135 | 1,3-1,6· 10-3 |
| 4-Метилциклогексанол | 13,1 | - |
| 3-Метилциклогексанол | 2,1 | - |
| 2-Метилциклогексанол | 1,19 | - |
| 4-Третбутилциклогексанол | 4,25 | - |
| Циклогептанол | 6,54 | - |
| н-Пентанол | 3,20 | - |
| н-Гексанол | 2,80-170 | - |
| н-Г ептанол | 2,4 | - |
| н-Октанол | 2,0-135 | - |
| Изоамиловый спирт | 167 | - |
| 3-Гексанол | 35 | - |
| 3-Фенил-1-пропанол | 46 | - |
| Метилциклогексанол | 108 | - |
| Восстановление в фосфатном буферном растворе рН 6,95-7,2 | | |
| Формальдегид | 7 | 8· 10-3 |
| Ацетальдегид | 30-68,2 | 1,6-2,4 · 10-4 |
| н-Б утиральдегид | 510 | - |
| Изовалерианальдегид | 208 | - |
| Фурфураль | 236 | 7,7 · 10-4 |
| Бензальдегид | 55 | - |
| Циклогексанон | 5,0-8,52 | 1,9· 10-3 |
| 4-Метилциклогексанол | 6,84 | - |
| 3-Метилциклогексанол | 3,05 | - |
| 2-Метилциклогексанол | 3,86 | - |
| 2-Хлорциклогексанон | 4,23 | - |
| Циклогептанон | 3,52 | - |

Изучалось также восстановление альдегидов в присутст­вии фермента - алкогольдегидрогеназы печени лошади. Иссле­дованы некоторые альдегиды алифатического ряда, бензальдегид и β-нафгальдегид, фенилметаналь, 3-фенил-2-пропен-1-аль, а также n-нитрозо-N,N-диметиланилин. Установлено, что высшие спирты и альдегиды являются лучшими субстратами. Это объясняют образованием ими более плотного комплекса АДГ-НАД+- спирт или АДГ-НАДН-альдегид, либо тем, что скорость перехода гидридного иона в тройном комплексе увеличивается с длиной цепи. В случае вторичных спиртов или альдегидов скорость пере­хода гидрида замедлена, что служит причиной их незначи­тельной субстратной специфичности. Значительную избира­тельность ферментов в различных реакциях связывают не только со специфичностью структуры каталитических центров, но и с существованием в макромолекуле белка адсорбционных участков, способст­вующих селективному проникновению молекул субстратов к активному центру.

Существенно влияет на активность ферментов и их устойчивость pH растворов. Установлено, что при pH менее 5,9 фермент АДГ инактивируется, при рН более 10,0 происходит потеря иона Zn+2, что также влечет из­менения в функционировании фермента. Активность АА изоформы АДГ с увеличением pH возрастает до максималь­ного значения, соответствующего pH 10,3. Однако имеются более ранние данные, в которых считают, что оп­тимальная активность АДГ проявляется при рН, равном 7,6.

Представляют интерес работы, связанные с химической модификацией фермента, а также с различными способами его обработки, сопровождающейся увеличе­нием естественной ферментативной активности.

Методом изоэлектрического фокусирования определены изоэлектрические точки для изоферментов типа АA (pI=8,7+0,01), АВ (pI=9,29) и ВВ (pI=10,00). Осталь­ные обнаруженные изоферменты имели электронейтральное состояние в диапазоне pH 8,08-8,51.

Исследования НАД-зависимых оксидоредуктаз, в част­ности АДГ, показали, что транспорт водорода в системах обладает абсолютной стереоспецифичностью. С учетом этого был сделан вывод об упорядоченном многоточечном взаимо­действии апофермента с субстратом и коферментом в ката­литическом центре. При этом предполагается образование дискретных химических промежуточных соединений. Основные стадии окислительно-восстановительных реакций, катализируемых НАД-зазисимыми оксидоредуктазами, в общем случае могут быть описаны кинетической схемой:

ECox  ECred

K1Cox K-1 K-3 K3Sred K6 K-6Sox K-8Cred K8

K5

E ECoxSred ECredSox E (1)

K-5

K-2 K2Sred K4Cox K-4 K-7Cred K7 K9 K-9Sox

ECred  ECox

где Сox, Сred и Sox, Sred - окисленная и восстановленная формы НАД и субстрата, соответственно

При образовании тройного промежуточного комплекса для НАД-зависимых ферментов присоединение субстрата и кофермента к молекуле апофермента может иметь упорядоченный или неупорядоченный характер в зависимости от величин констант скоростей элементарных стадий для данного фермента и конкретных условий осуществления каталитического процесса. Установлено, что кинетические превращения тройных комплексов для АДГ из печени лошади совершаются быстро, хотя и отмечается замедленная, по сравнению, с субстратом и продуктами ферментативней реакции диссоциация кофермента из таких комплексов. Константы К5 и К-5 велики, а К7 и К8 (для обратной реакции К-1 и К-4) относительно малы. Таким образом, кинетика прямой реакции при избытке субстрата определяется диссоциацией ЕСred и кинетический механизм может быть записан в упрощен­ном виде.

E + Cred ECred,

ECred + Sox ECox + Sred, (2)

ECox E + Cox.

В случае АДГ дрожжей схема (2) неприемлема ввиду того, что процесс лимитируется взаимопревращением тройных комплексов. В этом случае необходимо рассматривать полную схему катализа (1). Работы последних лет по исследованию механизма дей­ствия АДГ показали, что классичес­кая схема реакции (1) должна быть дополнена стадиями взаимодействия фермента с субстратом, приводящим к обра­зованию каталитически неактивных фермент-субстратных комплексов. Эти взаимодействия отчетливо проявляются только при большом избытке субстрата. Полный кинетический механизм для АДГ печени лошади с учетом этих стадий, описываются схемой (3).

ECredSred

K9 K-9Sred

K-8Cred \*(ESred)

K10Cox K-10

\*(ECoxSred) (3)

ECred  K11

K1Cred K-1 K-3  K3Sox

K6

K5

E ECoxSred ECredSox ECred E

K-6Cred

K-5Sox

K-2 K2Sox K4Cred K-4

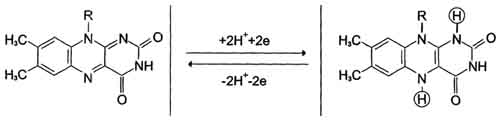
ECox

**3.4. Флавопротеины**

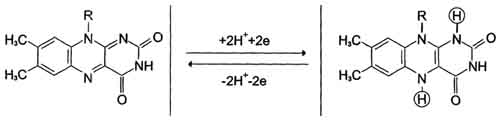
Флавиновые ферменты, зависимые от ФАД и ФМН, как и большинство холоферментов, характеризуются нековалентной природой связи между белком и коферментом. Было установлено, что выделение коферментов в мягких условиях не нарушает конформационной структуры апоферментов. Добавление коферментов к апоферментам обеспечивает практически полное восстановление ферментативной активности. Наряду с этим, в литературе приводятся данные о значительном изменении в структуре глюкозооксидазы при отщеплении кофермента ФАД. Последний вывод делается на основании изменения констант седиментации холо- и апоферментов глюкозооксидазы. Отмечается полное восстановление конформационной структуры фермента при добавлении ФАД. Предполагается, что для флавопроте­идов характерно вандерваальсовое или водородное связывание кофермента в активном центре биокатализаторов. При этом не исключается образование комплекса с переносом заряда. Важная роль в связывании коферментов с белком придается отрицательно заряженным группам остатков фосфорном кислоты, которые обеспечивают электростатическое связывание с положительно заряженными группами активного центра флавопротеинов. Не менее важное место в связывании и функционировании ФАД в биокатализаторах отводят адениновому и диметилизоаллоксазиновому нуклеотидам ко­фермента. Отсутствие каких-либо из перечисленных выше тpёx составных частей в молекуле ФАД (диметилизоаллоксазина, аденина или пирофосфатной цепи) приводит к деста­билизации фермент-кофакторного комплекса. Образование комплекса апофермента с молекулой ФАД протекает по двух­стадийной схеме: апофермент + ФАД ↔ апофермент - ФАД ↔ холофермент - ФАД. Первая стадия характе­ризуется константой скорости 105 – 106 м-1 · мин-1 и приводит к образованию неактивного и малоактивного фер­ментного комплекса. Вторая, более медленная стадия имеет константу скорости 0,2 мин-1 и сопровождается образова­нием активной фермент-кофакторной системы. Наличие слож­ного, многоточечного характера связывания нуклеотидов ко­фермента ФАД в активных центрах биокатализаторов под­тверждается уменьшением флюоресценции и изменением оп­тических свойств компонентов ферментативного комплекса. В настоящее время имеются более детальные сведения о способе связывания ФАД в ферментах, в частности в глутатионредуктазе (КФ 1.6.4.2). Показано, что этот фер­мент представляет собой димер с молекулярной массой 104 800 и содержит по молекуле ФАД на каждую субъеди­ницу. Флавиновый нуклеотид ФАД находится в окружении аминокислотных остатков четырех различных областей одной субъединицы и С-концевой области другой. Сравнение окружения изоаллоксазина ФАД в глутатионредуктазе и n-гидроксибензоатгидроксилазе обнаруживает общие черты, что также, как и в случае НАД(Ф)-зависимых ферментов, свидетельствует об эволюционной связи различных ФАД-связы­вающих ферментов.

Имеются сведения о возможности ковалентного связы­вания кофермента ФАД в активном центре биокатализаторов. Было отмечено, что кофермент связывается с сукцинатдегидрогеназой эфирной связью с участием в ней восьмого углеродного атома диметилизоаллоксазинового цикла. Кроме сукцинатдегидрогеназы аналогичный тип химической связи кофермента с апоферментами был обнаружен в (N-метилглицин)-дегидрогеназе, 6-оксиникотиноксидазе. В монооксидазе печени ФАД связан через 8-й углеродный атом с атомом серы остатка цистеина. Ковалентное связывание кофермента с белками было установлено для цитохрома C552 Chromatium и цитохрома b-редуктазы.

Приведем два наиболее распространенных механизма окисления спиртов, аминов, кетонов, восстановленных пиридиннуклеотидов флавиновыми дегидрогеназами. По первому механизму происходит прямой перенос водорода, гид­рид-ион присоединяется в положение 5, а протон – в положение 1:



По второму – восстановленный субстрат присоединяется к флавину, затем с образование восстановленного флавина и окисленного субстрата формирует новую связь:



Субст-рат (ох)

Субст- рат (red)

Оксидоредуктазы

Окисленный ФАД

или ФМН

Восстановленный ФАД или ФМН

Окисленный ФАД

или ФМН

Ниже приводятся некоторые схемы реакций, катализируемых флавопротеидами:

Флавопротеид

1. НАД·Н ФАД Восстановленный субстрат

(НАДФН·Н) (ФМН+) Н2О

(4)

НАД+ ФАД·Н О2

НАДФ+ ФМН·Н Окисленный субстрат

1. NH2 Оксидазы аминокислот

R - CH R – C – COOH + NH3 (5)

COOH

**3.5. Углеводы**

Углеводы разделяют на две группы: простые углеводы (моносахариды, или монозы) и сложные углеводы (полисахариды, или полиозы) (рис.12). Углеводы,

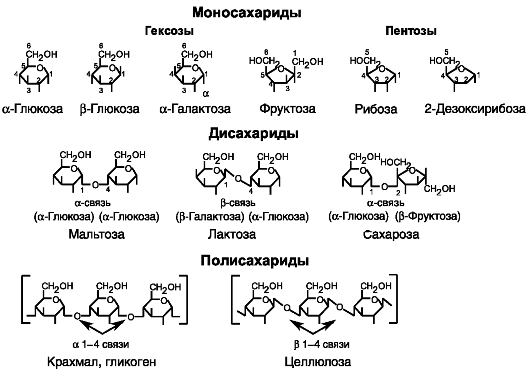


Рис.12. Структурные формулы некоторых углеводов

или сахариды, имеют общую формулу (СН2O)n, являются альдегидоспиртами или кетоспиртами. Моносахариды, или простые сахара, чаще всего состоят из пяти (пентозы) или шести (гексозы) атомов углерода и имеют, соответственно, формулы (СН2O)5 и (СН2O)6. Простые углеводы не подвергаются гидролизу с образованием других, еще более простых углеводов. Если моносахариды содержат альдегидную группу, то они относятся к классу альдоз (альдегидоспиртов), если кетонную – к классу кетоз (кетоноспиртов).

Наиболее распространенным простым сахаром является шести углеродный сахар глюкоза, это исходный мономер из которого построены многие полисахариды. D-глюкоза (виноградный сахар) – кристаллическое белое вещество, хорошо растворимое в воде, температура плавления равна 146°С. Глюкоза примерно в два раза уступает сахарозе по сладости. Полимеры глюкозы, прежде всего целлюлоза и крахмал, составляют значительную часть общей биомассы; в свободном виде D-глюкоза присутствует во фруктовых соках (виноградный сахар), меде, плазме крови человека и животных. В промышленности глюкозу получают из крахмала, кипячением с серной кислотой, а также при кислотном гидролизе целлюлозы. Этот процесс называется «осахаривание». Глюкозу, полученную при гидролизе целлюлозы, используют для производства этилового спирта (так называемый гидролизный спирт). Глюкоза является главным источником энергии в клетке.

D-галактоза – кристаллическое вещество, составная часть молочного сахара, важнейшего компонента пищевого рациона. Достаточно хорошо растворяется в воде, сладкое на вкус, температура плавления равна 165°С. Наряду с D-маннозой этот моносахарид входит в состав многих гликолипидов и гликопротеинов.

D-фруктоза (фруктовый сахар) – кристаллическое вещество с температурой плавления 132°С. Хорошо растворима в воде, сладкая на вкус. Сладость превосходит сладость сахарозы в два раза, является левовращающим моносахаридом (значение удельного угла вращения в равновесном состоянии равно -92°). В свободной форме содержится во фруктовых соках (фруктовый сахар) и меде. В связанной форме фруктоза присутствует в сахарозе и растительных полисахаридах (например, в инулине).

В молекуле дисахаридов объединены два простых сахара. Наиболее известными представителями дисахаридов является сахароза или пищевой сахар, молекула которого состоит из молекул глюкозы и фруктозы. Сахароза (тростниковый сахар) служит растворимым резервным сахаридом растений. В больших количествах сахароза содержится в сахарной свекле, сахарном тростнике и кленовом соке, из которых ее получают в промышленности. Сахароза является наиболее известным дисахаридом, т.к. чрезвычайно широко используется в пищевой промышленности и в домашнем питании.

Мальтоза, или солодовый сахар (от лат. maltum – солод), является продуктом неполного гидролиза крахмала. Образуется под влиянием ферментов, содержащихся в солоде. Изомальтоза – входит в состав амилопектиновой фракции крахмала и гликогена.

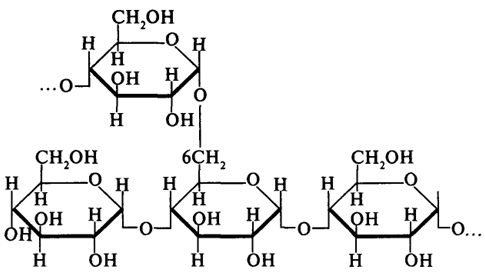
Лактоза (молочный сахар) в значительных количествах находится в молоке, выполняет важную роль для растущих организмов животных и человека. В коровьем молоке содержится до 4,5% лактозы, в женском молоке – до 7,5%. При гидролизе, например, в кишечнике во время переваривания пищи, лактоза распадается на α-D-глюкозу и β-D-галактозу.

Сложные углеводы или полисахариды при гидролизе распадаются на молекулы простых углеводов. Сложные углеводы, в свою очередь, делятся на олиго – и полисахариды. Олигосахариды – это низкомолекулярные сложные углеводы, растворимые в воде и сладкие на вкус. Полисахариды – это высокомолекулярные углеводы, образованные более чем из 20 остатков моносахаридов, не растворимые в воде и не сладкие на вкус. В зависимости от состава, сложные углеводы можно разделить на две группы:

1) гомополисахариды, состоят из остатков одного и того же моносахарида;

2) гетерополисахариды, состоят из остатков различных моносахаридов.

Молекулы полисахаридов представляют собой длинные цепи, построенные из многих моносахаридных единиц, причем цепи могут быть как линейными, так и разветвленными. Большинство полисахаридов содержат в качестве



разветвление

мономеров повторяющиеся единицы одного и того же вида или двух чередующихся видов.

В живой природе содержится огромное количество углеводов. Это связано в первую очередь с широким распространением двух полисахаридов: крахмала и целлюлозы. Крахмал содержится в больших количествах в растениях. Он является той формой полисахарида, в которой запасается топливо. Крахмал, широко распространенный резервный полисахарид растений, является наиболее важным углеводным компонентом пищевого рациона. Он содержится в хлоропластах листьев, плодах, семенах и клубнях. Наблюдается высокое содержание крахмала в зерновых культурах (до 75% от сухой массы), клубнях картофеля (примерно 65%) и других запасающих частях растений. Крахмал откладывается в форме микроскопических гранул в специальных органеллах – амилопластах. При продолжительном кипячении примерно 15-25% крахмала переходит в раствор в виде коллоида.

Целлюлоза является главным компонентом внеклеточных волокнистых и одревесневших растительных тканей. Молекулярная масса целлюлозы может составлять 1000000 и более. Природная целлюлоза обладает высокой механической прочностью, устойчива к химическому и ферментативному гидролизу. В пищеварительном тракте животных отсутствуют ферменты, способные расщеплять целлюлозу до мономеров. Однако эти ферменты имеются у бактерий, которые обитают в пищеварительном тракте некоторых животных, позволяя им использовать целлюлозу в качестве продукта питания.

Гликоген – запасающий полисахарид животных и человека. Цепочки гликогена, как и крахмала, построены из остатков α-D-глюкозы, связанных α-(1,4)-глюкозидными связями. Но ветвление гликогена более частое, в среднем приходится на каждые 8 – 12 остатков глюкозы. Вследствие этого гликоген представляет собой более компактную массу, чем крахмал. Особенно много гликогена содержится в печени, где его количество может достигать 7% от массы всего органа. В гепатоцитах гликоген находится в гранулах большого размера, которые представляют собой кластеры, состоящие из более мелких гранул, являющихся единичными молекулами гликогена и имеющих среднюю молекулярную массу несколько миллионов. Эти гранулы содержат также ферменты, способные катализировать реакции синтеза и реакции распада гликогена.

Полисахариды входят в состав жестких стенок растительных и бактериальных клеток, они являются также составным элементом более мягких оболочек клеток животных. Кроме того, в живых организмах широко распространены соединения углеводов с веществами других классов. Аминосахара – соединения углеводов с аминами (например, глюкозамин). Гликопротеины и протеогликаны – соединения углеводов с белками, гликолипиды – соединения углеводов с липидами. Наконец, нуклеиновые кислоты ДНК и РНК также представляют собой сложные молекулы, в состав которых входит углеводный компонент. Полисахариды из водорослей, например, агароза, применяются как желирующие вещества. Агарозы более 100 лет используются в микробиологии как гелевая основа питательных сред (агар-агар). Таким образом, углеводы выполняют в клетке две основные функции: энергетическую и строительную.

### 3.6. Липиды

Липиды представляют собой нерастворимые в воде органические соединения, входящие в состав клеток. Эти вещества могут быть экстрагированы (переведены в растворенное состояние) неполярными растворителями, такими, как хлороформ, бензол или эфир. Известно несколько классов липидов, однако, наиболее важную функцию в организме выполняют фосфолипиды, являющиеся эфирами трехатомного спирта глицерина и фосфорной кислоты. При образовании молекулы фосфолипида (рис.13) две

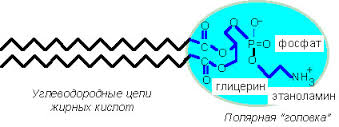


Рис. 13. Структура молекулы фосфолипида

гидроксильные группы глицерина взаимодействуют с высокомолекулярными жирными кислотами, содержащими 16-18 атомов углерода, а одна гидроксильная группа взаимодействует с фосфорной кислотой. Молекулы всех фосфолипидов содержат полярную голову и неполярный хвост, образованный двумя молекулами жирной кислоты (рис.14).

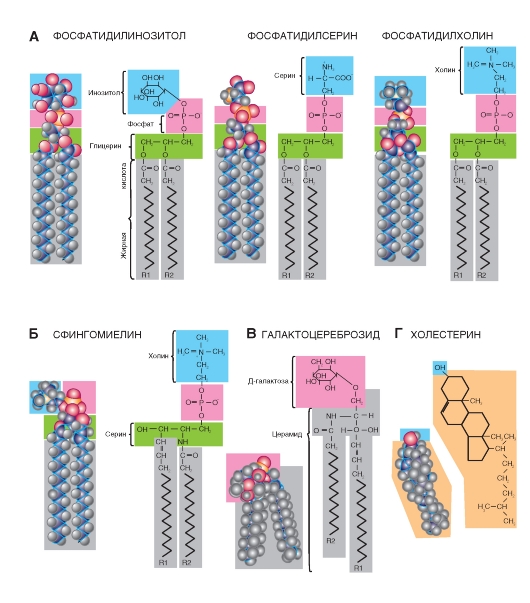


Рис.14. Химическая структура фосфолипидов, а также холестерина

На границе раздела масло-вода молекулы фосфолипидов ориентируются таким образом, что их полярные головы погружаются в воду, а гидрофобные хвосты — в масло. По поверхности воды фосфолипиды растекаются в виде монослоя, в котором жирно-кислотные хвосты ориентированы в сторону относительно гидрофобного воздуха, а заряженные головы направлены в сторону водной среды. Молекулы фосфолипидов способны формировать двумерные структуры, которые получили название липидного бислоя: бислой состоит из двух монослоев фосфолипидов, ориентированных относительно друг друга так, что гидрофобные хвосты располагаются внутри бислоя, а полярные головы направлены наружу (рис 15). Бислой характеризуется очень

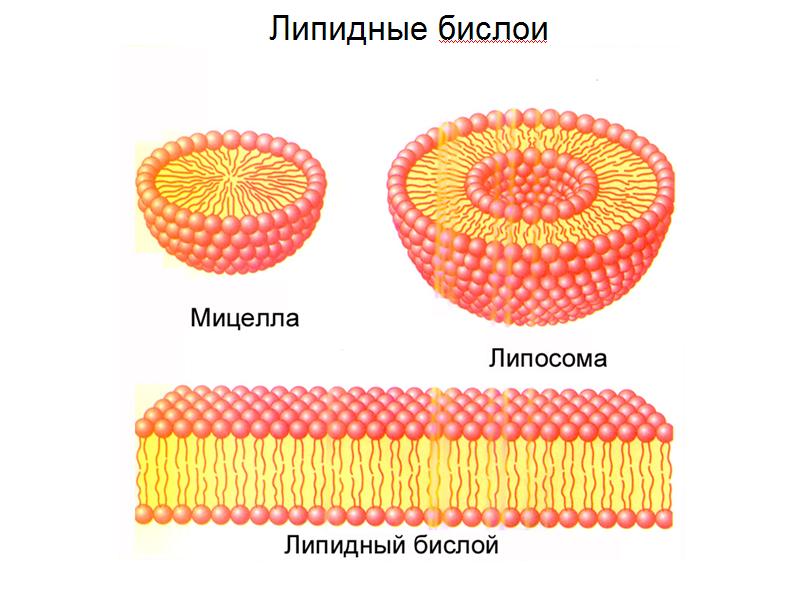


Рис.15. Структура бислойной липидной мембраны

высоким электрическим сопротивлением, состоят из фосфолипидов и являются важнейшим компонентом биологических мембран (БМ).

Для изучения мембранных свойств белков и моделирования различных ферментативных, транспортных и рецепторных функций клеточных бислойных мембран часто используют искусственные комплексы: протеолипосомы*,* а также белоксодержащие мицеллярные системы. Липосомы представляют собой концентрические замкнутые липидные бислои, внутренний объем, которых изолирован от внешней среды (рис.15). Мицеллы – это сферические частицы, образованные ассоциатами дифильных молекул ПАВ (рис.15).

Кроме того, липиды являются важным источником энергии. При полном превращении 1 г липидов в воду и углекислый газ, в клетке выделяется в 2 раза больше энергии, чем при таком же превращении углеводов. Накапливаемый в подкожной клетчатке жир является хорошим теплоизолирующим материалом. Также липиды являются источником воды, которая в значительных количествах выделяется при их окислении. Именно поэтому многие животные, запасающие жиры (например, верблюды во время переходов по пустыне, медведи, сурки, суслики во время спячки), могут длительное время обходиться без воды.

Некоторые вещества, относящиеся к липидам, обладают высокой биологической активностью: это ряд витаминов, например витамины А и B, а также некоторые стероидные гормоны. Важную функцию в организме животных выполняет холестерин, являющийся компонентом клеточных мембран, который стягивает углеводородные хвосты липидов, формируя более плотную структуру мембраны. Неправильный обмен холестерина у людей приводит к возникновению атеросклероза — заболевания, при котором холестерин откладывается в виде бляшек на стенках кровеносных сосудов, сужая их просвет. Это приводит к нарушению кровоснабжения органов и является причиной тяжелых сердечнососудистых заболеваний, таких как инсульт или инфаркт миокарда.

**3.7. Надмолекулярные комплексы**

Белки, как правило, функционируют в составе надмолекулярных комплексов, которые являются основой молекулярной организации биологических систем (рис.16). Надмолекулярные структуры играют важную роль во многих биохимических процессах. Каталитическая активность и стабильность ферментов происходит посредством образования надмолекулярных структур, включающих вещества различной природы. **Комплексы белков с углеводами**. Углеводсвязывающие белки называются лектинами. В настоящие время известно несколько сот лектинов, среди которых наиболее изучены растительные. Лектины не проявляют каталитической активности, их основной функцией является способность узнавать и связывать углеводные остатки. Различают два типа лектинов: интегральные (мембранные) и растворимые. Специфическое взаимодействие белков с гликолипидами или гликопротеинами цитоплазматической мембраны клеток лежит в основе механизма клеточного узнавания. Обычно лектины

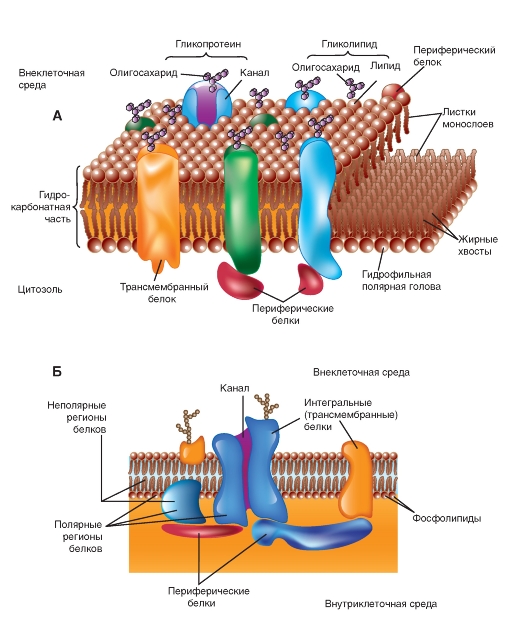


Рис.16. Структура бислойной липидной мембраны, содержащей

белковые молекулы

состоят из двух или более субъединиц. Как правило, каждая субъединица содержит один углеводсвязывающий центр, такие центры эквивалентны и проявляют одинаковую специфичность.

**Комплексы белков с липидами.** Липопротеиновые комплексы (ЛПК) образуются за счет липофильных и электростатических взаимодействий между липидами и специфическими белками. ЛПК разделяют на свободные или растворимые в воде (плазма крови, молоко, желток яиц и др.) и нерастворимые – структурные ЛПК клеточных мембран и хлоропластов растений. Свободные ЛПКиграют важную роль в метаболизме и транспорте липидов. Различные комбинации липидов и протеинов образуют ЛПК различной плотности. Белковые компоненты ЛПК действуют как сигнальные молекулы, индуцирующие связывание ЛПК с клеточными рецепторами и регулирующие активность ферментов, действующих на ЛПК, структурные ЛПКвходят в состав БМ. Соотношение липиды: белки (по массе) в биологических мембранах изменяется от 4:1 до 1:3. Основными липидными компонентами БМ являются фосфолипиды, гликолипиды и стерины. Распределение липидов и белков в мембранах неоднородно. Участки липидного бислоя c низким содержанием белка могут чередоваться с участками, характеризующимися высоким содержанием белка, в которых липиды располагаются в виде отдельных фрагментов между белковыми молекулами. Специфические взаимодействия между белками образуют белковые ассоциаты, которые окружены липидами определенного типа.

Мембранные белкиучаствуют в рецепции гормональных и антигенных сигналов, выполняют транспортные функции, служат катализаторами процессов, протекающих в мембранах и на их поверхности. Мембранные белки делятся на интегральные и периферические (поверхностные). Последние сравнительно слабо связаны с мембраной и способны отделяться от нее в мягких условиях, например, при увеличении йонной силы раствора. Периферические белки по своим свойствам существенно не отличаются от обычных водорастворимых белков. Интегральные белки прочно связаны с мембраной, плохо растворимы в воде и склонны к образованию ассоциатов. Структурной особенностью интегральных белков является наличие в их полипептидной цепи протяженных участков с преобладающим содержанием неполярных аминокислот. Как правило, эти участки имеют конформацию α-спирали, на внешней стороне которой расположены боковые неполярные группы аминокислотных остатков, в результате чего вся спираль приобретает гидрофобный характер. Доля α-спиральных участков в мембранных белках высока (30–50%), остальная часть полипептидной цепи находится преимущественно в форме неупорядоченного клубка.

**Белок–белковые комплексы** разделяют на гомосубъединичные (или олигомерные белки) и гетеросубъединичные (или сложные белки). Среди белков первого типа наиболее распространены димеры, тетрамеры и октамеры. В водных растворах крайне сложно разделить олигомерные белки на мономеры, сохранив при этом их нативную структуру. Для целого ряда олигомерных ферментов было найдено, что в системах обращенных мицелл можно в мягких условиях осуществить диссоциацию комплексов. В зависимости от степени гидратации в мицеллах образуются различные олигомерные формы белков. Каждой функциональной форме фермента в системе обращенных мицелл отвечает свой максимум на кривой зависимости каталитической активности от степени гидратации. Использование системы обращенных мицелл представляется возможность конструировать различные гомо- и гетеросубъединичные белковые комплексы, изменяя при этом соотношение белков.

Более сложные гетерокомплексы образуются в мультиферментных системах, катализирующих цепи последовательных реакций. В таких системах субстрат и промежуточные соединения от начала до конца метаболического цикла не покидают комплекс. Различают три типа систем: мультиферментые комплексы (нековалентные ассоциаты белков), мультиферментные конъюгаты и мембрано-связанные мультиферментные системы. Примером мультиферментных комплексов являются динамические комплексы ферментов, которые способны связывать одни и те же метаболиты. В таких системах осуществляется прямая передача интермедиата от активного центра одного фермента к активному центру другого посредством образования тройного комплекса, содержащего оба фермента и метаболит. Было показано, что такой механизм прямой передачи интермедиата реализуется ферментами, участвующими в гликолизе. Примером мультиферментных комплексов и одновременно мультиферментных конъюгатов (в зависимости от источника) может служить комплекс синтеза жирных кислот (СЖК), состоящий из семи ферментов и катализирующий восемь реакций цикла биосинтеза жирных кислот. В случае позвоночных животных наблюдается полная интеграция ферментов в комплексе. СЖК представляет собой мультиферментный комплекс, состоящий из одной огромной полипептидной цепи (М.м. 240 кДа), содержащий семь активных центров, причем активная форма такой биокаталитической системы представляет димер с М.м. равной 480 кДа.

К наиболее организованным системам относятся метаболоны-мультиферментные системы, связанные с крупными надмолекулярными структурами, например, мембранами. Основное значение таких комплексов заключается в регуляции их функционирования как единого целого в зависимости от функционального состояния клетки. Важную роль в регуляции играет участок клеточной субструктуры на котором адсорбирован комплекс и через который могут поступать те или иные сигналы. Примерами метаболонов могут служить метаболон цикла трикорбоновых кислот, комплексы гликолитических и фосфорилирующих ферментов. Ферменты располагаются в мембране в определенном порядке, что делает возможным последовательное протекание реакций метаболического пути. Многие мультиферментные системы способны автоматически поддерживать требуемую скорость суммарной реакции. В таких системах конечный продукт последовательности реакций является ингибитором первого фермента. В результате этого скорость всего процесса определяется стационарной концентрацией конечного продукта.

**Комплексы белков с олигоаминами.** Многоточечное электростатическое взаимодействие с белком реализуется также при образовании комплексов с низкомолекулярными природными полиэлектролитами (ПЭ) – олигоаминами (ОА). Природные олигоамины играют существенную роль в регуляции процессов клеточного роста и дифференцирования клеток, биосинтеза белка, а также влияют на активность некоторых ферментов. ОА влияют на активность ферментов, нейтрализуя заряженные группы белка, что может приводить к конформационным изменениям. В ряде случаев активирующая роль ОА объясняется их действием не на фермент, а на конформацию высокомолекулярных белковых субстратов. Мультифункциональность биологической активности зависит от особенности структуры ОА. Заряды распределены по длине цепи, что определяет их способность связываться с участками макромолекул, находящимися на определенном расстоянии друг от друга. При взаимодействии с противоположно заряженными группами поверхности белка ОА, как и ПЭ, образуют комплексы, в которых конформация фермента стабилизирована. Эффективность стабилизации и активации фермента при комплексообразовании определяется числом молекул ОА, связанных с поверхностью. Предполагаемый механизм стабилизации – это фиксирование каталитически активной конформации фермента в результате электростатического взаимодействия с ОА и экранирование поверхности белка от прямого контакта с органическим растворителем. Данные о рассмотренных комплексах белков с высоко- и низкомолекулярными соединениями сведены в таблицу 4.

Таблица 4. Белоксодержащие комплексы, функции и

особенности структуры

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Комплексы с белками | Примеры комплексов | Функции | Примеры белков и особенности их структуры |
| Углеводы | Комплекс лектин-рецептор | Клеточное узнавание | Лектины: субъединичные белки, каждая субъединица содержит один углевод связывающий центр; высокое содержание β-структуры |
| Липиды | Липопротеины свободные структурные | Структурная, транспортная и рецепторная функции клетки | Интегральные белки: наличие протяженных участков с высоким содержанием неполярных аминокислот; содержание α-спиралей 30-50% |
| Белки  гомокомплексы  Гетерокомплексы | Субъединичные ферменты  Комплекс антиген-антитело  Мультиферментные системы (метаболоны) | Регуляция активности и стабильности ферментов  Иммунная система  Последовательное протекание реакций метаболического пути | Наиболее распространенные димерные и тетрамерные белки; сложно выделить в виде мономеров  Антитела: комплекс Y-или Т- образной формы, состоит из 4-х полипептидных цепей; содержит два Fab фрагмента (связывание антигенов) и Fс фрагмент (связывание с мембраной)  Цепи дыхательных и фосфорилирующих ферментов |
| Олигоэлектролиты |  | Регуляция активности и стабильности ферментов | АМФ-независимые протеинкиназы, аминоацил – тРНК-синтетазы, неспецифические белки, содержащие доступные СОО- - группы |

**3.8. Структура клеток**

Клетки являются основной формой жизни на Земле и по строению разделяются на два вида: прокариотические (доядерные) простые, которые появились раньше в процессе эволюции. [Эукариотические](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%83%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%82%D1%8B) (ядерные) клетки более сложные возникли позже, и сейчас образуют структуры клеток современного человека и животных. Несмотря на огромное многообразие форм жизни, организация клеток живых организмов построена на единых структурных принципах. Клетка отделена от окружающей среды плазматической мембраной, внутри клетка заполнена цитоплазмой, в которой размещены органеллы и клеточные включения согласно рис.17.

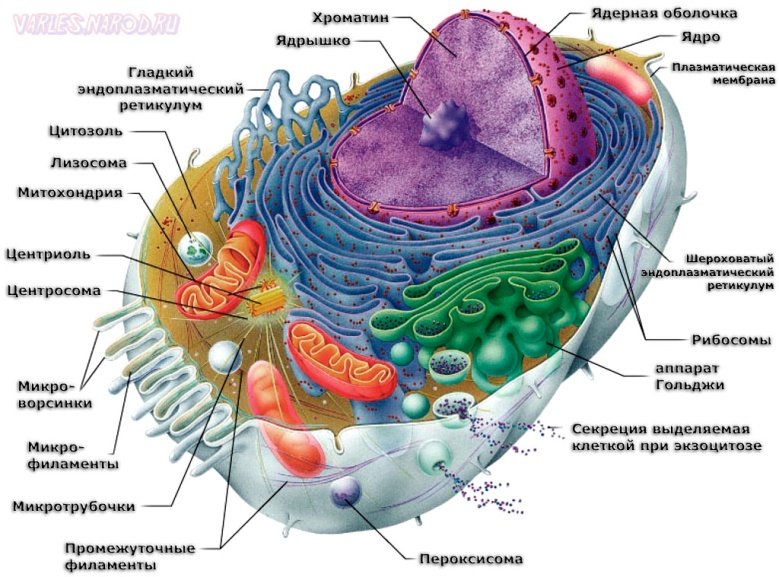


Рис.17. Структура [эукариотической](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%83%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%82%D1%8B) клетки

Каждый отдельный вид о[рганел](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9E%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B8%D0%B4)л клетки выполняет особую биологическую функцию, предназначенную только для неё, а в совокупности все они определяют жизненный цикл клетки в целом.

[Эукариоты](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%83%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%82%D1%8B) имеют клеточное  [ядро](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%BE%D0%B5_%D1%8F%D0%B4%D1%80%D0%BE), ограниченное от цитоплазмы ядерной оболочкой. В клетках эукариот имеется система внутренних мембран, образующих, помимо ядра, ряд других [органоидов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9E%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B8%D0%B4): митохондрии, лизосомы, пероксисомы, рибосомы,  [аппарат Гольджи](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BF%D0%BF%D0%B0%D1%80%D0%B0%D1%82_%D0%93%D0%BE%D0%BB%D1%8C%D0%B4%D0%B6%D0%B8), гладкий и шероховатый [эндоплазматический ретикулум](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BF%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F_%D1%81%D0%B5%D1%82%D1%8C),  и др., кроме того, у растений и водорослей также имеются [пластиды](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%B4%D0%B0).

**Наружная клеточная плазматическая мембрана** животной клеткитолщиной около 10 нанометров называется плазмалеммой. Она разграничивает внутреннее содержимое клетки от внешней среды, выполняет также [транспортную функцию](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%90%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%8F_%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B8:%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D0%BF%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%84%D1%83%D0%BD%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F&action=edit&redlink=1). На сохранение структуры мембраны клетка не тратит энергии: молекулы удерживаются в мембране за счет сил гидрофобного взаимодействия углеводородных липидных хвостов, соориентированных в непосредственной близости друг к другу. Плазматическая мембрана [животных](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%96%D0%B8%D0%B2%D0%BE%D1%82%D0%BD%D0%BE%D0%B5) клеток состоит из [фосфолипидов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BF%D0%B8%D0%B4), [липопротеидов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B8%D0%BF%D0%BE%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%B8%D0%B4), а также [белков](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D0%BB%D0%BE%D0%BA), например, [антигенов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%B3%D0%B5%D0%BD) и [рецепторов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D1%80%D0%B5%D1%86%D0%B5%D0%BF%D1%82%D0%BE%D1%80). Клетка имеет [глиокаликс](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D1%81), который выполняет рецепторную и маркерную функцию. [Глиокаликс](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D1%81) мембраны представляет собой «заякоренные» в плазмалемме молекулы олигосахаридов, полисахаридов, гликопротеинов и гликолипидов.

**Структура цитоплазмы.** Жидкую составляющую цитоплазмы называют цитозолем. Внутреннее пространство эукариотических клеток, заполнено жидкой плазмой, в которой, в определенном порядке размещены ядро и другие [органеллы](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9E%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B8%D0%B4). Передвижение органелл производится специализированными транспортными системами клетки [микротрубочк](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%82%D1%80%D1%83%D0%B1%D0%BE%D1%87%D0%BA%D0%B8)ами с помощью белков [динеинов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B8%D0%BD%D0%B5%D0%B8%D0%BD) и [кинезинов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B8%D0%BD%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D0%BD), которые выполняют двигательную функцию. Ряд [белковых молекул](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D0%BB%D0%BA%D0%B8) диффундируют, свободно перемещаясь по всему внутриклеточному пространству. Направление движения белковых молекул к компартментам регулируется при помощи специальных сигналов на их поверхности, узнаваемых транспортными системами клетки.

В клетке имеется **шероховатый эндоплазматический ретикулум (ЭПР)**, который представляет отсеки в виде трубок и цистерн на мембранах, которого прикреплены рибосомы, принимающие участие в синтезе белков. В отличие от шероховатого ЭПР в **гладком эндоплазматическом ретикулуме** происходит синтез липидов, внутренние пространство гладкого ретикулума не изолировано и сообщается с [ядерной оболочкой](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AF%D0%B4%D0%B5%D1%80%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D1%87%D0%BA%D0%B0).

**Аппарат Гольджи.** представляет собой стопку плоских цистерн, расширенных ближе к краям. В цистернах аппарата Гольджи формируются некоторые белки, синтезированные в шероховатом ЭПР, предназначенные для [секреции](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BA%D0%B7%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%B7) или образования [лизосом](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B8%D0%B7%D0%BE%D1%81%D0%BE%D0%BC%D0%B0). К цистернам аппарата Гольджи непрерывно присоединяются мембранные пузырьки — [везикулы](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8B), получаемые от ЭПР, которые обеспечивают дальнейшее перемещение созревающих белков от одной цистерны к другой и до полного созревания белков в противоположном конце органеллы.

**Клеточное ядро** содержит молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты ([ДНК](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A)), обеспечивающей запись и сохранение генетическая информация живого организма. В ядре происходит удвоение молекул ДНК ([репликация](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D0%BF%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%94%D0%9D%D0%9A)), а также [транскрипция](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D0%BA%D1%80%D0%B8%D0%BF%D1%86%D0%B8%D1%8F_(%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F))  - синтез молекул рибонуклеиновой кислоты ([РНК](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%9D%D0%9A)) на матрице ДНК. В ядре синтезированные молекулы РНК претерпевают сплайсинг (модификацию) стирание бессмысленной информации и затем направляются в цитоплазму. Сборка [рибосом](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B8%D0%B1%D0%BE%D1%81%D0%BE%D0%BC%D0%B0) происходит в ядре в так называемых ядрышках. В некоторых местах внутренняя и внешняя мембраны ядерной оболочки сливаются и образуют [ядерные поры](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AF%D0%B4%D0%B5%D1%80%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%BF%D0%BE%D1%80%D0%B0), через которые происходит материальный обмен между ядром и цитоплазмой.

**Лизосомы.** Органелла, которая ответственна за самоуничтожение клетки, содержит гидролитические [ферменты](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%8B), способные расщепить все биополимеры. Основная функция - автолиз - расщепление отдельных органоидов, участков цитоплазмы клетки.

**Цитоскелет.** [Цитоскелет](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D0%B8%D1%82%D0%BE%D1%81%D0%BA%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D1%82) клетки образуют  белковые фибриллярные структуры, [микротрубочки](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%82%D1%80%D1%83%D0%B1%D0%BE%D1%87%D0%BA%D0%B8) и [промежуточные филаменты](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D0%B6%D1%83%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D1%84%D0%B8%D0%BB%D0%B0%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%8B). Микротрубочки принимают участие в транспорте органелл, а белковые филаменты используются для поддержания структуры клетки. Белки цитоскелета составляют несколько десятков процентов от массы клеточного белка.

**Центриоли.** Вблизи ядра клеток животных располагаются центриоли, которые принимают участие в организации цитоскелета, представляют собой цилиндрические белковые структуры, образованные девятью наборами [микротрубочек](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%82%D1%80%D1%83%D0%B1%D0%BE%D1%87%D0%BA%D0%B8). Количество микротрубочек в наборе может колебаться для разных организмов от 1 до 3.

**Митохондрии** это особые генерирующие энергетические системы клетки, основной функцией которых является синтез аденозинтрифосфорной кислоты ([АТФ](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%A2%D0%A4)), являющейся универсальным носителем биологической энергии.  Так, например, процесс дыхания (поглощение [кислорода](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B4) и выделение [углекислого газа](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A3%D0%B3%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D1%8B%D0%B9_%D0%B3%D0%B0%D0%B7)) происходит за счёт ферментативных систем митохондрий. Внутренний матрикс митохондрии ограничен от цитоплазмы двумя мембранами: наружной и внутренней между, которыми расположено межмембранное пространство. Внутренняя мембрана митохондрии образует складки, которые называют кристами. В матриксе локализуются различные ферменты, принимающие участие в дыхании и синтезе АТФ. Для синтеза АТФ существенное значение имеет водородный [потенциал](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D0%B0%D0%BB) внутренней мембраны митохондрии.

Митохондрии имеют свой собственный [ДНК](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A)-[геном](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC), в котором [закодированы](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D0%BA%D0%BE%D0%B4)  не все митохондриальные белки, большая часть [генов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD) митохондриальных белков находятся в ядерном геноме, при этом соответствующие им продукты синтезируются в цитоплазме, а затем транспортируются в митохондрии.

**Контрольные вопросы**

1. Аминокислоты и их роль в формировании белков.

2. Пептидная связь.

3. Четыре уровня организации белковой молекулы.

4. Функции белков.

5. Ферменты и их роль в процессе жизнедеятельности клеток.

6. Классификация ферментов.

7. Понятие о коферментах и их функция в клетках.

8. Коферменты и их роль в окислительно-восстановительных процессах.

9. Структура коферментов и их участие в ферментативных реакциях.

10. Полосы поглощения окисленной и восстановленной форм кофермента НАД.

11. Основная функция флавиновых коферментов и их участие в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях.

12. Характеристики окисленной, полувосстановленной и восстановленной форм флавинов.

13. Кофактор зависимые ферменты, апоферметы, холоферменты.

14. Кофактор зависимые ферменты и их функция в биокаталитических процессах.

15. Структура активного центра НАД-зависимых биокатализаторов на примере фермента алкогольдегидрогеназы.

16. Механизм электрофильного катализа с участием фермента алкогольдегидрогеназы.

17. Основные стадии окислительно-восстановительных реакций, катализируемых НАД-зазисимыми оксидоредуктазами

18. Понятие субстратной специфичности.

19. Эволюция биокатализаторов на примере НАД-зависимых ферментов.

20. Природа связи коферментов ФАД и ФМН в активном центре апоферментов.

21. Структурная формула ФАД и ФМН, образование комплекса с переносом заряда.

22. Два наиболее распространенных механизма окисления спиртов, аминов, кетонов, флавиновыми дегидрогеназами.

23. Общая схема реакций, катализируемых флавопротеидами.

24. Общая формула углеводов или полисахаридов.

25. Углеводы и их основные функции в клетке.

26. Семейства моносахаридов и дисахоридов.

27. Формы существования высокомолекулярных полисахаридов.

28. Общая структура молекул фосфолипидов.

29. Ориентация фосфолипидов на границе раздела масло-вода.

30. Структура бислойной липидной мембраны.

31. Мицеллы, липосомы, условия их формирования.

32. Структура бислойной липидной мембраны, содержащей белковые молекулы.

33. Комплексы белков с углеводами их функция в клетке.

34. Комплексы белков с липидами.

35. Белок-белковые комплексы, особенности третичной структуры.

36. Комплексы белков с олигоаминами.

37. Структура [эукариотической](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%83%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%82%D1%8B) клетки.

38. Основные органеллы и их функции в живой клетке.

**4. Основные процессы биоэнергетики**

**4.1. Фотосинтез**

Свет является источником энергии для растений и большинства автотрофных организмов, тогда как гетеротрофные организмы используют энергию органических веществ, поступающую с пищей. Как известно энергия света в растениях и фотосинтезирующих бактериях используется для синтеза органических соединений из СО2 и воды по уравнению.

Свет

nH2O + nCO2 (CH2O)n  + nO2, (20)

где n, как правило, равно 6, что соответствует образованию углевода – гексозы (С6Н12О6) в качестве конечного продукта фотосинтеза. Фотосинтез включает расщепление воды за счет энергии фотонов, происходящий с помощью хлорофиллсодержащих фотосистем, и восстановление диоксида углерода. Таким образом, протоны и необходимые для процесса восстановления электроны извлекаются из воды, кислород при этом является побочным продуктом фотосинтеза и поступает в атмосферу. В ходе фотосинтеза энергия поглощенных хлорофиллом квантов света направляется на возбуждение электронов в хлорофилле и далее расходуется на синтез макроэргических соединений, например, АТФ, а также соединений с высоким восстановительным потенциалом – НАДФН.Перенос электронов от молекул воды к НАДФ+происходит по уравнениям:

НАДФ+ + 2Н2О → Н2О2 + НАДФН + Н+  (21)

Н2О2 → 0,5О2 + Н2О (22)

Получив энергию в виде квантов света, два электрона и один протон присоединяются к молекуле НАДФ+, восстанавливаясь до НАДФН. Таким образом, вначале световой реакции фотосинтеза происходит расщепление воды с образованием восстановленной формы кофермента НАДФН и кислорода (рис.18). Эта энергия частично используется при синтезе молекулы АТФ в результате реакции фосфорилирования из АДФ.

hν

атмосфера

Световая фаза 12Н2О 24Н+  + 6О2

24е- 12Н+ 12Н+

Темновая фаза 6 СО2 6 С = + 6 - О -

(НСОН)6

С6Н12О6 6Н2О

Рис.18. Схема фотосинтеза

Последующий процесс фотосинтеза реализуется без светового потока. Восстановленная форма кофермента НАДФН,используя энергию АТФ синтезирует углеводы из СО2 — глюкозу, фруктозу или полимер глюкозы крахмал. Включение молекулы СО2 в молекулу рибулозо-1,5-дифосфат с расщеплением этой молекулы и образованием двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты, происходит с помощью двух молекул НАДФНдо двух молекул 3-фосфоглицеринового альдегида и с дальнейшим их превращением в молекулу гексозы. Таким образом, получая 4 электрона молекулы СО2 образуют одноуглеродные фрагменты НСОН. Из углеводов затем образуются и другие органические соединения, например, белки и липиды. Поступающие в организм человека с пищей углеводы участвуют в окислительных химических процессах, которые называют катаболическими, выделяющаяся при этом энергия и высвобождающиеся электроны расходуются для синтеза АТФ и образования новых химических связей, в основном при синтезе липидов.

Биохимические процессы, обеспечивающие жизнедеятельность организма, называют обменом веществ (метаболизмом), а участвующие в обмене веществ химические соединения - метаболитами. Все ферментативные и регуляторные процессы в живых организмах упорядочены, проходят с высокой эффективностью в виде последовательностей химических реакций, которые называются путями метаболизма или метаболическими путями. В обмене веществ обычно выделяют внешний обмен, который включает внеклеточное превращение веществ и промежуточный обмен, реализующийся в клетках и являющийся совокупностью всех химических реакций, протекающих в живой клетке. При обмене веществ выделяют два противоположных процесса: катаболизм и анаболизм. Метаболические пути, сопрягающие процессы анаболизма и катаболизма называют амфиболическимипутями.

**4.2. Катаболизм и анаболизм**

**Катаболизм (распад) –** расщепление полисахаридов, белков и жиров в клетке (как поступивших с пищей, так и входящих в состав клетки) происходит через ряд последовательных ферментативных реакций. Продукты подвергаются ферментативному гидролизу и расщепляются до моносахаридов, жирных кислот, глицерина, аминокислот и пр. Затем, после их всасывания, транспорта и распределения по клеткам организма начинаются специфические пути катаболизма (рис.19). На второй стадии продукты, образовавшиеся на первой стадии, превращаются в более простые молекулы. Например, гексозы, пентозы и глицерин образуют – глицеральдегид-3-фосфат, который затем, через последовательность реакций превращается в пируват и ацетил-КоА. Сумма двадцати аминокислот при расщеплении дают несколько конечных продуктов: ацетил-КоА, фумарат, оксалоацетат, сукцинат и α-кетоглутарат.

Продукты, образовавшиеся на второй стадии, принимают участие в ферментативных реакциях, протекающих в третьей стадии. При этом на заключительном этапе образуются СО2 и Н2О. Катаболические превращения являются основным источником энергии для живых организмов.

Процесс **анаболизма** направлен на образование и обновление компонентов клетки, на синтез сложных биоорганических молекул, например, белков, коферментов, гормонов, нуклеиновых кислот из простых соединений. Таким образом, для процесса анаболизма третья стадия катаболизма является первой. Синтез белка, начинается с α-кетокислот, являющихся предшественниками α- аминокислот. На второй стадии анаболизма α-кетокислоты аминируются аминогруппой доноров с образованием α-аминокислот. На третьей стадии, аминокислоты объединяются в первичную пептидную цепь.

Катаболитические превращения, которые сопровождаются понижением свободной энергии, называют экзергоническими процессами. В то время как анаболитические, восстановительные превращения называются эндергоническими.

**Реакции цикла трикарбоновых кислот**

1. Реакция образования цитрата (лимонной кислоты).

О=С - СН2 + АСо – S – CO +H2O СН2 – СОН – СН2 + НS-КоА + Н+

Цитратсинтетаза

СОО- СOO- CH3 СОО- СОО-  СОО-

Оксалоацетат Ацетил-СоА Цитрат

2. Превращение цитрата в изоцитрат.

+Н2О

СН2 – СОН – СН2 СН2 – СН – СНОН

Аконитаза

СОО- СОО-  СОО- СОО- СОО-  СОО-

Цитрат Изоцитрат

СО2

СО2

α-кетоглутарат

Жирные к-ты, глицерин

Гексозы,

пентозы

Аминокис-лоты

Ацетил- КоА

Глицеральдегид фосфат,

Фосфоенолпируват,

Пируват

Липиды

Поли-сахариды

Белки

Цитрат

Изоцитрат

Сукцинат

Фумарат

Оксалоацетат

Малат

Цикл трикарбоновых кислот

**Стадия І Стадия ІІ Стадия ІІІ**

Рис. 19. Три стадии катаболизма и анаболизма

Сплошные стрелки – катаболитические пути, пунктирные – анаболитические.

Стадия ІІІ называется амфиболитической, на этой стадии завершается разрушение пищевых молекул до СО2,а затем низкомолекулярные предшественники поставляются для анаболитических процессов.

3. Реакция окисления изоцитрата (фермент – изоцитратдегидрогеназа)

Н+→СО2

НАД→ НАДН2

СНОН – СН – СНОН СО – СН – СНОН СО – СН2 – СНОН

СОО- СОО-  СОО-  СОО- СОО- СОО-  СОО- СОО-

Изоцитрат Оксалосукцинат α-Оксоглутарат

4. Реакция катализируется α-оксоглутаратдегидрогеназным комплексом

α-Оксоглуторат + NAD+ + КоАСукцинил~КоА + CO2 + NADH

5. Реакция субстратного фосфорилирования (фермент – сукцинаттиокиназа (сукцинил-СоА-синтетаза)

Сукцинил~СоА + Ф + ГДФ-Сукцинат + ГТФ

СоА-S~CO=CH2 - CH2- COO- + Ф + ГДФ ↔ СОО- - CH2 - CH2 – СОО- + ГТФ + СоА- SН

6. Далее ГТФ участвует в реакции переноса своей фосфатной группы на АДФ с образованием АТФ (реакцию катализирует нуклеозидфосфаткиназа)

ГТФ + АДФ ↔ ГДФ + АТФ

7. Реакция окисления (фермент - сукцинатдегидрогеназа)

СОО- - CH2 - CH2 – СОО- СОО- - CH = CH – СОО-

Сукцинат Фумарат

8. Реакция гидротации (фермент – фумаратгидратаза)

Н2О

СОО- - CH = CH – СОО- СОО- - CH2 - CHОН – СОО-

Фумарат Малат

9. Реакция окисления (фермент – малатдегидрогеназа)

НАД →НАДН + Н+

СОО- - CH2 - CHОН – СОО- СОО- - CH2 - CО – СОО-

Цикл трикарбоновых кислот поставляет промежуточные продукты для процессов биосинтеза. Из α-оксоглутарата (α-кетоглутарата) синтезируется глутаминовая кислота (глутамат), а затем из глутамата синтезируются глутамин, аргинин и пролин. Из оксалоацетата синтезируется аспарагиновая кислота (аспартат). Затем из аспартата синтезируется аспарагин. Из сукцинил-СоА синтезируются порфирины и гем. Первая реакция синтеза порфирина – реакция конденсации сукцинил-СоА и аминокислоты глицина. В реакции конденсации, сопряженной с декарбоксилированием, образуется важный промежуточный продукт синтеза гема - δ-аминолевулиновая кислота. Из оксалоацетата синтезируется глюкоза (процесс глюконеогенеза).

**4.3. Три основных закона биоэнергетики Скулачева**

1. Живая клетка избегает прямого использования энергии внешних ресурсов для совершения полезной работы. Она сначала превращает их в одну из трех конвертируемых форм энергии («энергетических валют»).

2. Любая живая клетка всегда располагает как минимум двумя«энергетическими валютами»: одна – водорастворимая (АТФ) и вторая – связанная с мембраной (μН+ или μNa+ – градиент мембранного потенциала).

3. «Энергетические валюты» клетки могут превращаться одна в другую. Поэтому получения хотя бы одной из них за счет внешних ресурсов достаточно для поддержания жизнедеятельности клетки.

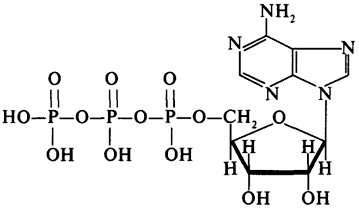
Органические соединения обладают определѐнным запасом внутренней энергии. Часть внутренней энергии молекулы может быть использована для совершения работы. Эту энергию называют свободной энергией (G) молекулы. Источниками энергии для организма являются химические реакции, в которых молекулы, содержащие атомы углерода в восстановленном состоянии, подвергаются окислению. При этом дыхательные переносчики, коферменты НАД+ и ФАД+ присоединяют протоны и электроны восстанавливаются до НАДН2 и ФАДН2 и, в таком виде транспортируют атомы водорода по дыхательной цепи клетки. Различают эндергонические реакции, требующие притока свободной энергии, которая положительна и имеет величину ΔG > 0, а также экзергонические реакции в которых энергия выделяется, ΔG имеет отрицательную величину ΔG < 0 (таблица 5). Внутриклеточные химические реакции могут быть представлены в виде: 1. катаболических (экзергонических) реакций и 2. анаболических (эндергонических) реакций.

Таблица 5. Направление химических реакций определяется значением ΔG

|  |  |
| --- | --- |
| Эндергонические реакции, ΔG > 0 | Экзергонические реакции, ΔG < 0 |
| 1. Реакция протекает при поступлении свободной энергии | 1. Реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии |
| 2. Если абсолютное значение ΔG велико, система устойчива и реакция не осуществляется | 2. Если абсолютное значение ΔG велико, реакция идѐт практически до конца (необратимая) |
| 3. Энергетически сопряжѐнные реакции, для которых необходим приток энергии от экзергонических реакций | 3. Энерговыделяющие реакции, служат источниками энергии для других реакций или процессов |
| 4. Анаболические реакции | 4. Катаболические реакции |

**4.4. Макроэргические соединения**

Макроэргические соединения, содержат макроэргическую связь, при гидролизе которой освобождается энергия больше чем 30 кДж/моль. К макроэргическим соединениям относят фосфоенолпируват, 1,3-дифосфоглицерат, которые образуются в процессе распада глюкозы до пирувата. К этим соединениям также относится сукцинил~СоА, который образуется в цикле трикарбоновых кислот, переносит фосфатную группу на глицеральдегид-3-фосфат и креатинфосфат, при этом их макроэргическая связь используется для синтеза АТФ



Макроэргические соединения: ацил~СоА, фосфоенолпируват, 1,3-дифосфоглицерат, карбамоилфосфат, аргининфосфат, гистидинфосфат и все нуклеозиддифосфаты и нуклеозитрифосфаты обладают большим потенциалом переноса фосфатной группы на АДФ с образованием АТФ. Энергия, выделяемая при распаде этих макроэргических молекул более высокая, чем требуется для синтеза АТФ из АДФ. АДФ является универсальным акцептором энергии и фосфатных групп. По отношению к АДФ, перечисленные макроэргические молекулы являются донорами энергии. Экспериментальные исследования показали, что АТФ в живой клетке является посредником между процессами запасания энергии и её использованием. Таким образом, АТФ в клетке выполняет роль «энергетической валюты». Цикл АТФ-АДФ является основным механизмом обмена энергии в клетке. Расчеты показывают, что в организме в сутки образуется и распадается от 40 до 45 кг АТФ.

Кроме АТФ, генераторами энергии могут служить протонный и натриевый потенциалы биологических мембран. Возникновение протонного и натриевого потенциала связано с направленной диффузией ионов Н+ и Na+ из области с высокой концентрацией, в область с низким содержанием ионов в биологической мембране. Разность протонного и натриевого потенциалов обозначают как ΔН+ и ΔNa+, соответственно. Величина ΔН+ складывается из разности электрических потенциалов Δψ и разности химических потенциалов ионов Н+,то есть кислотности (ΔрН). Натриевый потенциал ΔNa+ состоит из Δψ и разности концентраций ионов натрия (ΔрNa). Численное выражение ΔН+ и ΔNa+ в вольтах можно получить из уравнений.

ΔН+ = Δψ – 0,06 ΔрН и ΔNa+ = Δψ – 0,06 ΔрNa

**4.5. Субстратное фосфорилирование**

Одним из источников АТФ, является субстратное фосфорилирование, по которому фосфорильная группа от макроэргического соединения переносится на АДФ. Примером такой реакции может быть реакция гликолиза, когда с 1,3-дифосфоглицерата, содержащего макроэргическую связь в 1 положении, ферментом фосфоглицераткиназой на молекулу АДФ переносится остаток фосфорной кислоты, что сопровождается образованием молекулы АТФ:

Н2С - С - С - О~РО3Н2  Н2С - С - С - ОН

АДФ → АТФ

НО ОН О НО ОН О

1,3-дифосфоглицерат3-фосфоглицерат

Последующая реакция субстратного фосфорилирования АДФ с образованием енольной формы пирувата и АТФ, протекающая под действием фермента пируваткиназы. Изомеризация енольной формы пирувата в пируват происходит неферментативно.

Н2С = С - СООН Н2С = С - СООН + СН3 - С - СООН

АДФ → АТФ

О ~РО3Н2  ОН О

фосфоенолпируват енольная форма пирувата пируват (оксо-форма)

К реакциям субстратного фосфорилирования также относится катализируемое сукцинил-КоА-синтетазой образование ГТФ в цикле Кребса:

НООС–СН2–СН2-СО~SCoA НООС-СН2-СН2-СООН + ГТФ + НS-СоА

Сукценил-СоА-синтетаза

Сукцинил-СоА Сукцинат

Кроме того, в процессах мышечного сокращения протекает реакция субстратного фосфорилирования, катализируемая креатинфосфаткиназой. По реакции, накопленный креатинфосфат отдает фосфорильную группу на АДФ с образованием АТФ, необходимого для процессов мышечного сокращения.

НООС – СН2 – N – C = NH + АТФ НООС – СН2 – N – C = NH + АДФ

СН3 NH2 СН3 NH – PO3H2

Реакции субстратного фосфорилирования являются источником получения АТФ, особенно в анаэробных условиях. Для эукариотов главным источником АТФ является окислительное фофорилирование, использующее энергию электронов, освобождающихся при дегидрировании субстратов, при восстановлении кислорода, через реализацию трансмембранного протонного градиента потенциала. Разнообразие путей превращения энергии в живых клетках дается на рис. 20. Пример сопряжѐннойреакции фосфорилирования глюкозы свободным фосфатом с образованием глюкозо-6-фосфата:

1. Глюкоза + H3РО4 → Глюкозо-6-фосфат + Н2О (ΔG = + 13,8 кДж/моль)

О2

Углеводы

Жиры

Белки

Свет

Механическая работа

Механическая работа

Осмотическая работа

Осмотическая работа

Химическая работа

Химическая работа

Тепло

Тепло

Механическая работа

Химическая работа

Осмотическая работа

Тепло

Углеводы

Рис.20. Разнообразие путей превращения энергии в живых клетках

Самопроизвольно реакция осуществиться не может. Для протекания этой реакции в сторону образования глюкозо-6-фосфат необходимо сопряжение с другой реакцией, в которой энергия выделяется в заведомо большем количестве, чем требуется для фосфорилирования глюкозы. Такой реакцией является реакция гидролиза АТФ.

2. АТФ → АДФ + Н3РО4 ( ΔG = -30,5 кДж/моль )

При сопряжении процессов (1) и (2) в реакции, катализируемой гексокиназой, фосфорилирование глюкозы легко протекает в физиологических условиях; равновесие реакции сильно сдвинуто вправо и она практически необратима:

3. Глюкоза + АТФ → Глюкозо-6-фосфат + АДФ (ΔG = + 13,8 + -30,5 = -16,7 кДж/моль )

В живых системах в отношении направления биологических процессов действует принцип: эндергонические реакции реализующейся за счет энергии освобождающейся в экзергонических реакциях. Анаболические (биосинтетические) процессы, требующие притока энергии, протекают за счет энергии катаболических процессов (процессов распада молекул).

**4.6. Дыхательная цепь**

АТФ является важнейшим биоорганическим соединением клетки, она непрерывно синтезируется. Энергия для синтеза АТФ непрерывно поступает от субстратов, поставляющих электроны в ходе их дегидрирования. Электроны генерируются из субстратов в ходе гликолиза, при преобразовании пирувата в ацетил-СоА и в цикле трикарбоновых кислот в митохондрии. Коферменты НАДН и ФАДН2 транспортируют эти электроны в дыхательную цепь, локализованную в во внутренней митохондриальной мембране. Дыхательная цепь состоит из переносчиков электронов в 4-х ферментативных комплексах. Основная функция переносчиков электронов дыхательной цепи заключается в их способности принимать электроны от предыдущего и отдавать последующему. Прием и передача электронов переносчиками происходит строго упорядоченно и в соответствии с их окислительно-восстановительными потенциалами. Под окислительно-восстановительным потенциалом понимают способность молекулы присоединять электроны - восстанавливаясь или отдавать - окисляясь. Самым низким окислительно-восстановительным потенциалом дыхательной цепи обладает НАДН, самой низкой способностью удерживать приобретенные электроны. В конце дыхательной цепи находиться кислород – его окислительно-восстановительный потенциал самый высокий, он принимает электроны и отдает только фтору. С помощью переносчиков, электроны транспортируются по составляющим дыхательной цепи в сторону кислорода, совершая при этом полезную работу, переноса протонов из митохондриального матрикса в межмембранное пространство (рис. 21).

4Н+  4Н+ 2Н+

Внешняя сторона МБ

2е-

2е- 4Н+ 2е- 2е- 4Н+ 2е- 2е- 2Н+

0,5О2 → Н2О

Внутренняя сторона МБ

(матриксная) НАДН2 ФАДН2 2Н+

Рис. 21. Схема пути движения электронов по дыхательной цепи мембраны (МБ) от НАДН до кислорода, которая отражает движение электронов во внутренней мембране митохондрии

В межмембранном пространстве митохондрии накапливаются протоны, транспортируемые из матрикса. При этом 40-45% энергии, выделяемой при перемещении электронов, затрачивается для создания протонного градиента, а также расходуется при синтезе АТФ. Для транспорта необходимых субстратов расходуется 20-25% энергии. Остаток энергии в виде тепла рассеивается в митохондрии. За счет движения электронов по дыхательной цепи, формируется протонный градиент и электрохимический потенциал между митохондриальным матриксом и межмембранным пространством равный равен ΔμН+= 0,25 В. Энергия этого электрохимического потенциала расходуется для синтеза АТФ в АТФ-синтетазном комплексе, а также в транспорте необходимых субстратов. Согласно закону Фарадея: ΔG = - n·F·ΔE , где F – число Фарадея равно 96,5 кДж/моль·вольт. При трансмембранном прохождении 2 моль Н+ ΔG= - 2·96,5·0,25= -48,25 кДж, учитывая, что ΔE(ЭДС) =ΔμН+=0,25 В. Таким образом, этой энергии вполне хватит для синтеза одного моля АТФ.

**4.7. Цепь переноса электронов и компоненты дыхательной цепи**

Дыхательная цепь включает в себя три основных ферментных комплекса I, III и IV, локализованных во внутренней митохондриальной мембране и два подвижных переносчика: кофермент Q (убихинон) и цитохром С (см. таблицу 6). Сукцинатдегирогеназа, в цикле трикарбоновых кислот, в цепи переноса

Таблица 6. Ферментативные комплексы дыхательной цепи

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Изменение  Red/Ox  потенциала | Название комплекса | Название фермента | Состав комплекса |
| - 0,3 В | Комплекс I | NADH-убихинонредуктаза  (1.6.5.3) | 800 кДа, 30 субъединиц, 1ФМН, 2Fe2S2, 4Fe4S4. |
| + 0,1 В | Комплекс II | Сукцинатдегидрогеназа  (1.3.5.1) | 125 кДа, 6 субъединиц, 1ФАД,  1Fe2S2, 1Fe3S4, 1Fe4S4, 2 Коэнзим Q, 1 гем в цитохроме b1. |
| + 0,2 В | Комплекс III | Убихинон-цитохром С редуктаза  (1.10.2.2) | 400 кДа, 11 субъединиц,  2Fe2S2, 1 гем в цитохроме b1, 1 гем в цитохроме b2 1 гем в цитохроме c1 |
| + 0,3 В | Комплекс IV | Цитохром С-оксидаза  (1.9.3.1) | 200 кДа, 13 субъединиц, 2 Cu, 1Zn,  1 гем в цитохроме а, 1 гем в цитохроме а3 |
| + 0,8 В | Комплекс V | (Н+) Протон-транспортирующая  АТФ-синтаза  (3.6.1.34) | 400 кДа, 14 субъединиц |

электронов рассматривается как комплекс II. Комплексом V называют АТФ-синтазу, хотя известно, что этот фермент не принимает участия в транспорте электронов. Комплексы (I-IV) включают различные окислительно-восстановительные коферменты, связанные с белками, к ним относятся ФМН (флавинмононуклеотид), ФАД (флавинадениндинуклеотид). В комплексах I и II - железо-серные (FeS) центры, в комплексах I, II и III и группы гема в комплексах II, III и IV. Электроны переносятся от комплексов I и II к комплексу III и, затем к комплексу IV, в сторону увеличения электрохимического потенциала.

**4.8. Структурная организация дыхательной цепи**

Комплексы дыхательной цепи интегрированы во внутренней мембране митохондрий (рис. 22). Протоны генерируют комплексы I, III и IV. Электроны поступают в дыхательную цепь в процессе протекания различных ферментативных окислительно-восстановительных реакции. При окислении НАДН2 в комплекс I происходит перенос 2-х электронов от ФМН и FeS-центров к убихинону Q, при этом через комплекс I переносятся 4Н+. Образующиеся при окислении сукцината, глицеролфосфата, ацил-КоА, дигидропиримидинов и других субстратов электроны переносятся на убихинон Q комплексом II (при окислении сукцината) через связанный с ферментом ФАДН2 или через электрон переносящий флавопротеин. Прохождение пары электронов через комплекс II и убихинон Q сопровождается переносом 4-х протонов из матрикса.

Комплекс I Комплекс IIІ Комплекс ІV Комплекс V

4Н+ 4Н+ 2Н+

9Н+

**Q**

2e-

2e-

FeS

O2

4Н+  2е- 4Н+ 2Н+

НАДН2→НАД+ ФАДН2 → ФАД 3АДФ + 3Рi

Н+ 3АТФ

Рис. 22. Компоненты дыхательной цепи – ферментативные комплексы (I-IV)

Последний протонгенерирующий комплекс (комплекс IV) — фермент цитохром С-оксидаза обеспечивает образование воды с помощью электронов поступающих в него по дыхательной цепи, кислорода и протонов митохондриального матрикса. При этом через комплекс IV переносятся 2Н+. Перенос пары электронов по дыхательной цепи сопровождается выбросом 10 протонов из матрикса. Таким образом, создается трансмембранный электрохимический градиент, обусловленный различным содержанием протонов в матриксе и межмембранном пространстве. Энергия электрохимического градиента расходуется на синтез АТФ в V комплексе дыхательной цепи при участии фермента –АТФ-синтазы. Синтез АТФ сопряжен с обратным потоком протонов в матрикс митохондрии (рис. 21).

**Зависимость цикла трикарбоновых кислот от недостатка кислорода.** Несмотря на то, что ни в одну реакцию ЦТК кислород не входит, существует очень сильная зависимость цикла трикарбоновых кислот от недостатка кислорода. В основе этой зависимости прочная функциональная связь между циклом трикарбоновых кислот и процессом окислительного фосфорилирования. Цикл трикарбоновых кислот производит электроны для процесса окислительного фосфорилирования, которые отправляются на последний на мобильных переносчиках – молекулах НАДН и ФАДН2. В процессе окислительного фосфорилирования электроны от НАДН и ФАДН2 движутся по дыхательной цепи и в конце пути достигают своего конечного акцептора – молекулу кислорода. При недостатке кислорода нарушается процесс передачи электронов в дыхательную цепь и молекулы НАДН2 и ФАДН2 не превращаются в НАД+ и ФАД+. Резкое торможение скорости ЦТК при недостатке кислорода объясняется недостатком молекул НАД+ и ФАД+, выполняющих роль вторых субстратов в реакциях цикла.

**4.9. Переносчики электронов**

К числу переносчиков электронов относят цитохромы с1, с, а и а3, которые локализуются на различных участках дыхательной цепи и отличаются структурой полипептидных цепей и следовательно строением боковых групп, а также способом прикрепления к апоферменту. Транспорт электрона к гему биокатализатора сопровождается изменением степени окисления железа в активном центре.

К переносчикам электронов также относят негемовые железо-серные белки (FeS) в которых атомы железа связаны с тиольными группами остатков цистеина белка. Атомы железа в FexSx-центрах могут принимать или отдавать электроны, переходя в ферро (Fe2+)- или ферри (Fe3+) - состояния. Железо-серные белки функционируют совместно с флавиновыми ферментами, принимают электроны от сукцинатдегидрогеназы (комплекс II) и дегидрогеназ.

Другим типом переносчиков электронов является ФМН - белки. ФМН переносит электроны от НАДН2 на железо-серные центры Fe2S2, два атома железа при этом связаны координационными связями с двумя атомами неорганической серы и двумя остатками цистеина в белке. В Fe4S4 четыре атома железа связаны с четырьмя атомами серы и четырьмя остатками цистеина в белке. Атомы железа в FexSx-центрах могут находиться в окисленном (Fe3+) или восстановленном (Fe2+) состоянии.

Убихинон (коэнзим Q), небелковый переносчик электронов, который имеет структуру хинона, широко распространен в митохондриальной мембране. Железо-серные центры биокатализаторов передают электроны убихинону, который включен в состав комплекса III.

Встречающийся на внешней митохондриальной мембране цитохром Сне закреплен жестко и свободно перемещается перенося электроны между III и IV комплексами. Цитохром С относится к гемсодержащим водорастворимым белкам с массой 12,5 кДа, содержит 104 аминокислотных остатка.

Коэнзим Q и цитохром Сотносятся к мобильным переносчики электронов дыхательной цепи. Все другие белковые переносчики являются интегральными белками, которые строго фиксированны и ориентированы определенным образом в биологической мембране.

Важную роль в живой природе выполняют каротиноиды, которые относят к классу терпеноидов, по химическому строению каротиноиды делят на две группы: каротины (углеводороды) и ксантофиллы (содержащие кислород). Каротиноиды состоят из длинных углеводородных цепей, имеющих сопряженные двойные связи, заканчивающиеся на одном (α-каротин) или обоих концах (β-каротин) кольцевой циклической структурой, которую называют иононовым кольцом. На сегодняшний день известно более 600 различных каротиноидов. Каротиноиды являются биологически-активными веществами. Благодаря наличию ненасыщенных сопряженных связей поглощают свет и подвергаются стереоизомеризации и взаимным превращениям, растворяются в жирах и связываются с белками. В связи с тем, что каротиноиды, содержат значительное количество двойных связей, предполагают, что они являются в растении переносчиками активного кислорода и принимают участие в окислительно-восстановительных процессах. В растениях каротиноиды играют важную роль в процессе фотосинтеза. Каротиноиды являются исходными веществами, из которых образуются витамины группы А, а также «зрительный пурпур», участвующий в зрительном акте. Следует отметить, что многие аспекты физиологических функций каротиноидов остаются невыясненными до конца, можно с уверенностью утверждать, что они принимают участие в различных физиологических процессах, без которых жизнь в существующей форме была бы невозможна.

**4.10. Электроферментативные процессы в биологических мембранах**

Ферментативные окислительно-восстановительные реакции играют важнейшую роль в живой природе, с ними связаны процессы тканевого дыхания, фотосинтеза, преобразования и аккумуляции энергии, передачи нервного импульса. Как известно, основными переносчиками окислительно-восстановительных эквивалентов в клетках являются коферменты: НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, КоQ и др. Практически все коферменты участвуют в реакциях переноса электронов и протонов. Известно, что НАД, НАДФ, ФАД являются косубстратами большого числа ферментов класса оксидоредуктаз.

Частью молекул НАД и НАДФ, непосред­ственно участвующей в каталитическом акте, является никотинамидный нуклеотид. Адениновый нуклеотид фиксирует коферменты в катали­тическом кармане апоферментов. Во многих биохимических окислительно-восстановительных реакциях никотинамидный нуклеотид НАД и НАДФ ступенчато восстанавливается либо окисляется с присоединением или отдачей электронов и протонов. Реакция протекает через две одноэлектронные стадии, образуя промежуточный свободный радикал НАД· по схеме (6). Исследования флюоресценции показали наличие у кофермента НАД полос поглощения при 260 и 340 нм. Считают, что одна полоса принадлежит аденину, другая - восста­новленному никотинамиду. А так как флюоресценция может быть вызвана лишь поглощением энергии

Н Н Н

+ Н+, е-

СОNН2  СОNH2 СОNН2 (6)

+ Н+, е-

- Н+, е-

- Н+, е-

N

N

N+

НАД·Н2 НАДФ·Н2

НАД НАДФ

НАД+ НАДФ+

никотинамидным кольцом был сделан вывод о переносе энергии с аденина на никотинамид. Перенос энергии возможен лишь для изогнутой (сложен­ной) β-конформации молекулы НАД, в которой плоскости аденина и никотинамида сближены и параллельны. В случае вытянутой молекулы кофермента (α-конформация) перенос энергии с аденина на никотинамид затруднен. Обнаружено, что каталитической активностью обладает лишь β-конформация. Появление широкой полосы поглощения при 360 нм объясняют образованием комплекса с переносом заряда (КПЗ) между коферментом и апоферментом. Используя полуэмпирический метод был исследован перенос заряда в фермент-кофакторном комплексе. Учитывая, что кофермент взаимодействует с индольным остатком триптофана апофермента, были рассчитаны электростатические потенциалы, определяющие наиболее устойчивую и выгодную пространственную ориентацию комплекса аденин-никотинамид-индол. Энергетически оптимальные расстояния между плоскостями аденинового и никотинамидного нуклеотидов, а также никотинамидного нуклеотида и индола принимались равными 0,34 нм.

Изоаллоксазиновую гетероциклическию систему имеют коферменты ФАД, ФМН и их предшественник – рибофлавин (витамин В2). Участие этих соединений в окислительно-восстановительных ферментативных процессах связано с восстановлением изоаллоксазинового кольца. Считается, что процесс восстановления изоаллоксазина протекает в две стадии (схема 7). На первой, в

R H R Н

N

N

R

N

N

N

H3C O H3C O H3C O

(7)

N

N

N

NH

N

NH

N

N

NH

H3C H3C H3C

H

O

O

O

e- , +H+ e- , +H+

результате переноса электрона,образуется семихинон (свободный радикал), который затем присоединяет второй электрон, переходя в восстановленную форму кофермента. Отличительным признаком ФАД от ФМН является наличие дополнительной гетероциклической системы – аденина связанного, с изоаллоксазиновым нуклеотидом гибкой пирофосфатной цепью. Исследования флюоресценции ФАД показали, что в водных растворах изоаллоксазиновый и адениновый нуклеотиды располагаются друг над другом, вследствие чего наблюдается сильное гашение флюоресценции кофермента. Это дало основание предположить образование КПЗ между адениновым и изоаллоксазиновым нуклеотидами. Существование КПЗ в ФАД объясняют гидрофобным взаимодействием нуклеотидов и их параллельным расположением в молекуле. Строение комплекса аде­нина с изоаллоксазином может быть представлено в виде:

Функционирование коферментов и их взаимосвязь в биологических мембранах в настоящее время еще полностью не изучены. Установлено, что коферменты являются акцепторами электронов для одной группы ферментов полиферментной системы и донорами для другой. Восстановление и окисление метаболитов сопровождается циклической ферментативной регенерацией коферментов. Общий механизм биокаталитических процессов, происходящих в митохондриальной мембране клетки, связанных с переносом окислительно-восстановительных эквивалентов по схеме (8):

РН1, РН2…РНn С Ś1Н, Ś2Н…Ś nН

(Е1, Е2 … Еn) (É1, É2 … Én) (8)

S1, S2 …Sn CH·H Ṕ1, Ṕ2 … Ṕn

где Е1, Е2…Еn и É1, É2…Én – ферменты, участвующие в восстановлении и окислении субстратов S1,S2…Sn и Ś1Н, Ś2Н…ŚnН, соответственно; С и СН·Н – окисленная и восстановленная формы кофермента; РН1, РН2…РНn и Ṕ1, Ṕ2…Ṕn - продукты ферментативных реакций; – липиды биологической мембраны.

Представленные на схеме 8 сопряженные ферментативные реакции возможны в биологических мембранах клеток благодаря аналогии каталитических щелей апоферментов, подобию в фиксации коферментов в активном центре, а также строгой ориентации фермент-кофакторных комплексов. Исследования аминокислотной последовательности и пространственной структуры ферментов: АДГ печени человека, лошади; ЛДГ собаки, акулы; D-Г-3-Ф-ДГ кальмара, свиньи, дрожжей привели к выводу о существовании трехмерной гомологии для НАД – зависимых дегидрогеназ. Было установлено точное структурное соответствие в полипептидной укладке аминокислотных остатков, образующих шесть нитей параллельно-слоистой складчатой структуры ферментов. Найдена аналогия не только в слоисто-складчатой структуре, но и в большинстве спиралевых и петлевых участков ферментов, углах изломов пептидной цепи, близких для сравниваемых дегидрогеназ. Наибольшее сходство было обнаружено для НАД-связывающих областей, что подтверждает аналогичность способов фиксации кофактора в кофермент-связывающем кармане.

Механизм переноса восстановительных эквивалентов (схема 8) через биологическую мембрану возможен при наличии в системе переносчиков протонов и электронов. К числу переносчиков электронов относят цитохромы с1, с, а и а3, которые локализуются на различных участках дыхательной цепи. Электронный перенос в цитохромах сопровождается изменением степени окисления железа в активном центре биокатализатора. К переносчикам электронов также относят негемовые железо-серные белки (FeS), в которых атомы железа связаны с тиольными группами остатков цистеина белка. Атомы железа в FexSx-центрах могут принимать или отдавать электроны, переходя в ферро (Fe2+) - или ферри (Fe3+) - состояния. Железо-серные белки функционируют совместно с флавиновыми ферментами, принимают электроны от дегидрогеназ, например, сукцинатдегидрогеназы.

Другим типом переносчиков электронов является флавинмононуклеотид - зависимые белки (ФМН-белки). ФМН переносит электроны от НАДН на железо-серные центры Fe2S2 белка, в котором два атома железа связаны координационными связями с двумя атомами неорганической серы и двумя остатками цистеина полипептидной цепи. В Fe4S4 четыре атома железа связаны с четырьмя атомами серы и четырьмя остатками цистеина белка. Все белковые переносчики являются интегральными белками, которые строго фиксированы и ориентированы определенным образом в биологической мембране.

К мобильному белковому переносчику электронов в дыхательной цепи относят гемсодержащий фермент цитохром С, который не закреплен жестко на внешней стороне митохондриальной мембраны. Важнейшая роль в транспорте окислительно-восстановительных эквивалентов в мембранах митохондрии и хлоропластах отводится мобильному небелковому переносчику - убихинону (коферменту Q6 и Q10). Убихинон имеет структуру хинона (схема 9), он широко

О O

ОН

e-, +Н+

e-,  +Н+

СН3О СН3 СН3О СН3О (9)

СН3О СН3О СН3О

Н

Н

Н

ОН

ОН

6-10

6-10

6-10

СН3

СН3

СН3

O

Восстановленная форма Q

Окисленная форма Q

Семихинон

(форма свободного

радикала) НQ

распространен в митохондриальной мембране. Известно, что железо-серные центры биокатализаторов передают электроны коферменту Q. В процессе восстановления кофермент Q изменяет свою химическую структуру через форму свободного радикала – семихинона.

Общий механизм биокаталитических процессов происходящих, во внутренней митохондриальной мембране, связанный с переносом восстановительных эквивалентов, можно представить, учитывая структурную организацию мембраны, схемой, приведенной на рис. 23. Окисленная форма

ŚH2

С

S

Ṕ

PН2

СН·Н

Рис. 23. Механизм трансмембранного переноса протонов

кофермента С, локализованного в жидкокристаллической структуре биомембраны, в коферментной щели апофермента Е1, восстанавливается в результате ферментативной реакции до СН·Н, присоединяя два протона. Субстрат SʹH·H в матриксе митохондрии окисляется при этом до Рʹ. Ферментативная регенерация кофермента происходит при миграции его к другой биокаталитической системе, контролируемой ферментом E1. Субстрат S, находящийся в межмембранном пространстве, восстанавливается до PН·Н.

Трансмембранный перенос протонов, сопровождающийся ферментативной регенерацией кофактора, можно описать рядом последовательных реакций (схема 10):

ŚH2 + C + É1 → ŚH2·C· É1 ↔ Ś·CH·H· É1

Ś· CH·H · É1  → Ṕ + CH·H + É1 (10)

S + CH·H + E1  → S·CH·H·E1 ↔ SH2·C·E1

SH2 ·C·E1 → PH2 + C + E1

Перенос протонов через биологическую мембрану возможен также от фермент-кофакторных систем, в которых кофермент и апофермент образуют в активном центре биокатализатора прочную связь за счет липофильного или электростатического взаимодействий, что характерно для ФАД – зависимых оксидоредуктаз. В этом случае (рис.24), перенос протонов реализуется

ŚH2

KoQH2

CH·Н

CH·Н

PH2

2

S

Ṕ

C

KoQ

C

Рис. 24. Перенос протонов через мембрану KoQ

посредством КоQ, который принимает окислительно-восстановительный эквивалент от ФАД, способного изменять свою форму от окисленной, полувосстановленной и восстановленной. К группе переносчиков электронов, широко распространенных в растительном и живом мире, можно отнести также группу пигментов - каротиноиды. В настоящее время их известно более 600 видов; по химическому строению каротиноиды делят на две группы: каротины

(углеводороды) и ксантофиллы  (каротиноиды, содержащие кислород) (рис.25). Благодаря наличию ненасыщенных сопряженных (конъюгированных) связей каротиноиды имеют вытянутую светочувствительную «нитевидную» структуру, способную выполнять роль переносчиков энергии и электронов. Благодаря свойству хорошо растворяться в жирах каротиноиды, в основном,

а

б

в

О

г

Рис. 25. Химические структуры каротиноидов

а – β – каротин; б – ликопин; в – ξ – каротин; г – цитроксантин

локализуются в липофильной области мембраны, где образуют стабильные каротино-белковые комплексы. Длинные сопряженные углеводородные цепи каротиноидов заканчиваются на одном (α-каротин) или обоих концах (β-каротин) кольцевой иононовой структурой (рис.25). В структуре каротиноидов могут отсутствовать гетероциклические кольца. В связи с тем, что каротиноиды содержат большое количество двойных связей, в клетках животных и человека они выполняют различные защитные функции:

- связывают синглетный кислород, предупреждая образование свободных радикалов;

- обеспечивают защиту от УФ излучения;

- выступают в роли антиоксидантов.

В растениях каротиноиды принимают участие в фотосинтетических процессах, а в организме человека и животных они играют важную роль провитаминов, из которых образуются витамины: ретинолы (витамин А), а также «зрительный пурпур», участвующий в зрительных процессах. Человек и животные не могут синтезировать каротиноиды и ретинолы, их поступление зависит только от внешних источников. Провитаминные свойства β -каротина и его окислительное преобразование в витамин А являются общими для всех животных. Следует отметить, что многие аспекты физиологических функций каротиноидов до конца еще не изучены, очевидно, что они играют важную роль в различных биофизических процессах.

Вследствие высокой ненасыщенности молекул каротиноидов они легко подвергаются окислению и восстановлению, а также обладают хорошими электронными донорно-акцепторными свойствами. В составе липидных мембран каротиноиды в различных комплексах проявляют высокую стабильность. Спектр поглощения каротиноидов, как правило, состоит из трех полос в области 400-500 нм, за исключением некоторых цис-изомеров, у которых появляется дополнительный максимум поглощения в ультрафиолетовой области спектра при 320-380 нм. Положение максимумов поглощения зависит от природы используемого растворителя. Спектры поглощения каротиноидов изменяются при различных структурных перестройках молекулы пигмента.

При фотоактивации ферментативной системы ФС2 происходит селективное окисление β-каротина, сопровождающееся переносом электрона от молекулы каротина (Car) к первичному донору Р680+· и образованием катион-радикала Car+·. Методом ЭПР было обнаружено образование анион-радикалов хинонов в ФС1 и ФС2. В цепи переноса электронов в ФС2 участвуют молекулы каротиноидов, хлорофилла, феофитина и природных хинонов (пластохинонов (Р), убихинонов (Q)), поэтому триады типа [Car+· … P … Q-·] используются в модельных системах переноса электрона. Принцип функционирования молекулярных триад заключается в том, что возбужденная в результате поглощения кванта света молекула порфирина отдает электрон молекуле кофермента Q, образуя первичную ион-радикальныю пару [Car … P+· … Q-·]. Катион-радикал P+·, являясь сильным окислителем (акцептором электронов), отрывает электрон от молекулы каротиноида, при этом образуется разделенная ион-радикальная пара [Car+·  … P … Q-·]. Это состояние сохраняет значительную долю световой энергии в виде энергии электрохимического потенциала. Этот путь преобразования световой энергии используют растения во время фотосинтеза. Образование Car+· в реакции с хинонами зарегистрировано как в условиях фотолиза, так и в условиях темновой реакции. Показано, что на первой стадии образуется КПЗ (рис.26), а затем ион-

А

1,2

1

0,8

2

0,4

400 500 600 700 800 900 1000 λ, нм

Рис.26. Спектр поглощения β-каротина (1) и его КПЗ (2) образованного при смешении с хиноном (2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4 бензохиноном) [22].

радикальная пара [Car+·+Q-·]. Конечным продуктом являются аддукты каротиноида с хиноном (Car - Q-·) и цис-изомеры каротиноида. Вышеизложенные экспериментальные данные дают основание для объяснения

электронной проводимости бислойных липидных мембран. Для наглядности на схеме рис.27 приводится модель переноса электронов через биологическую мембрану, которая включает каротиноиды.

KoQH2

SH2

ĆH2

Car-·

PH2

CH2

2

S

P

Car+·

Ć

C

KoQ

Рис.27. Модель трансмембранного переноса протонов и электронов

в биологической мембране

Согласно схеме рис. 27 субстрат SH2 в результате ферментативной реакции окисляется до Р по уравнению (11), при этом кофермент С восстанавливается до СН2. Электрохимическая регенерация кофермента из восстановленной в

E

SH2 + С Р + СН2 (11)

окисленную форму протекает по уравнению (12)

СН2 - 2е- - 2Н+ → С (12)

В биологической мембране этот процесс реализуется с участием кофермента Q (КоQ) и катион-радикала каротина (Car+·). Катион-радикал каротина (Car+·) возникает на одном из β-иононовых колец при стоке электронов через систему конъюгированных связей на другое β-иононовых кольцо, где образуется анион-радикал (Car-·). Таким образом, в одной молекуле β-каротина, благодаря наличию системы сопряженных связей, одновременно могут существовать как катион, так и анион радикалы (Car+· - Car-·), сосредоточенные на двух β-иононовых кольцах, способных принимать участие в окислительно-восстановительных процессах. Другим важным элементом предлагаемой модели является обеспечение переноса электронов с фермент-кофакторной системы на молекулу каротина.

Характер взаимодействия β-каротина с хинонами изучался российскими учеными Поляковым Н.Э. и Лёшиной Т.В., а также другими исследователями. Методом оптической спектроскопии и ЭПР было показано образование КПЗ в реакциях β-каротина, кантаксантина и 8ʹ-апо- β-каротин-8ʹ-аля с хинонами (см. рис.26). Интенсивное поглощение при 1030 нм, наблюдавшееся при смешении β-каротина с хинонами в СН2Сl2, было отнесено к образованию КПЗ, поскольку свободный катион-радикал поглощает в этом растворителе при 1000 нм. Дальнейшее превращение КПЗ может проходить по двум направлениям в зависимости от структуры каротиноида. В случае β-каротина и 8ʹ-апо- β-каротин-8ʹ-аля преимущественным направлением в реакции является отрыв аллильного протона при С(4) циклогексенового кольца. Ион-радикалы каротиноидов способны к протонированию/депротонированию. Образование нейтральных радикалов Car· наблюдается при химическом или электрохимическом окислении каротиноидов до катион-радикалов с последующим их депротонированием Car+· ↔ Car· + Н+, а также при электрохимическом восстановлении, которое протекает через протонирование соответствующих анион-радикалов Car-· + Н+ ↔ Car·.

Вышесказанное подтверждает, что в мембранах клеток каротиноиды образуют КПЗ с биоорганическими соединениями, которые приобретают свободно-радикальную форму хинона, образующуюся в клетке в процессе окислительно-восстановительных реакций. К таким биоорганическим соединениям можно отнести коферменты ФАД, ФМН, в их составе имеется изоаллоксазиновое кольцо, восстановление которого протекает через полувосстановленную форму с образованием радикальной структуры семихина (схема 7). Кофермент Q изменяет свою химическую структуру через форму свободного радикала – семихинона (схема 9). Коферменты НАД и НАДФ также в процессе восстановления проходят через стадии образования промежуточных свободных радикалов НАД· и НАДФ· (схема 6).

Принимая во внимание вышеизложенное, трансмембранный протонный и электронный перенос через биологическую мембрану можно представить в виде следующих последовательных реакций (см. рис.27)

СН2 + КоQ + Car+· СН2 ·КоQ ·Car+·  C· KoQH2·Car-· C + KoQH2 + Car-· (13)

Ć + KoQH2 + Car-· Ć·KoQH2·Car-· ĆН2·КоQ·Car+· ĆН2 + КоQ + Car+·  (14)

На завершающем этапе, вследствие электронного и протонного переноса, наблюдается ферментативное восстановление субстрата по уравнению:

É

S + ĆН2 PH2 (15)

Важное место в процессе переноса электронов отводится образованию КПЗ, сопровождающемуся возникновением характеристической полосы поглощения в длинноволновой области, связанной с переходом комплекса из основного в возбужденное состояние. Критерием образования КПЗ также является расширение полосы поглощения спектра. Полный электронный перенос в КПЗ совершается с основного состояния донора на возбужденное состояние акцептора. Переход системы из состояния Д-А в Д+-А- сопровождается значительным возрастанием дипольного момента, что является причиной больших коэффициентов и также расширения полосы поглощения КПЗ. Перенос заряда в КПЗ значительно возрастает при его возбуждении электромагнитным излучением, что наблюдается в процессе фотосинтеза. Основным признаком образующегося КПЗ является максимальное перекрывание орбиталей, согласно которому минимум потенциальной энергии имеет место, если две молекулы в комплексе ориентируются таким образом в результате чего достигается максимально возможное перекрывание электронодонорных и электроноакцепторных орбиталей. Образование КПЗ можно ожидать для молекул донора и акцептора, структуры которых включают π – сопряженные связи, уложенные в параллельные «стэкинг» стопки. Наличие в молекулах системы конъюгированных связей обусловливает их легкую способность к ионизации. Возможно образование КПЗ с локальным переносом заряда, образующимся при взаимодействии областей повышенной электронной плотности донора с пониженной электронной плотностью акцептора.

Жизнеспособность предложенной модели переноса электронов и протонов через биологическую мембрану, а также образование КПЗ между β-каротином и хиноном подтверждается данными спектра поглощения (рис.26). Кроме того, важно отметить, что спектры поглощения каротиноидов имеют близкое сходство со спектрами абсорбции флавопротеинов, что дает основание сделать вывод о соответствии энергии резонанса каротиноидов и флавопротеинов, благодаря чему возможен электронный перенос с одной молекулы на другую практически без каких либо существенных энергетических затрат. Можно предполагать, что протонно-электронный перенос возможен также между восстановленными формами кофермента НАДН или НАДФН с каротином, образующими КПЗ. Подтверждением этого может быть полное совпадение энергий резонанса (поглощения) восстановленных форм коферментов НАДН или НАДФН, а также β - каротина в ультрафиолетовой области спектра в области длин волн 320-380 нм. (пик λ = 340 нм.).

Вопросами электронной проводимости в биосистемах занимаются довольно давно. Сент-Дьердьи впервые предположил, что белковые структуры могут обладать полупроводниковыми свойствами, т.е. иметь зоны проводимости, по которым могут мигрировать электронные или дырочные заряды. В связи с этим было выполнено значительное количество работ, где предполагалось, что перенос электронов в белках возможен по полипептидной цепи, а также между ароматическими аминокислотными остатками или с участием небелковых хромофорных групп. Полученные многолетние исследования не дали обнадеживающих результатов, показывающих реализацию полупроводникового механизма в основных биологических процессах. Отсутствие полупроводникового механизма переноса электронов в белках очевидно связано с тем, что высокий уровень организованности клеток не допускает появление в активном центре биокатализаторов «заблудившихся» электронов, за исключением окислительно-восстановительных эквивалентов, получаемых в процессе ферментативных реакций, контролируемых коферментами.

Единственным возможным вариантом может быть первичный световой процесс, наблюдаемый в фотосинтетических системах, в которых не реализуется резонансный, типичный для КПЗ, перенос электронов, а протекает экситонная миграция энергии, согласно которой упорядоченное расположение молекул хлорофилла, выполняя светособирающую функцию, переносит нейтральное возбуждение (экситон) к высокоорганизованной ассамблее упакованных молекул пигментов в хлоропластах. Процесс разделения зарядов происходит только в активном центре биокатализаторов в один акт, где образуется первичный окислитель, например, Р700+ и первичный восстановитель, возможно, восстановленный ферредоксин. По другому предположению, полупроводниковый механизм разделения зарядов осуществляется не в активном центре, а в структуре фотохимического активного центра, например, Р700, либо захватывается дырка (до этого мигрировавшая по пигментной системе), либо распадается экситон переноса с захватом дырки на Р700 и миграцией электрона по пигментной системе к первичному восстановителю. В рамках полупроводникового механизма рассматривается также вариант с распадом нейтрального экситона на активном центре Р700, захватом дырки и миграцией электрона к первичному акцептору, удаленному от Р700. Следует отметить, что перенос электронов способны обеспечить не любые колеблющиеся системы с произвольными степенями свободы, а только сильно сопряженные молекулярные структуры, способные обеспечить перемещение заряда.

К такой высокоорганизованной структуре, которая может обеспечить перемещение заряда, можно отнести и бислойные липидные мембраны, в которые включены фрагменты различных каротиноидов (рис.25б,в). Каротиноиды, имея протяженную сопряженную структуру с метильными ответвленными группировками, встраиваются в липидную мембрану, стягивают два монослоя за счет сил гидрофобного взаимодействия, формируя высокоорганизованную ассамблею упакованных молекул пигмента и липидов. Известно, что молекулы каротинов, как правило, имеют углеводородный скелет, содержащий до 40 углеродных атомов. В формировании бислойной липидной мембраны принимают участие жирные кислоты, имеющие от 32 до 36 углеродных атомов, что соответствует содержанию С-атомов у каротиноидов. Углеводородные цепи липидов могут содержать от 1 до 6 двойных связей, липиды ряда растений имеют конъюгированную систему связей. Это дает основание предполагать, что электропроводность биологических мембран существенно зависит от количественного содержания π-связей в липидных мембранах при наличии каротиноидов. В ряде работ рассматривается проводимость углеводородных цепей молекулы, атомы которых разделены этиленовыми группировками. Приводятся данные о проводимости липида – далихола, углеводородная цепь, которого имеет спиральное сопряжение. Спиральное сопряжение имеют ряд каротиноидов, например, ликопин и ξ – каротин рис.25б,в. Таким образом, высокоорганизованная ассамблея упакованных молекул каротиноидов и липидов может обеспечить трансмембранный перенос электронов в биологической мембране от одной биокаталитической системы к другой. Эффективность электронного переноса через липидо-каротиноидную структуру существенно возрастет при воздействии на неё квантов света, что можно наблюдать в процессах фотосинтеза.

В связи с вышеизложенным особый интерес вызывают исследования КПЗ между β - каротином и липидом - кардиолипином. Для кардиолипина в видимой области спектра не были обнаружены полосы поглощения, тогда как β – каротин имеет характерные полосы при 425, 450, 475 нм. Существенное смещение полосы поглощения в длинноволновую область наблюдается для комплекса липида - кардиолипина и β – каротина, полученного в условиях предварительного ультразвукового перемешивания (рис. 28а). Наблюдаемое

А а А б

3

3

0,4 0,4

2

2

0,2 0,2

1

1

340 380 420 460 500 540 λ,нм

340 380 420 460 500 540 λ,нм

Рис. 28а. Спектры поглощения кардиолипина (1), β – каротина (2),

комплекса кардиолипина и β – каротина (3).

Рис. 28б. Спектры поглощения лецитина (1), β – каротина (2),

комплекса лецитина и β – каротина (3).

смещение полосы поглощения комплекса сопровождается его существенным расширением до 100 нм. Незначительно смещение полос поглощения в длинноволновую область до 480 нм было получено также для комплекса β – каротин-лецитин (рис. 28б) относительно исходной длины – 450 нм. Проведенные экспериментальные исследования показали, что система β-каротин – кардиолипин образуют КПЗ, посредством которого возможен электронный перенос через липидо-каротиноидную структуру биологической мембраны. Можно предполагать, что каротиноиды, имеющие гетероциклические кольца, способны образовывать КПЗ с коферментами, в то время как каротиноиды, не имеющие гетероциклических колец, обеспечивают электронный перенос через упакованную липидо-каротиноидную структуру бислойной липидной мембраны. Ряд авторов, рассматривая такие электронные переносы, классифицируют их как эффекты локальной активации, в результате которых возникающие в органических полупроводниках парамагнитные центры активируют соседние молекулы. Другие авторы называют их резонансной миграцией энергии, обусловленной подобранной донорно-акцепторной парой, когда возбужденная молекула донора переводит в возбужденное состояние молекулу акцептора. Считают, что появляющиеся полярные заряженные состояния, возникающие в отдельных точках полупроводниковой структуры, имеют ион-радикальную природу.

Вышеописанная модель трансмембранного переноса объясняет повышение концентрации каротиноидов в клетках животных и человека при гипоксии. При низком парциальном давлении кислорода интенсифицируется энергообеспечение клеток за счет окислительно-восстановительных процессов, эффективность протекания которых зависит от количественного содержания каротиноидов. Значительное накопление каротиноидов в тканях у больных при атеросклерозе, ишемической болезни сердца можно объяснить дефицитом кислорода, в результате чего организм вынужден компенсировать этот недостаток путем усиления окислительно-восстановительных процессов, реализуемых с участием каротиноидов. Большое количество каротиноидов было обнаружено в водорослях, например, Danuliella salina, пигменты которой, по некоторым данным, на 90% состоят из β-каротина. Другой вид водоросли Spirulina platensis содержит до 1700 мг/кг каротиноидов. Известно, что ткани морских животных и рыб содержат большое количество каротиноидов, причем их количество существенно возрастает у глубоководных видов рыб, которые решают проблему энергообеспечения клеток за счет использования темновых электроферментативных окислительно-восстановительных реакций.

Как отмечалось выше, помимо каротиноидов в электронном транспорте существенная роль отводится также липидам, углеводородные цепи которых, в ряде случаев, приобретают сопряженную систему связей, при взаимодействии которых с каротиноидами образуется высокоорганизованная ассамблея упакованных молекул, обеспечивающих эффективный транспорт энергии и электронов к наиболее важным процессам, реализуемым в животных и растительных клетках.

**4.11. Термогенез**

**Терморегуляторная функция тканевого дыхания.** Установлено, что 55 % энергии расщепления глюкозы аккумулируется в макроэргических связях АТФ и используется для обеспечения функционирования клеток. Остальная часть энергии является непосредственным источником теплообразования. **Несопряженное дыхание**обеспечивает **поддержание температуры тела** на уровне выше, чем температура окружающей среды. Сопряженность дыхания и фосфорилирования в клетках являются регулируемыми процессами, связанными с состоянием митохондрий. При действии холода организм нуждается в эффективной мобилизации тепла, которая осуществляется путем разобщения окислительного фосфорилирования и свободного окисления. При этом энергетический обмен клетки направлен в сторону образования тепла за счет временного понижения специфической функции клетки. В нормальном состоянии эффективность митохондриального переноса электронов регулируется АДФ. Накопление АДФ активирует тканевое дыхание, осуществляя **дыхательный контроль,**что позволяет клеткам адекватно реагировать на активность клеточного метаболизма и поддерживать запасы АТФ на требуемом уровне. При реализации дыхательного контроля возможна терморегуляторная функция тканевого дыхания: процессы разобщения тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования приводят к повышению температуры тела. Благодаря этому стало возможным поддержание оптимальной температуры тела и протекание всех жизненно важных биологических процессов, независимо от условий окружающей среды. Следует отметить, что без дыхательного контроля разобщение между процессами тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования могут привести к неконтролируемому повышению температуры тела и, соответственно, фальному исходу для организма.

Как известно, цепь переноса электронов начинается с вдыхания воздуха и связывания кислорода гемоглобином.При участии окислительно-восстановительных ферментовпроисходит распад макромолекул — субстратов до более простых и, в конечном счете, до СО2 и Н2О, это сопровождается высвобождением энергии. Важную роль в транспортировке кислорода в ткани клетки обеспечивают эритроциты, связывающие кислород (4 грам-моля кислорода на 1 грамм-моль гемоглобина) и отдающие в легких углекислоту. Уменьшение содержания СО2 повышает рН, понижая таким образом концентрацию Н+ в эритроцитах. Это способствует существенному облегчению взаимодействия О2 с гемоглобином, при этом железо гемма, находящееся в состоянии (+2), не изменяет своей степени окисления. Установлено, что промежуточным депо кислорода, в некоторых тканях (в основном в мышечной ткани) выполняет **миоглобин.** Другие специфические переносчики кислорода в клетке пока не установлены. Кислород, в митохондриях восстанавливается, принимая на себя электроны из дыхательной цепи ферментов, являясь акцептором электронов.

**Молекулярные нарушения энергетического обмена.** Молекулярные нарушения энергетического обмена лежат в основе функциональных и органических нарушений органов и тканей. Нарушения на клеточном уровне зависят от цитоплазматических повреждений - мембран митохондрий, эндоплазматического ретикулума, лизосом. Эти повреждения вызываются нарушением биосинтеза нуклеиновых кислот, окислением, действием токсических веществ, нарушением нервной и гуморальной регуляции. Вследствие энергетических изменений и нарушений на тканевом и органном уровне, а также на уровне целостного организма, нарушения энергетического обмена, связанного с изменением регуляторной функции нервной и эндокринной систем.

Обменные процессы на молекулярном уровне обусловлены процессами катаболизма и анаболизма. Катаболизм может совершаться внеклеточно с помощью пищеварительных ферментов и внутриклеточно при участии лизосомальных гидролаз. Нарушение катаболизма в наибольшей степени выраженно при разрушении механизмов дыхания и окислительного фосфорилирования. Установлено, что окислительное фосфорилирование нарушается при авитаминозах, при недостатке коферментов (витаминов), которые участвуют в цикле трикарбоновых кислот и переносе электронов по дыхательной цепи.

Причиной гипоэнергетических состояний является гипоксия, возникновение которой связано с нарушением:

- поступления кислорода в кровь;

- транспорта кислорода в ткани;

- функций митохондрий.

Термогенез происходит 3 путями:

1. В результате мышечной активности;

2. Активности скелетной мускулатуры;

3. Вследствие протекания «немышечных» биохимических процессов.

Наибольшее количество «немышечного» тепла образуется при окислении бурого и белого жира. Бурый жир отличается как морфологически, так и по метаболизму от более распространенного белого жира. Клетки содержат большое количество митохондрий и жировых вакуолей. В результате терморегулирования норадреналином и адреналином, происходит гидролиз триацилглицеридов на жирные кислоты и глицерин, которые являются важными источниками биологической энергии.

При охлаждении организма, норадреналин активирует гормонзависимую липазу. Благодаря интенсивному липолизу в организме образуется большое количество жирных кислот, которые распадаются в процессе β-окисления и одновременно открывают протонный канал белка термогенина, который обеспечивает разобщение метаболических процессов окисления и фосфорилирования. Установлено, что термогенин составляет до 15% общего белка митохондрий, при этом имеет молекулярную массу равную 33,2 кДа. Дальнейший распад и освобождение энергии уже не зависит от наличия АДФ и протекает с максимальной скоростью, генерируя тепловую энергию. Таким образом, в результате окисления жиров происходит не накопление энергии в форме макроэргических соединений, а происходит выделение тепла. Обильное кровоснабжение обеспечивает быстрое отведение вырабатываемого тепла.

В живых клетках, митохондрии обеспечивают транспорт электронов и протонов на наружную сторону внутренней мембраны, создавая протонный градиент между двумя сторонами внутренней мембраны митохондрий. Это является способом временного запасания энергии, выделяющейся при окислении субстрата. Протонный градиент понижается за счет транспорта протонов обратно в матрикс через ферментативный комплекс АТФ-синтазы, что приводит к образованию АТФ из АДФ и неорганического фосфата. В митохондриях этот процесс разделен разобщителем термогенином, за счет которого протонный градиент протекает без синтеза АТФ.

Была выявлена последовательность событий, включенных в термогенный ответ на понижение температуры среды.

1. Холодовые рецепторы кожи активируются и посылают сигнал в терморегуляторный центр гипоталамуса мозга.

2. Сигнал из гипоталамуса поступает в бурую жировую ткань, через симпатические нейроны, что приводит к выделению норадреналина.

3. Норадреналин связывается с β-адренорецепторами, на внешней стороне плазматической мембраны клеток бурого жира.

4. β-Адренорецепторы, связав норадреналин, активируют аденилатциклазу.

5. Аденилатциклаза образует цАМФ из АТФ.

6. цАМФ включает протеинкиназный каскад, приводящий к активации липазы.

7. Липаза расщепляет триацилглицериды до глицерина и жирных кислот.

8. Жирные кислоты затем претерпевают обычный цикл катаболитических превращений. Они активируются во внешней мембране митохондрии, давая ацил-СоА. Полученные жирные ацилы транспортируются в митохондриальный матрикс посредством карнитиновой системы, где расщепляются, давая СО2 и восстановительные эквиваленты, под действием ферментов β-окисления.

9. Восстановительные эквиваленты, поставляемые в дыхательную цепь при β-окислении жирных кислот и окислении ацетильных групп в цикле Кребса, переносятся к О2, что сопряжено с образованием воды и тепла.

**Контрольные вопросы**

1. Роль энергии света для растений и фотосинтезирующих бактериях.

2. Схемы световой и темновой фаз фотосинтеза.

3. Реакция перенос электронов от молекул воды к НАДФ+.

4. Метаболитические пути в живой клетке.

5. Катаболитические и анаболитические превращения в клетке.

6. Три стадии катаболизма и анаболизма.

7. Цикл трикарбоновых кислот.

8. Три основных закона биоэнергетики Скулачева.

9. Направление химических реакций.

10. Эндергонические и экзергонические реакции.

11. Макроэргические соединения их роль в биоэнергетических процессах.

12. Субстратное фосфорилирование.

13. Разнообразие путей превращения энергии в живых клетках.

14. Дыхательная цепь и схема пути движения электронов по дыхательной цепи.

15. Компоненты дыхательной цепи – ферментативные комплексы.

16. Переносчики электронов дыхательной цепи.

17. Каротиноиды и их функции в биологических процессах.

18. Механизм трансмембранного переноса протонов через биологическую мембрану.

19. Окислительно-восстановительные реакции каротиноидов с хинонами.

20. Реакции каротиноидов со свободными радикалами, антиоксидантные свойства каротиноидов.

21. Гипоэнергетическое состояние, гипоксия, пути протекания термогенеза в живой клетке.

22. Разобщение тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования.

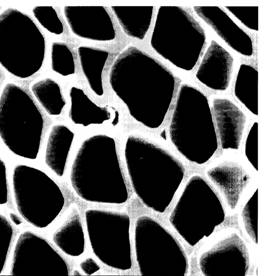
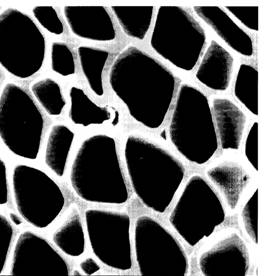
23. Основные причины нарушения молекулярного энергетического обмена.

24. Последовательность событий, при термогенном ответе организма на понижение температуры внешней среды.

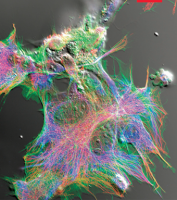
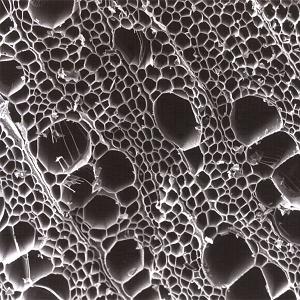
**5. Иммобилизация ферментов**

Практическое применение ферментов затруд­нено из-за их недостаточной технологичности, связанной с нестабильностью и экономической нецелесообразностью использования в гомогенных растворах. Эти недостатки могут быть преодолены с помощью иммобилизации ферментов, за счет их сорбции, кова­лентной пришивки, а также другими способами.

В качестве подложек для иммобилизации ферментов применяюся природные и синтетические матрицы органического и неорганического происхождения, например, целлюлозы, гели, синтетические полимеры, неорга­нические носители, оксид кремния, пористые стекла, окси­ды металлов. В зависимости от методов иммобилизации и дальнейшего использования связанных ферментов к но­сителям предъявляются определенные требования. На рис.7. представлены наиболее часто применяемые методы иммобилизации

**а б в**

**г д е**

Рис.29. Методы иммобилизации белков: а - ковалентное связывание; б - ковалентная сшивка в супермолеку­лы; в - сорбция за счет электростатических взаимодействий; г - сорбция за счет гидрофобного связывания; д - включение в гели и полимеры; е – микрокапсулирование

ферментов. При ковалентной иммобилизации (рис.29а) носитель должен легко модифици­роваться и активироваться. Для обеспечения эффективного связывания ферментов с носителями к последним привива­ются реакционноспособные группы. Иногда возникает не­обходимость в дополнительном активировании функциональ­ных групп фермента. Ковалентный метод иммобилизации применяется также для переведения макромолекул фермен­тов в нерастворимое состояние путем их объединения в супермолекулы согласно рис.29б. Необходимо отметить, что общим недостатком метода ковалентной иммобилизации, связанной с химической обработкой ферментов, является возможность изменения конформационной структуры ферментов, что часто приводит к потере ими физиологической ак­тивности.

Наряду с ковалентным связыванием ферментов с носи­телями большими возможностями обладают сорбционные ме­тоды иммобилизации (рис.29в,г), которые, как правило, не нарушают конформацию белков и тем самым сохраняют их высокую биокаталитическую активность.

Широкое распространение получили методы иммобили­зации ферментов с включением биокатализаторов в гель или пространственную структуру полимеров (рис.29д). На­пример, по этому способу ферменты растворяют в буферных растворах, содержащих гельобразующие реагенты. После­дующая специальная обработка смеси обеспечивает формирование отдельной, ферментсодержащей фазы. При иммоби­лизации биокатализаторов по этому способу в основном используют поли-2-оксиметакрилат и полиакриламидный гель, поливинилпирролидон и сополимеры оксиэтилметакрилата с 4-винилпирролидоном, а также ряд других полимерных ма­териалов. Основным преимуществом является сохранение биокатализаторами их нативной конформационной структуру, а следовательно, и высокой каталитической активности, чему способствует также отсутствие стерических помех, возникающих вследствие блокирования активных центров биокатализаторов участками полимерных матриц. Эти преиму­щества, однако, в полной мере не могут быть реализованы в ферментативных процессах ввиду неэффективности диффузии субстратов через сильно сшитую матрицу к ферментатив­ной системе.

Вокруг макромолекул ферментов можно создавать по­лупроницаемые микрокапсулы и волокнообразные капилляр­ные оболочки определенных размеров и пористости (рис.29е). При капсулировании наиболее часто ис­пользуют коллодиевые оболочки. Известны работы по вклю­чению биокатализаторов в липосомы, сформированные двой­ными фосфолипидными слоями, при этом ферменты локали­зуются в водной среде во внутренней полости липосомы. Относительно преимуществ и недостатков метода микрокапсулирования можно отметить, что они в основном ана­логичны способу включения биокатализа­торов в гели и полимерные материалы. Другие разновидности иммобилизации, в конечном счете, сводятся к какому-либо из уже рассмотренных способов или их комбинации. Чаще всего в практике иммобилизация ферментов происходит по смешанному типу, когда связы­вание биокатализаторов осуществляется сразу двумя или более способами.

Большинство ферментов представляют собой олигомеры, построенные из ограниченного числа однотипных или раз­личных субъединиц. Межсубъединичные взаимодействия играют важную роль в формировании уникальных каталити­ческих центров ферментов. Поэтому в ходе иммобилизации ферментов важно сохранить нативную четвертичную струк­туру ферментов. С другой стороны, иммобилизация свобод­ных субъединиц позволяет впоследствии легко решать задачи ферментной инженерии по созданию гибридных молекул биокатализаторов.

При построении оксидоредуктазных фермент-кофакторных систем, особенно с электрохимической регенерацией кофермента, наиболее важны сорбционные и ковалентные методы иммобилизации. Несмотря на принци­пиальные различия этих методов, в обоих случаях важным моментом, определяющим конечное состояние иммобилизо­ванной системы, в том числе ориентацию ферментных глобул относительно поверхности носителя, является первая стадия посадки глобулы на носитель под действием поля его по­верхности. Таким образом, и в случае ковалентной иммо­билизации важно управлять стадией сорбций фермента на носителе. С этой точки зрения рассмотрение конкретных методов иммобилизации целесообразно начать с сорбционных методов, уделив особое внимание описанию механизмов сорбции. Ясно, что углубленное исследование процессов сорбций ферментов невозможно без привлечения сведений об их структуре и свойствах. Из-за сложной структуры этих макромолекул возникает острая необходи­мость использования упрошенных модельных представлений.

**5.1 Сорбционные методы иммобилизации ферментов**

Сорбционное поведение белков зависит от множества факторов. Сорбция белков может быть обратимой, частично необратимой и необратимой. Во многих случаях она подчиняется уравне­нию изотермы сорбции Лэнгмюра. Однако иногда изотермы сорбции имеют более сложный характер. Ряд авторов наблюдали колоколообразные изотермы сорбции белков с максимумом. Однако нет уверенности, что по всей глубине зерна имеет место равновесие по от­ношению к внешнему раствору. Возможно, что эти изотермы по существу являются изотермами-изохронами, и их описа­ние невозможно без кинетического подхода.

Для объяснения сорбционного поведения белков было предложено несколько типов связей: водородные, гидрофоб­ные, ионные, электростатические, а также их комбинации. По имеющимся в литературе данным можно выбрать подхо­дящие условия для ионообменной хроматографии белков, для получения высокоочищенных ферментных препаратов и определить их свойства. Однако теория сорбции белков на ионитах в настоящее время разработана недоста­точно. Сорбция белков на ионообменных сорбентах зависит от степени ионизации ионогенных групп сорбента и белка, ко­торая определяется свойствами функциональных групп и среды. На сорбцию существенно влияют характер электро­лита, структура сорбента, его способность к набуханию. Ионное связывание фермента с противоположно заряженной матрицей тем прочнее, чем больше заряд белка, определяе­мый рН в фазе ионита. При ионообменном связывании в общем случае pH оптимума активности фермента может не совпадать с рН при котором имеет место наиболее прочное связывание фермента. Кажущийся сдвиг pH оптимальной активности фермента при его иммобилизации на ионите объясняется различием pH в фазе ионита и в рав­новесном с ним растворе. В ионите ферментативная систе­ма будет проявлять максимальную активность, если субст­рат и носитель имеют противоположные заряды ввиду того, что при этом субстрат концентрируется вблизи иммобили­зованного фермента. Минимальная активность наблюдается в системах, в которых субстрат и носитель имеют одинаковые заряды. Отрицательно влияет на актив­ность фермента также адсорбция на носителе заряженных продуктов, образующихся в результате реакции. Следова­тельно, в зависимости от знака зарядов будет иметь место либо повышение, либо понижение кажущегося сродства фер­ментов к субстратам. В то же время на концентрацию субстрата в микросреде фермента сильно влияет диффузия. Таким образом, можно констатировать, что активность им­мобилизованной системы определяется совокупностью свойств фермента, носителя, а также условиями, в которых осу­ществляется ферментативный процесс. Недостатком чистой электростатической иммобилизации является нестабильность получаемых систем в растворах с высокой ионной силой и при рН среды, в которой белковая глобула и носитель имеют одноименные заряды.

Для большинства синтетических гелевых ионитов с гидрофобной матрицей наблюдается необратимая сорбция белков, свидетельствующая о прочности комплекса белка с полиэлектролитом, обусловленной многосвязанностью белка с ионитом, включающей помимо кулоновского взаимодействия другие типы взаимодействий, такие, как водородные и гидрофобные связи. Тот факт, что при добавлении органического растворителя взаимодействие ослабляется, говорит в пользу этого заключения. В последнее время гидрофобные взаимодействия и специально созданные гидрофобные сорбенты широко используются для разделения и иммобилизации ферментов. Имеющиеся на по­верхности белковых глобул небольшие гидрофобные участки не могут существенно влиять на сорбцию на ионитах с гидрофильной матрицей. Однако при использовании гидро­фобных сорбентов эти участки начинают играть основную роль в связывании белка с сорбентом. Более того, они могут расширяться в результате первичного взаимодействия и конформационной перестройки белка, что может сопровож­даться потерей каталитической функции ферментов или их активацией. В случае сорбции белка на твердых поверх­ностях оба взаимодействующих компонента являются конформационно жесткими, и изменения конформации белка не­велики и находятся, по-видимому, в пределах регуляции его каталитической функции. Если же матрица сорбента обладает большой конформационной подвижностью, появляется возмож­ность многосвязанности поверхности белковой глобулы, а в случае гидрофобной подвижной матрицы - даже ее внедрения в «гидрофобную каплю» глобулы. Здесь может произойти нарушение взаимодействий в белке и, как следст­вие этого, существенная конформационная перестройка и потеря каталитической функции фермента. Такое действие на белок могут оказывать, например, синтетические иониты с гелевой гидрофобной матрицей.

Увеличение количества сшивки в макропористом ионите увеличивает емкость и обратимость сорбции вследствие увеличения поверхности пор. Таким образом, применяя для сорбции белков ненабухающие сильно сшитые макропористые сорбенты с очень развитой поверхностью пор, можно значительно увеличить обратимость ионообмен­ной сорбции белков. Поэтому именно эти сорбенты представ­ляют наибольший интерес для сорбционной очистки и хрома­тографического разделения биополимеров, где обратимость процесса - необходимое условие его успешного проведения. Напротив, для сорбционной иммобилизации белков и фермен­тов наиболее пригодны гелевые сорбенты, необратимость сорбции на которых в данном случае играет полезную роль. Примером пористых сильносшитых ионитов, используемых для сорбции белков, могут служить сорбенты на основе акриловых кислот получаемые с применением в качестве сшивающего агента триазина. Отличительными чертами этих сшитых карбок­сильных полиэлектролитов являются высокая проницаемость, малое изменение набухаемости при изменении pHсреды и высокая селективность сорбции органических ионов. Они мало подвергаются деформации даже при изменении степени ионизации карбоксильных групп, что почти исключает необ­ратимое взаимодействие и денатурацию белков. Исследовано взаимодействие белков с сильно сшитым макропористым карбоксильным катионитом Биокарб-Т показало, что в зависимости от условий проведения процесса может иметь место как неоднородное, так и однородное распределение сорбата по объему сорбента. При неравномерном распределении появ­ляется резкая движущаяся граница сорбционной волны. Де­сорбция в этих условиях протекает медленно, поэтому имеет место гистерезис изотерм сорбции.

Изучались свойства ферментов, адсорбированных на поверхности твердых носителей и монослоях липидов, предварительно сорбированных на этих носителях. Было показано, что сорбция на твердых поверхностях и монослоях липидов часто сопровождается существенным изменением активности ферментов, как в сторону активации, так и в сторону понижения каталитической активности. Потеря активности ферментов в большинстве случаев не связана с необратимой денатура­цией белка, а является результатом обратимого изменения конформации активного центра фермента под влиянием адсорбирующей поверхности. Многие мембранные ферменты хорошо адсорбируются на гидрофобных поверхностях, при этом не происходит сильной конформационной пере­стройки фермента, чем на гидрофильных поверхностях. Более того, при такой адсорбции с гидрофобной связью белка с поверхностью часто наблюдается эффект активации мембранных ферментов (в отличие от плазматических). Это озна­чает, что поверхность глобулярных ферментов содержит достаточно большие неполярные участки или эти участки легко обнажаются при небольших конформационных измене­ниях на поверхности белковой глобулы.

Была рас­смотрена полуэмпирическая модель взаимодействия белковой глобулы АДГ с электронейтральной гидрофобной поверхность. Энергию взаимодей­ствия (Fsorb) АДГ с обратнофазовым сорбентом рассчитывалась по аддитивной схеме, исходя из экспе­риментальных данных по гидрофобным взаимодействиям аминокислот и пептидов с обратнофазовыми сорбентами в соответствии с равенством:

, (23)

используя уравнение

Li/Li , (24)

где - энергия гидрофобного взаимодействия i – го радикала; n – число радикалов; Fi – энергия взаимодействия i – го аминокислотного радикала при его полном погружении в гидрофобный слой; ΔLi –длина участка радикала, погруженного в гидрофобный слой при данной ориентации глобулы белка; Li – длина радикала.

При расчете энергии гидрофобного взаимодействия использовались значения относительных свободных энергий F/RT взаимодействия аминокислотных радикалов с обратнофазовым сорбентом (таблица 7).

Таблица 7. Значения F/RT для аминокислотных радикалов

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Asp  0,173 | Glu  0,173 | Tyr  -0,694 | Ser  0,106 | Met  -0,449 | Trp  -1,758 | Phe  -1,085 |
| Val  0,288 | Leu  -0,485 | Ile  -0,485 | Gly  0,040 | Ala  -0,097 | Pro  -0,197 | His  -0,149 |
| Lys  -0,554 | Arg  -0,197 | Gln  -0,108 | Asn  -0,108 | Cys  0,090 |  |  |

По­лученные в результате расчета данные были представлены в виде перспективной азимутальной ортографической проекции уровней взаимодействия белковой глобулы при различных направлениях касания с гидрофобной плоскостью (рис.30). Из приведенных данных видно, что для

4

3

2

1

Рис.30. Перспективная азимутальная ортографическая проекция уровней гидрофобности алкогольдегидрогеназы: 1- 5 < F/RT < 10; 2-10 < F/RT < 20; 3 - 20 <F/RT < 30; 4- F/RT **>** 30, «меридианы» и «параллели» проведены через 9°.

глобулы АДГ имеются четыре области наиболее вероятной гидрофобной атаки сорбционной плоскости. При этом две из них находятся близко друг от друга на экваторе глобулы (Δφ=18) и лежат между двумя коферментными щелями фермента. Если гидрофобная поверхность представляет собой не плоскость, а цилиндрическую или сферическую пору с R≈28,0 нм, то осуществляется одновременная гидрофоб­ная атака по этим двум основным направлениям и их равно­действующая по направлению совпадает с осью «у» (рис.31). При этом в силу симметрии молекулы фермента обе коферментные щели расположены

R=280Å

9°

х

Z

9°

Рис. 31. Схема комплекса АДГ-НАД. Стрелки - направления максимального взаимодействия с гидрофобной поверхностью.

строго симметрично относи­тельно направления наиболее вероятной гидрофобной атаки. Доступность же субстратных щелей для этанола максимальна. Этот вывод подтверждается экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что при сорбцион­ной иммобилизации АДГ на модифициро­ванных силикагелях константа Михаэлиса максимальна для гидрофильного исходного силикагеля и минимальна для гидрофобных поверхностей. Важным условием сохранения фи­зиологической активности иммобилизованных биокаталитических систем, включающих кофактор, является его нативное расположение в активном центре ферментов.

Непосредствен­ное ковалентное связывание кофактора на жестких углерод­ных носителях, таких, как окисленные угли, карбохромы, не могут обеспечить благоприятные условия иммобилизации ФКС, что можно объяснить стерическими препятствиями, возникающими со стороны матрицы носителя, мешающими вхождению в активный центр фермента. Таким образом, при ковалентной иммобилизации кофакторов на жестких носите­лях становится необходимым введение промежуточного по­средника мостика (ножки), обеспечивающего необходимое расположение кофактора в активном центре ферментативных систем (рис.31). Длина применяемого мостика опре­деляется топологической структурой активного центра ис­пользуемого апофермента. Для ферментативной системы АДГ-НАД минимальный размер связующей цепи соответствует ~ 1,0 нм. Эта ве­личина получена при исследовании пространственной скелет­ной модели АДГ печени лошади, построенной по ренггеноструктурным данным Н.Eklund с соавт. в масштабе 1:1,5·108.Аминокислотные остатки, а также два остат­ка лизина в положениях 18 и 247, определяющие доступ к адениновому нуклеотиду кофермента НАД, достраивались к скелетной модели субъединицы фермента с помошыо мо­делей Стюарта-Бриглеба. Аминогруппа аденинового нуклео­тида, через которую осуществляется ковалентная пришивка кофермента, расположена на расстоянии 1,0 нм от групп фермента, находящихся на поверхности белковой глобулы. Для получения активной иммобилизованной на твердой по­верхности фермент-кофакторной системы НАД должен быть «пришит» как минимум через 8 С-С - связей в развернутой конформации.

Представлялось интересным изучить, каким образом НАД-зависимые дегидрогеназы ориентируются в липофильном слое биологических мембран. Для решения поставленной задачи использовалась лактатдегидрогеназа (ЛДГ) акулы, для которой известна пространственная структура. Молекула ЛДГ состоит из четырех симметричных субъединиц, каждая из которых имеет 331 аминокислоту. Программа расчет энергии взаимодействия белковой глобулы с гидрофобной поверхностью включала преобразование координат с установлением пространственного расположения 1324 α-С-атомов четырех субъединиц ЛДГ.

Результаты расчета ориентации ЛДГ на гидрофобной поверхности в виде перспективной азимутальной ортографической проекции приводятся на рис.32. На рис.33 представлено распределение уровней энергии гидрофобного связывания глобулы ЛДГ на поверхности полусферы, приведенной со стороны одного из полюсов молекулы белка. Из рисунка видно, что ЛДГ на экваторе имеет два участка (зеленый цвет), где белковая глобула проявляет гидрофильные свойства при различных направлениях касания с гидрофобной поверхностью. Четыре активных центра биокатализатора находятся на двух противоположных полюсах (по два на каждом) в области максимальной энергии гидрофобного связывания, которые на рисунках 1 и 2 обозначены черным цветом. При сорбции ЛДГ на гидрофильных сорбентах молекула апофермента будет соориентирована экватором к поверхности, обеспечивая свободный доступ субстратов и коферментов к четырем активным центрам биокатализатора, расположенным на полюсах молекулы фермента. При сорбции ЛДГ на гидрофобной поверхности будет наблюдаться связывание, при котором один из полюсов с двумя активными центрами будет сориентирован к гидрофобной поверхности, тогда как другой направлен в противоположную от носителя сторону. Такой тип ориентированной посадки молекулы белка в гидрофобном слое мембраны обеспечивает блокирование НАД в активном центре апофермента, сохраняя при этом активность фермент-кофакторной системы. Этот тип ориентации белков на гидрофобных сорбентах в дальнейшем будет использован при иммобилизации фермент-кофакторных систем на электропроводных носителях в процессах моделирования биологического генератора тока и электронтранспортных процессов.

**5.2. Ковалентные методы иммобилизации ферментов**

Ковалентные методы обеспечивают прочное связывание ферментов с носителями, что предполагает наличие у них реакционноспособных групп. Такие группы на носителе чаще всего получают предварительной активацией его поверх­ности, которая может осуществляться в достаточно жест­ких условиях с использованием широкого круга реагентов. В качестве реакционноспособных групп белков используются карбоксильные и аминные группы концов полипептианых цепей и другие функциональные группы аминокислот, входящих в полипептидные цепи (таблица 8).

2

3

1

4

Рис. 32.Перспективная азимутальная ортографическая проекция уровней гидрофобности поверхности лактатдегидрогеназы: 1- 0 < F/RT < 1; 2- 1 < F/RT < 2; 3 - F/RT > 2; 4- гидрофильная область

Рис. 33. Распределение уровней энергии гидрофобного связывания на поверхности полусферы.

Таблица 8. Аминокислоты, используемые для связывания белков химическими методами

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Аминокислоты | Реакционная функциональная группа | Аминокислоты | Реакционная функциональная группа |
| Глутаминовая к-та | карбоксильная | Цистеин | сульфидная |
| Аспарагиновая к-та | карбоксильная | Цистин | дисульфидная |
| Лизин | амино | Тирозин | фенольная |
| Оксилизин | амино | Триптофан | индольная |
| Серин | гидроксильная | Аргинин | гуанидиновая |
| Оксипролин | гидроксильная | Метионин | метилмеркаптановая |
| Оксилизин | гидроксильная | Фенилаланин | фенильная |
| Оксиглутаминовая к-та | гидроксильная | Аспарагин | амидная |
| Гистидин | имидазольная | Глутамин | амидная |

В настоящее время известны следующие методы ковалентной иммобилизации ферментов.

1. Реакции с образованием амидной связи

а) Азидный

OCH2COOH OCH2COOC2H5 OCH2CONHNH2

OCH2CON3 + H2N E OCH2CONH E

(Возможно взаимодействие с гидроксильной и меркаптогруппами)

б, в) Карбодиимидный

NR O NR O O

СООН + С СО – C + H2N - E - C - NH – E + R-NH-C-NHR

NR NH - R

O

R-N=C=N-R

NH2 + HOOC-E - NH - CO – E + R – NH – C – NH - R

г) Реакция с полимерными ангидридами

СО СОNH - E

О + H2N - E

СО СООН

г) Реакция с циклическими карбонатами

СО ОH

С = О + H2N - E

СО С – СО- NН – E

в) Реакция с использованием реактива Вудворта

СН2 SO-3 SO-3

СООН + С2Н5 N CH O O C + H2N - E

O C C2H5- NH – C - CH=C

OH SO-3

СОNH - E + C2H5- NH – CO - CH=C - C6H5

ж) Реакция в присутствии карбонилдиимидазола

O O

N

N

N

N

N

N

СООН + C C + H2N - E

N

N

СОNH - E + H

1. Реакция диазотирования

E – NH2 N = N – NH - E

OH

N = N – Cl + E OH N = N

E

N

СНН

N -- CN

СН

Е C N = N - C C - E

NH

NH

Аналогично могут вступать в реакцию гуанидиновая и меркаптановая группы.

1. Образование основания Шиффа

СОН + H2N Е СН = N Е

-H2O

1. Глутаральдегидный метод

-2H2O

NH2 + НОС – (СН2)3–СОН + H2N- Е N = CH – R – CH = N – E

1. Реакция с полимерными альдегидами

СНО СНОH

+ Н2N – E N - E

СНО СНОH

1. Галогенцианидный метод ОН NH

О С – NH - E

OH O – C ≡N O O

Н2N – E

BrCN

C= NH C = N – E

OH OH O O

OH O

О С – NH – E

1. Реакции с полимерами, содержащими активный атом галогена

а) Хлортриазиновый метод

N C – Cl N C – A - E

+HA-E

O C N O C N

ОН N C R N C R

N C Cl

+ Сl C N

N C R

NH2 N C – Cl N C A - E

+HA-E

NH C N H C N

N C R N C R

A – остатки окси-, амино-, гуанидино-, фенольной и SH – группы молекулы фермента.

б) Галоидалкильный метод

NH2 - E (CH2)n NH E

(CH2)n X +

OH - E (CH2)n O E

X – хлор, йод, бром.

1. Изоцианатный метод

NH2 + COCl2 N = C = O + NH2 - E NH - CO -NH – E

1. Тиоизоцианатный метод

NH2 + CSCl2 N = C = S + NH2 - E NH - CS -NH – E

10. Диизоцианатный метод

NH2 + O=C=N(CH2)6N=C=O + NH2 - E NHCONH(CH2)6NHCONH – E

11. Реакция с бис-оксираном

OH + CH2 - CHCH2O(CH2)4OCH2CH - CH2 + H2N – E

O O

OCH2CHCH2O(CH2)4OCH2CHCH2NH - E

OH OH

12. Реакция с эпихлоргидрином

H2N - E OCH2CHCH2NH - E

OH + ClCH2-CH - CH2 + OH

O HS – E OCH2CHCH2S - E

OH

13. Реакция с дивинилсульфоном

H2N - E O(CH2)2SO2(CH2)2NH – E

OH + CH2=CHSO2CH=CH2 +

HS - E O(CH2)2SO2(CH2)2S – E

При ковалентной иммобилизации должны быть соблюдены два основных условия: 1) активные группы носителя не должны вступать в реакцию с функциональными группами фермента, участвующими в каталитическом акте; 2) синтез должен производиться в условиях, исключающих дезактива­цию биокатализатора. В целях достижения высокой актив­ности ковалентно иммобилизованной биокаталитической системы иногда вводится бифункциональный посредник (мостик, ножка) между матрицей и молекулой фермента.

**Контрольные вопросы**

1. Основные способы иммобилизации ферментов на матрицах различной природы.

2. Технологические преимущества иммобилизованных биокатализаторов.

3. Сорбционные методы иммобилизации ферментов и фермент-кофакторных комплексов.

4. Ковалентные методы иммобилизации ферментов и фермент-кофакторных комплексов.

5 Реакционные функциональные группы аминокислот, используемые для иммобилизации белков.

6. Ориентация ферментов и фермент-кофакторных комплексов на гидрофильных и гидрофобных поверхностях.

7. Изменение суммарного заряда белков в зависимости от рН буферного раствора, изоэлектрическая точка рI.

8. Способы регенерации кофакторов и фермент-кофакторных комплексов.

9. Особенности иммобилизации коферментов и фермент-кофакторых комплексов на электропроводных носителях.

**6. Использование принципов биоэнергетики в**

**электроферментативных процессах**

**6.1. Регенерация коферментов в природе и технике**

В настоящее время промышленное применение нашли немногие ферменты, в основном класса гидролаз (до 90%). Общим недостатком ферментов в технологическим аспекте считается их термолабильность и неустойчивость в различных средах. Поэтому инженерная энзимология пошла пo пути создания гетерогенных катализаторов - иммобили­зованных ферментов. При этом в значительной мере был прео­долен вопрос лабильности ферментов.

Казалось бы, найден путь, открывающий дорогу фермен­тов в технологию. Действительно, это дало мощный толчок промышленному применению ряда ферментов и опять в основ­ном гидролаз. Чем же сдерживается приме­нение других ферментов? Попытаемся ответить на этот во­прос на примере ферментов класса оксидоредуктаз.

Основным отличием оксидоредуктаз от гидролаз, является их двухсубстратный характер, что лежит в ос­нове катализируемых ими реакций, Окисление одного суб­страта всегда сопряжено с восстановлением другого. Если оба субстрата доступны и дешевы, то практическое исполь­зование фермента в качестве катализатора рентабельно. Однако из ферментов подкласса оксидоредуктаз, включенных в каталог ферментов, в универсальных субстратах-коферментах никотинамидадениндинуклеотиде (НАД) или никотинамидадениндинуклеотидфосфате (НАДФ) нуждаются около 63% ферментов. Стоимость этих коферментов существенно превышает стоимость ферментов. При этом надо учитывать, что в отличие от ферментов, НАДФ в одноферментной системе может участвовать только в одном цикле реакции, т.е. за­трачивается в эквивалентных субстрату количествах. Естест­венно, что в таком варианте практическое использование ферментов невозможно. Признано, что практическое исполь­зование фермент-кофакторных систем невозможно без регенерации кофакторов. Для регенерации коферментов предло­жено несколько способов: ферментативный, химический, электрохимический, фотохимический и др.

Наиболее естественное решение задачи - использование природного принципа регенерации НАДФ. В клет­ках сумма НАДФ-зависимых окислительных ферментов всегда соответствует сумме НАДФ-зависимых восстанови­тельных ферментов. При этом НАДФ служит посредником передачи окислительных эквивалентов с одних субстратов на другие. На этом пути возникает необходимость использования мно­гокомпонентных (минимум двухкомпонентных) систем фер­ментов и субстратов, что значительно удорожает и усложняет процесс. Однако мультиферментные системы могут быть успешно заменены микроорганизмами и клетками. Была предложена регенерационная система на ос­нове клеток Clostridium butyricum, иммобилизованных в гелях альгината или агара. Восстановление НАДФ осуще­ствлялось водородом под давлением 100 атм. Данная реге­нерационная система НАД совместно с аланиндегидрогеназой использовалась для синтеза α -аланина из аммиака, пирувата и водорода. Показано, что прямой переход между дегидрогеназами одного класса невозможен из-за ограничения молекулярного вращения НАДН во время перехода. Для реализации процесса необходим предваритель­ный перенос кофермента в раствор. При переносе кофермен­та от дегидрогеназ класса А к классу В он должен пе­рейти в открытую конформацию. Взаимодействие двух НАДФ-зависимых ферментов противоположной хиральности облег­чается тем, что их локальные поверхностные электростатические потенциалы противоположны по знаку.

Методы химической регенерации коферментов в настоя­щее время разработаны слабо. Были предприняты попытки применения производных пиридиния, флавинов и других соеди­нений в качестве акцепторов электронов для неферментатив­ного окисления НАДН2 в целях его регенерации. При использовании флавинмононуклеотида (ФМН) удалось увеличить число циклов применения НАД до 35. Такой подход в отношении НАДФ-зависимых ферментов позво­ляет использовать субстратную специфичность ферментативного катализа. Однако при непрерывном проведении процесса значительно замедляется скорость реакции, лимитируемой не­каталитической регенерацией кофермента. Регенерация кофермента возможна электрохимическим методом в процессе окислительно-восстановительной реакции, протекающей на электродах, когда кофермент находится в иммобилизованном состоянии.

Следует отметить, что разработанные в настоящее время методы иммобилизации коферментов и других кофак­торов еще недостаточно пригодны для создания эффективных фер­ментативных электрохимических систем. В идеальном случае эти коферменты при сохранении своей физиологической активности должны быть связаны с основой электрода через систему ковалентных или иных связей, обеспечивающих эф­фективный перенос заряда с кофактора на электрод. Реализация этого механизма дает возможность осуществлять накачку необ­ходимой формы кофермента (окисленной или восстановленной) электрохимическим способом с последующим исполь­зования иммобилизованной фермент-кофакторной системы в синтезе различных биоорганических соединений.

6.2. **Биологические топливные элементы и**

**электроферментативные реакторы**

Создание топливных элементов — одна из наиболее важ­ных и в то же время сложных научно-технических проблем. В настоящее время предложено и исследовано большое число электрохимических генераторов различных типов. Среди них определенный научный и практический интерес представляют биологические топливные элементы, принцип работы которых основан на химических превращениях в био­логических системах. Считается, что биологи­ческие топливные элементы могут функционировать в мягких условиях, обладая высоким КПД по сравнению с химическими генераторами тока, которые работают при повышенных давлениях, температурах и используют в качестве электро­литов концентрированные растворы кислот и щелочей.

Известны ряд работ, посвящен­ных вопросам создания топливных элементов, где электри­ческая энергия генерируется с участием различных микроорганизмов. Сопряжение ферментативных процессов, протекающих в клетках, с электродными реакциями может быть осуществ­лено за счет нативных метаболитов или специально вводи­мых медиаторов.

Большую перспективу, особенно в медицине, имеет при­менение имплантированных в живую ткань биологических источников тока. Исследование в этой области проводятся в целях создания искусственного сердца и других органов живого организма, что позволяет решить одну из важных проблем современности - увеличение продолжитель­ности жизни человека. Электроэнергия в таких импланти­рованных системах поставляется за счет окисления глюкозы кислородом, содержащемся в гемоглобине. Концентрация этих двух компонентов в организме достаточна для непрерывной работы такого генератора.

В связи с вышесказанным исследовались анодные системы с применением глюкозооксидаз. Однако однозначного подтверждения участия этого фермента в электродном окис­лении глюкозы не было получено. Описан биохимический топливный элемент, действие которого также было основано на использовании глюкозооксидазы, но с приме­нением медиатора. В качестве электродов брали платиновые пластины с площадью поверхности 3 см2, В анодной части элемента происходило ферментативное окисление глюкозы, в ходе которого восстанавливался кофермент ФАД. Окислен­ный ФАД регенерировался под действием промежуточного переносчика электронов -N-метилфеназина (NМФ) или дихлориндофенола (ДХИ), окисление которых протекало на аноде. На катоде элемента восстанавливался молекулярный кислород. В таких системах достигнуты токи до 1 мА/см2.

Из ФАД-зависимых ферментов кроме глюкозооксидазы наиболее перспективны для электродных систем являются оксидазы аминокислот. Однако детальное изучение систем, включающих глюкозооксидазу, оксидазу D - аминокислот показало, что глюкозооксидаза является более подходящим ферментом для получения тока, чем D -аминокислотная оксидаза. Глюкозооксидазная система может генерировать разность потенциалов 300-350 мВ по сравнению с 175-225 мВ для D - аминокислотной оксидазы. Столь заметные отличия в способности генерировать ток связывают с различным содержанием ФАД в молекулах ферментов. Апофермент глюкозооксидазы содержит две молекулы ФАД, тогда как апофермент оксидазы D - аминокислот - только одну. В целях увеличения потенциалов, генерируемых дан­ными системами, рекомен­дуют добавлять небольшое количество порошкообразного же­леза в анолит, что увеличит потенциал соответственно до 750 и 630 мВ для глюкозооксидазы и оксидазы D -ами­нокислот. Влияние элементарного железа на потенциал объясняется ускорением окисления ФАДН в ФАД+ по реакции

ФАДН +Н+ + Fe0 ↔ ФАД+ + Н2+ Fe2+ + 2е-

Другие формы железа, например, двухвалентные и трехва­лентные ионы в составе гема не дают такого эффекта.

Предложен биоэлектрохимический топливный элемент, в котором генерация тока осуществляется в результате восстановления О2 до Н2О на платиновом катоде и окисления 2,6-дихлорфенолизофенола (ДХФИФ) на аноде в ана­эробных условиях. Регенерация ДХФИФ в анодной камере осуществляется D-глюкозооксидазой с превращением D-глюкозы в D-глюконовую кислоту или ксантиноксидазой с превращением ксантина в мочевую кислоту и затем в продукты ее электрохимического окисления. Замена платинового катода на золотой вызывает в катодной камере восстановление О2 до Н2О. Полагают, что предложенный биоэлектрохимический топливный элемент можно использовать для синтеза различных химических про­дуктов. В другом топливном элементе использовали иммо­билизованную глюкозооксидазу, включенную в полиакриламидный гель или сшивкой с помощью глутарового альдегида в присутствии платиновой сетки. Плотность тока на аноде, включаюшем глюкозооксидазу, при окислении глюкозы составила 30 мА/см2. Для удаления Н2О2 совместно с глюкозооксидазой иммобилизовали каталазу.

В качестве анодного процесса в топливных элементах может использоваться процесс окисления лактата при участии цитохрома В2, водорода при участии гидрогеназы, в том числе с добавками медиаторов.

Показано, что окисление субстратов на анодах может протекать в присутствии НАДФ-зависимых дегидрогеназ. При этом НАДФ может являться электрохимически актив­ным посредником этого процесса. Следует отметить, что эффективностъ таких систем не высока. Скорость окисления суб­стратов в НАДФ - зависимых электроферментативных системах может быть существенно увеличена при введении медиаторов, легко окисляющих НАД, например феназинметосульфата.

Японскими исследователями был описан топливный элемент, в котором электрический ток возникает за счет окислительно-восстановительной реакции с участием НАДФ. Анодом здесь служила платина, катодом - кислородный электрод; католит и анолит были разделены ионообменной мембраной. Ток в этом элементе генерировался при превра­щении D-глюкозы-6-фосфата (Г-6-Ф) в 6-фосфорглюконат (ГК-6-Ф) по схеме 16. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная

Глюкоза-6-фосфат-

дегидрогеназа

е-

½ О2

Н2О

Г-6-Ф

ГК-6-Ф

НАДФ+

НАДФН

Н+

(16)

система давала напряжение 150 мВ и плотность тока 0,5 мА/см2. Было отмечено, что количество электричества, выделяющееся в результате электрохимического процесса, значительно пре­вышает то, которое теоретически может быть получено от взятого для реакции количества кофермента НАДФН.Считают, что здесь имеет место циклическая электрохими­ческая регенерация кофермента. Проводилось более глубокое изучение элемента с использованием НАД-зависимых систем. В качестве ферментов они использовали ксантиноксидазу и глутатионредуктазу. В результате был зафиксирован ток, генерируемый по схеме 17. Замедление реакции на аноде, обнаруженное в ходе исследования таких

Фермент

Н2О

1/2О2

Восстан. форма водородоакцеп.

Окислен. форма

водородоакцеп.

Топливо

(восстан.

субстрат)

Продукт

окислен.

НАД+

е-

(17)

Н+

НАДН

Фермент

систем, авторы объясняют адсорбционно-десорбционными свойствами платинового электрода. Они считают, что продукты реакции быстрее адсорбируются на электроде, чем исходные вещества, и активные участки по­верхности электрода занимаются ими в первую очередь. В целях интенсификации анодной реакции предложено вводить в систему вещества, связывающие водород, такие, как метиленголубой, метилвиологен, глутатион, малахитовый зе­леный, тиобензофенон, флавин, а также окислительно-восста­новительные пигменты. Под влиянием ферментов эти вещества приобретают способность соединяться с водоро­дом, окисляя НАДН.

Отметим, что для топливных элементов целесообразно в качестве органического субстрата использовать не глю­козу, как это делается в большинстве современных работ, а более энергоемкие субстраты - спирты или даже углево­дороды. Большие перспективы в этом отношении открывают интенсивно развивающиеся исследования в области микробиологической переработки нефти и изучения ответственных за окисление углеводородов ферментов. В литературе имеются сообщения о выделении НАД-зависимых фермента­тивных систем, способных окислять спирты до углекислого газа, т.е. производить их полное «холодное сжигание», что очень важно для топливных элементов.

Ряд исследователей обнаружил ток в цепи топливных элементов, в которых использовалась НАД-зависимая ферментная система спирт-алкогольдегидрогеназа. В предложенном J.Davis биотопливном элементе катодное и анодное простран­ства разъединены катионообменной мембраной. В анодное пространство вводили метанол, алкогольдегидрогеназу и ме­диатор. Материалом электродов служила платиновая сетка. Здесь в результате ферментативной реакции образовывалась восстановленная форма медиатора, которая затем электро­химически окислялась на электроде. При этом электроны с анода по внешней цепи поступали на катод, где восстанавливался кислород с образованием воды. Формиат, на­капливающийся в процессе работы элемента, ингибирует АДГ. Для устранения этого недостатка предлагается исполь­зовать НАД-зависимую формиатдегидрогеназу (КФ1.2.1.2). Применяя медиатор фенозинметосульфат. Был предложен другой тип ферментного топливного элемента с использованием АДГ. В анодном отделении элемента происходило фермен­тативное окисление этанола с одновременным восстановле­нием НАДН. Регенерация кофермента осуществляется на пла­тиновом электроде в присутствии медиатора. Величина генерируемого тока пропорциональна логарифму концентрации НАД и этанола в пределах 10-6 - 2 · 10-4 М и 10-6 - 2·10-2 М соответственно. В качестве НАД-зависимой дегидрогеназы с успехом использовали бактериальную метанолдегидрогеназу с добав­ками медиаторов - N -метилфеназиния и N -этилфеназиния. В топливном элементе на основе этой ферментативной системы получен ток 1 мА/см2.

Вышеизложенные механизмы электронного переноса использовались при моделировании биологического генератора тока, схема работы которого приводится на рис.34.

Внешняя цепь

2е-

É

E

SH2 S

С·Н

С·Н

Катод

Анод

P PH2

С

С

2H+

Мембрана

Рис. 34. Схема биологического генератора тока

Е, É – ферменты, участвующие в восстановлении и окислении субстратов S, SН2, соответственно; С и С·Н – окисленная и восстановленная формы кофермента; РН2, Р - продукты ферментативных реакций

Электроферментативная ячейка состояла из двух камер - катодной и анодной, которые были разделены ионообменной мембраной. Согласно схеме в генераторе тока протекали два процесса - электрохимический, связанный с окислением и восстановлением (регенерацией) коферментов, и другой – ферментативный, который обеспечивал «сжигание» субстратов в результате окислительно-восстановительных реакций. На аноде в результате ферментативной реакции образовывалась восстановленная форма кофермента С·Н, которая затем, в результате электрохимической реакции, окислялась до С. На катоде происходило ферментативное окисление кофермента, сопровождающееся электрохимической «накачкой» его восстановленной формы. Величина напряжения (φ), генерируемая биологическим генератором тока, может быть определена по уравнению 18:

· + iR (18),

где φА и φК – потенциалы, соответственно на аноде и катоде; R –универсальная газовая постоянная; Т – абсолютная температура; F- число Фарадея; рНА и рНК – рН в прикатодном и прианодном пространствах; [C]А, [CH·Н]А, [C]К, [CH·Н]К - концентрации обеих форм кофермента на аноде и катоде; iR – омическое падение потенциала.

В качестве модельной ферментативной системы был использован иммобилизованный на электропроводном носителе фермент-кофакторный комплекс АДГ-НАД. При введении в анодную камеру этанола в буферном растворе происходило его ферментативное окисление до ацетальдегида, при этом кофермент НАД восстанавливался до НАДН, согласно ферментативной реакции:

С2Н5ОН + НАД+  СН3СНО + НАДН + Н+ (25)

АДГ

Электрохимическая регенерация НАД+ из НАДН происходила на электроде по реакции НАДН НАД+ + Н+. Одновременно в катодной камере протекал электрохимический процесс, сопровождающийся электрохимическим восстановлением на электроде кофермента НАД+ до НАДН по реакции НАД+ + Н НАДН. Ферментативная регенерация НАД+ из НАДН происходила по схеме 26. При этом лактальдегид восстанавливался до 1,2 - пропандиола.

+2 е-

-2 е-

АДГ

СН3СН (ОН)СНО + НАДН + Н+  СН3СН(ОН)СН2(ОН) + НАД+ (26)

В вышеописанном топливном элементе возникала ЭДС до 87 мВ, а в системе генерировался ток плотностью до 0,58 мА/см2. Для определения природы тока проводилось тестирование исследуемой системы путем ввода в электролит цианида калия, который ингибировал биокаталитическую реакцию, приводя к прекращению генерации тока.

Была испытана модель топливного элемента с использо­ванием иммобилизованной на электропроводном, углеродном носителе фермент-кофакторной системы АДГ-НАД. Для исключения возможности протекания побочных процессов применяли симметричную электрохимическую ячейку, состоящую из двух полуэлементов (рис.35). Работа биологического генератора тока основывалась на использовании обратимых ферментных реакций:

С2Н5ОН + НАД АДГ СН3СНО + НАДН + Н+

СН3СНОНСН2ОН + НАД+ АДГ  СН3СНОНСНО + НАДН + Н+

Для исключения возможности протекания побочных процессов применяли симметричную электрохимическую ячейку, состоящую из двух полуэлементов. При введении в одну из камер окисленной, а в другую вос­становленную формы

1

3

В

2

2

А

4

5

Рис. 35. Конструкция симметричной электрохимической ячейки: А, В - камеры полуэлементов; 1 - корпус топливного элемента; 2 – графитовый электрод; 3 электрод сравнения; 4 - ионообменная мембрана; 5 -трубопроводы для циркуляции субстратов

субстрата, в системе генерировался ток. Общую схему ферментативных и электрохимических процессов, имеющих место в топливном элементе, можно представить в виде схемы 27. Для выяснения природы возникающего тока

Внешняя электрическая цепь

АДГ

CН3CHОCH2OH

CH3CHОHCHO

C2H5OH

CH3CHO

НАД+

НАД+

2е-

(27)

2Н+

Н+

Н+

Катионообмен. мембрана цепь

АДГ

НАДН

НАДН

осуществля­лись различные тесты. В системе отсутствовали ЭДС и ток до введения в полуэлементы соответствующих субстратов. На рис.36 представлена

0,4

0,2

I, мА

V

I II III IV

10 30 50 70 90 t, мин

Рис. 36. Зависимость тока от времени при последовательном введении в рабочую камеру полуэлемента компонентов ферментативной си­стемы. Сорбент - активированный карбохром, скорость рециркуляции субстрата 3,5 мл/мин, общий объем электролита 5 мл. Растворы: I - 0,015 М карбонатный буферный раствор с рН 9,0; II - 0,010 М НАДН; III - 1,2·10-5М АДГ; IV - 0,040 М C2H5OH на фоне 0,500 М хлористого натрия; V – 10-3 М КСN 5 мкл.

зависимость тока от времени, начиная с момента введения в систему лактальдегида, вос­становление которого лимитировало генерацию тока. Относительно большой индукционный период, который наблюдается в этих опытах на кривых ток-время, обусловлен недоста­точно быстрой рециркуляцией субстратов. Как видно из рис. 36, введение в электролит 5 мкл цианида калия в концентрации 10-3 М полностью ингибирует процесс и пре­кращает генерацию тока. Это указывает на ферментативную природу протекающих в системе процессов. Подтверждением служит также увеличение концентрации 1,2-пропандиола в полуэлементе, содержащем лактальдегид, что было установ­лено прямым анализом. Из рис.37 видно, что величина генерируемого элементом тока

I, мА

0,6

1

0,4

2

0,2

3

10 30 50 70 t, мин

Рис. 37. Зависимость тока от времени при введении в рабочую камеру полуэлемента раствора лактальдегида с различной концентрацией. Условия те же, что и на рис. 25. Растворы лактальдегида в 0,015 М карбонат­ном буферном растворе с рН 9,1 на фоне 0,5 М хлористо­го натрия: 1-0,0436 М; 2-0,030; 3 - 0,000 М

зависит от концентрации лактальдегида в катодной камере. По мере расхода лактальдегида ток падает. Однако последующее введение субстрата вновь ведет к возрастанию тока (рис.38). Опыт показывает, что данная ферментативная система

0,4

0,2

I, мА

10 30 50 70 90 t, мин

Рис.38. Зависимость тока от вре­мени при многократном введении в ра­бочую камеру полуэлемента лактальдеги­да. Условия те же,что и на рис.25. Стрелками указаны моменты введения 0,040 М раствора лактальдегида в 0,015М карбонатном буфере с рН 9,0 на фоне 0,5 М хлористого натрия

может работать в течение нескольких суток без потери каталитической активности. Увеличение ско­рости рециркуляции субстрата приводит к значительному возрастанию тока (рис.39), что обусловлено интенси­фикацией

I, мА

0,4

0,2

V, мл/мин

3,0

2,0

1,0

Рис. 39. Зависимость тока от скорости рецирку­ляции раствора этилового спирта через рабочую каме­ру полуэлемента. Концент­рация спирта 0,040 М в 0,015 М карбонатном бу­ферном растворе с рН 9,1 на фоне 0,5 М хлористого натрия

переноса субстрата к ферментативной системе. С помощью вышеописанной электрохимической ячейки была смоделирована работа топливного элемента с одним ферментативным полуэлементом. Принцип работы этого элемента, имеющего ферментативный катод и кислородный анод, понятен из схемы 28.

C2H5OH

CH3CHO

О2

½ О2

Н2О

Н2О2

АДГ

2Н+

НАД++

(28)

2е-

Н+

НАДН

Анод

Катод

Большой интерес представляют работы И.В.Березина с соавторами, предложивших модель топливного элемента, в котором ток генерируется за счет гидрогеназного действия фермента. Электроны с активного центра фермента на пирографитовый электрод переносятся с помощью медиатора – метилвиологена. Обратимо окисляющийся и восстанавливающийся метилвиологен (MB) в данной системе имеет окислительно-восстанови­тельный потенциал пары МВвосст/МВокисл на пирографитовом электроде -0,44 В при рН, равном 7,0. Известен также и другой тип ферментного полуэлемента, в котором используется гидрогеназная система. Функцио­нирование полуэлемента основывалось на окислении водорода, образующегося на аноде, в результате ферментной реакции. Было показано, что плотность генерируемого тока пропор­циональна активности фермента.

Для восстановления кислорода до воды на катодах топ­ливных элементов в качестве биокатализаторов использовали цитохром С-оксидазу, терминальную оксидазу, о-ди-фенолоксидазу и лакказу. Наилучшие результаты для перечисленных ферментов были получены для лакказы. Из других биокатализаторов катодных процессов сле­дует отметить пероксидазу в процессах восстановления перекиси водорода.

Приведенный обзор литературных данных свидетельствует о том, что успехи в области создания ферментативных топ­ливных элементов пока довольно скромны. Известные биоэнергетические установки еще не обладают достаточной мощностью, чтобы серьезно конкурировать с широко используемыми сейчас другими источниками энергии. Фактором, в не­малой степени, сдерживающим развитие ферментной биоэнергетики, является ограниченная стабильность даже иммобили­зованных ферментов.

**Электроферментативные реакторы.** Интересным и важным направлением являются исследования в области создания электроферментативных реакторов. Применение их открывает возможности для получения ряда биохимических препаратов. Высокая селективность и скорость ферментативных реакций обеспечивают эффективное получение целевых про­дуктов с высоким выходом и минимальным количеством сопутствующих соединений. Ферментативные реакторы перспек­тивны для проведения реакций с участием сложных биоорганических молекул, трансформация которых известными хими­ческими методами неэффективна. Ферментативные методы обеспечивают направленное введение необходимых групп в сложные молекулы, дают возможность разделять рацематы, получать определенные стереоизомеры. Наиболее перспективно применение ферментных реакторов, включающих иммобилизованные полиферментные комплексы, катализирующих цепь химических превращений в единой технологической схеме. Приведем ряд примеров, описывающих функционирование реакторов, включающих иммобилизованные ферменты. Для уда­ления глюкозы из концентрированного фруктозного сиропа использовался реактор, заполненный глюкозооксидазо-каталазной системой. Ферментный комплекс иммобилизовали на частицы нерастворимого белка, используя глутаровый аль­дегид. По окончании процесса образовавшаяся глюконовая кислота отделялась на ионообменной колонке.

Предложена система для непрерывного превращения глюкозы в глюконовую кислоту, состоящая из форреактора, обеспечивающего на­сыщение раствора кислородом, и реактора, заполненного плотным слоем иммобилизованной ферментной системы. Ре­актор опробован для удаления кислорода из пива. Время полуинактивации ферментного комплекса составляло около 2 мес. Иммобилизованную каталитическую систему получали путем радикальной сополимеризации акриламида и ме­тиленбисакриламида в присутствии дрожжевой формиатде­гидрогеназы и высокотемпературной малатдегидрогепазы из сердца свиньи. Для получения малата был использован реактор, заполненный гетерогенным биокатализатором. Скорость образования малата за 3 сут уменьша­ется более чем в 10 раз, система с термофильной малатдегидрогеназой функционировала в колоночном реакторе в точение 3 недель с уменьшением эффективности не более чем на 35-40%.

Принципиально новым в биотехнологии является разра­ботка электроферментативных реакторов. Главная особенность таких реакторов заключается в постоянной электрохимичес­кой регенерации фермент-кофакторного комплекса, а точнее, его кофактора, сопряженной с ферментативной реакцией окисления или восстановления субстратов по схеме 29

НАДН

Pox

НАДН

Sox

E

H+

H+

(29)

2Н+, 2е-

2Н+, 2е-

Sred

Pred

E

НАД+

НАД+

Анод

Катод

Использование в реакторах иммобилизованной фермент-кофакторной системы на электродных носителях предполагает циркуляцию кофермента между апоферментом и электродом аналогично работе медиаторов. Исследовалась модель такого реактора с сорбционно иммобилизованной фермент-кофакторной системой АДГ-НАД. Общий принцип его работы заклю­чается в подаче исходного продукта реакции - спирта, при помощи перистальтического насоса в реакционную камеру, заполненную гетерогенным биокатализатором. Последний по­лучали последовательной сорбционной иммобилизацией ко­фермента и фермента на окисленном угле или аминированном карбохроме. Электрохимическую регенерацию НАДН в НАД+ осуществляли при контролируемом потенциале 0,7 В. В случае образования газообразных продуктов предусмотрен их вывод из камеры. Количество ацетальдегида определяли газохроматографическим методом. Экспериментально установлено, что в течение 1 ч работы реактора получается ацетальдегида в 46 раз больше, чем должно бы получиться в ра­счете на исходное количество сорбированного кофермента. Сделан вывод о том, что в реакторе имеет место электро­химическая регенерация НАД+. Число циклов регенерации кофактора рассчитывалось относительно общего количества кофермента, сорбированного на электропроводный носитель. Однако на основании предыдущих исследований было уста­новлено, что только 0,6% связанного с окисленным углем и карбохромом кофермента проявляет физиологическую актив­ность. Поэтому действительная величина регенерации ко­фактора намного выше. Присутствие кислорода на поверх­ности углеродных носителей стимулирует электрохимическое окисление НАДН и, наоборот, затрудняет его электрохими­ческое восстановление.

Электрохимическая регенерация НАДН из НАД+ по (29), как известно, связана с его димеризацией и диффузией в раствор электролита. Однако имеются данные о том, что кроме потенциала восстановления НАД+, равного - 0,8 В, при котором происходит образование димера по одноэлектронному механизму, существует и другой - (-1,8В), соответствующий двухэлектродному восстановлению неактивного димера в активный НАДН. Реакция восстанов­ления в этом случае, видимо, связана с гидрированием во­дородом, образующимся из воды:

2H2O +2e- = H2 + 2ОH-

Под влиянием активных атомов водорода, адсорбированных на поверхности электропроводного носителя, вероятно, вос­станавливается димерная форма кофермента. Таким образом, можно предполагать, что в целях исклю­чения образования димера, регенерацию НАДН из НАД+ следует проводить при потенциале -1,8В (схема 30). Важной особенностью электрохимических

СОNH2 Н Н

СОNH2

R – N N - R + 2H\*адс 2 (30)

N

СОNH2

R

ферментатив­ных реакторов является возможность использования их в проточном непрерывном режиме. Описанный выше реактор может быть применен для большого числа ферментативных процессов. Благодаря сходству физико-химических свойств коферментов НАД и НАДФ, а также гомологичности третичной структуры НАД-зависимых ферментов, они могут катализировать большое число кофактор-зависимых фермен­тативных реакций. Кроме того, могут найти применение также иммобилизованные на электропроводных носителях ФАД - и ФМН -зависимые ферменты, принцип работы которых аналогичен НАД-зависимым ферментативным системам. Об­ласть использования иммобилизованных на электропроводные носители фермент-кофакторных систем еще более расширя­ется благодаря нестрогой специфичности ферментов относительно второго субстрата. Однако проблема электроферментатинного синтеза на сегодняшний день во многом остается неисследованной. В перспективе электрохимические ферментативные реакторы Могут быть использованы в фармацевтической промышлен­ности для получения стероидов, аминокислот, а также других соединений.

**6.3. Электроферментатинные методы анализа**

Аналитическая химия, является областью, где ферментные процессы используются наиболее широко. Это связано с микромасштабом реализуемых процессов, поэтому в значительной мере снимаются вопросы высокой стоимости и трудности обеспечения широкой номенклатуры производимых ферментов. Мощный толчок развитию ферментных методов анализа дали исследования по иммобилизации ферментов. В результате в настоящее время в основном используются аналитические системы с иммобилизованными биокатализаторами. Рас­смотрим новые направления и тенденции применения фер­ментативных систем, иммобилизованных непосредственно на электродных материалах. В связи с этим сле­дует отметить, что на постсоветском прлостранстве ведущее место в области созда­ния аналитических электроферментативных систем принад­лежит литовской школе биохимиков. Электроферментативные ме­тоды являются одной из наиболее бурно развивающихся ветвей ферментативных методов анализа. Сами по себе электрохимические методы и раньше находили широкое при­менение в анализе органических и биоорганических соеди­нений. Преимущество этих методов заключается в быстроте анализов, легкости их автоматизации и организации массо­вых определений. Недостаток - их низкая селективность, что отражается на точности определения различных веществ. Поэтому круг анализируемых соединений до недавнего вре­мени ограничивался веществами с высокой электрохими­ческой активностью. Однако для многих соединений реакции окисления, а в ряде случаев и восстановления термодинамически выгодны и протекают медленно лишь по чисто кине­тическим причинам. Таким образом, подбором соответству­ющих селективных катализаторов можно разработать электро­химические методы анализа многих соединений. При этом во всех методах должен в принципе реализовываться рецир­куляционный механизм электрохимического катализа:

Sred + Coх ↔ Soх + Cred (31)

Cred ↔ Čred (32)

Čred ↔ Coх + ne- (33)

Čoх ↔ Coх (34)  
где Sred, Soх, и C**red,** Coх - частицы субстрата (реагента) и вспомогательного компонента каталитической системы, обеспечивающего перенос электрохимических экви­валентов в восстановленной и окисленной формах в раст­воре; Čred иČoх эти же частицы на поверхности электрода. В общем случае реакция 31 проходит только в присутствии катализатора и протекает по более сложному механизму.

Использование в качестве катализаторов ферментов резко расширило круг анализируемых соединений и подняло чувст­вительность и селективность анализа. В электрофермента­тивных аналитических процессах вышеприведенная схема в наиболее чистом виде реализуется на примере систем, включающих НАДФ - зависимые ферменты. Для примера приведем схему 35 функционирования

2е-, 2Н+

С2Н5ОН

СН3СНО

НАД++

(35)

Н+

Анод

НАДH

ферментного анализатора спирта, в котором используется фермент-кофакторная си­стема АДГ-НАД. В этом случае в качестве вспомогательных компонен­тов электрокаталитической системы (Coхи Cred**)** вы­ступают окисленная и восстановленная формы кофермента НАД. Представленная система обеспечивает электрохими­ческую регенерацию посредника ферментативной реакции - кофермента НАД и появление токов, пропорциональных скорости ферментативного окисления спирта.

В целях многократного использования каталитических систем в анализе в последнее время применяют иммобили­зованные ферменты. При этом, однако, часто сохраняется пространственная разобщенность каталитического и электрохимического процессов, вследствие чего общая скорость электрокаталитической реакции в значительной степени тор­мозится транспортом кофактора из зоны каталитической реакции на поверхность электрода, и обратно. В связи с этим очевидна целесообразность максимального пространственного совмещения всех стадий электроферментативного процесса, что возможно только при непосредственной иммо­билизации кофактора и фермента в виде их комплекса на электроде или электропроводном материале, находящемся в контакте с ним. Этот вывод был проверен на примере АДГ, иммобилизованной на углеродных носителях. Предложенные методы сорбционной иммобилизации фермент-кофакторной системы на электропроводных мате­риалах отличаются простотой и позволяют «собирать» электро­каталитическую систему непосредственно в камере проточного электрода. При осуществлении сорбционной иммо­билизации оптимальная ориентация фермента на поверхности электродного материала может быть достигнута приложе­нием к нему соответствующего потенциала.

Электроды, получаемые на основе ферментов, иммоби­лизованных непосредственно на электродных носителях, представляют особый интерес, и со временем потребность в них возрастет.

К основным преимуществам таких электродных систем можно отнести улучшение их кинетических характеристик вследствие совмещения ферментативного процесса с электро­химической регистрацией субстрата или продукта фермента­тивной реакции на электроде. Был разработан ферментный датчик на спирты (рис.40), функционирующий согласно схеме 35. В реакционную

11

3

11

4

С

АС

W

6

10

5

Рис.40. Схема проточного амперометрического дат­чика: 1 - сосуд с буферным раствором; 2 - перистальти­ческий насос; 3 - шприц; 4 - резиновая мембрана; 5 - слой электроферментативного катализатора; 6 - ионообменная мембрана; 7 - рабочий электрод; 8 - вспомогательный электрод; 9 - электрод сравнения; 10 - нотенциостат; 11 – самописец

камеру анализатора помешали различные электропроводные носители, например,

аминированный или окисленный карбохром, угли. При потенциале 0,7В (н.к.э.), соответствующем электрохимическому окис­лению НАДН, осуществляли последовательную иммобилиза­цию кофермента НАД, а затем апофермента АДГ. Анализи­ровали проточным методом с импульсным вводом пробы. Введение в камеру субстрата - этилового спирта сопровождалось появлением токового сигнала. В качестве аналити­ческого сигнала может служить величина импульса тока и площадь пика на диаграмме (рис.41). Из рисунка видно, что при

1

ΔI,мка

ΔI,мка

30

30

10

2

20 40 t, мин

10

20 40 Q, мкмоль

Рис. 41. Примеры регистрации и градуировочных зави­симостей при анализе спиртов: 1 - н-бутиловый, 2 - эти­ловый, содержащий 0,5 М хлори­стого натрия.

увеличении количества вводимого этанола до 15 мкМ наблюдается линейная зависимость величины сигнала от концентрации субстрата. Чувствительность определения бутанола значительно выше, чем этилового спирта. Это свя­зано с более высокой субстратной специфичностью АДГ к бутанолу.

Кроме того, фермент-кофакторная система АДГ-НАД может быть использована в пастовом электроде. Пастовый электрод формируют следующим образом. Из 0,015 М фосфатного буферного раствора с рН 7,5 последовательно сорбируют кофермент НАД, а затем апофермента АДГ на угольном порошке. Пастовый электрод функционировал по схеме 35. С помощью полярографа снимают вольтамперную зависимость пастового электрода в буферном растворе, содержащем 0,5 М хлорида натрия. Затем, используя тот же буферный раствор, содержащий этиловый спирт, осуществляли ферментную реак­цию накопления восстановленной формы кофермента (НАДН) (3-15 мин). После истечения задаваемого времени сни­мали поляризационную кривую (рис. 42). Строили ка­либровочную характеристику силы тока от концентрации спирта при φ = 0,7В (н.к.э.). Электрод стабильно функ­ционировал в течение 20 сут. при его периодическом исполь­зовании без обновления поверхности пасты. Сенсор давал возможность определять концентрацию спирта в интервале 10-6-10-8 М.

Аналогичный пастовый этанолселективный электрод был получен путем адсорбции АДГ-НАД на саже ПМ-100. Система АДГ-НАД, сорбционно иммобилизованная на саже, обладала доста­точно высокой стабильностью,

I, мка

I, мка

б

1,6

0,8

9

lgC, моль/л

-6 -5 -4 -3

6

а

3

0,2 0,4 0,6 0,7 0,8 Е (н.к.э)

Рис. 42. Вольамперограмма (а) калибровочная характеристика (б) па­стового ферментного электрода при определении этилового спирта различ­ной концентрации: 1 - 0,015 М ка­лий- фосфатный буферный раствор с рН 7,5 + 0,1 МКСl; 2 – 10-6; 3 - 10-5 ; 4 - 10-4 ; 5 - 10-3 М/л

сохранялась в течение месяца при 4-6°С практически без потери каталитической актив­ности. Время отклика электрода с постоянно обновляемой поверхностью не превышает 1 мин. Линейная зависимость высоты волны окисления этанола от концентрации его в растворе наблюдалась в диапазоне 3·10-5-5·10-4 М. Применение в ферментном пастовом электроде защитной мембраны было причиной большого времени отклика датчика (60-70 мин), при этом диапазон определя­емых концентраций составлял 0,01-0,15 М. Был разра­ботан ферментный электрод, включающий лактатдегидрогеназную ферментную систему. Иммобилизация ЛДГ на поверхности цилиндрического стеклоуглеродного электрода обеспечивала регенерацию кофермента НАД. Изменение условий экспериментов позволяет модели­ровать ферментные и электрохимические реакции в условиях отсутствия диффузионных ограничений, когда поведение системы описывается кинетическими уравнениями ферментативных реакций.

В литературе приводятся данные по сенсорным системам, в которых в качестве медиаторов использовался фенозинметасульфат (ФМС), [Fe(CN)6]***-***4 и ДХФИФ. В состав электро­дов входили НАД- и НАДФ - зависимые ферменты: ЛДГ, АДГ, Г-6-Ф-ДГ, глутаматдегидрогеназа и ксантиноксидаза. НАДН и НАДФ, образующиеся в процессе ферментативной реакции, окислялись на аноде. Линейная за­висимость величины тока от концентрации лактата наблюда­лась до 10-15 мМ. Максимальный ток при окислении глюкозо-6-фосфата соответствовал 550 нА в присутствии 3 мМ НАДФ+ при рН 7,5.

Описанные в научной литературе сенсоры на основе НАД-зависимых ферментов базируются преимущественно на трех фермент-кофакторных системах - АДГ-НАД, ЛДГ-НАД, ГДГ-НАД. Однако номенклатура соединений, определяемых электроферментными методами, может быть значительно расширена.

Здесь уместно отметить, что в при­роде широко распространены также и ферментные реакции с участием НАДФ-зависимых биокатализаторов. Чтобы доста­точно полно представить возможности использования фер­ментных сенсоров, включающих коферменты в анализе, укажем что только НАД- и НАДФ - зависимые ферменты контроли­руют протекание около 70% окислительно-восстановительных каталитических процессов в живой клетке. Обратим внимание еще на одно важное преимущество биокатализаторов, недо­ступное для большинства разработанных неферментативных аналитических систем, - это способность давать количест­венную оценку содержания стереоизомеров в рацематах и сложных смесях водных биоорганических растворов. Используя ферменты L или D - арабинитолдегидрогеназу, или L -, или D -лактатдегидрогеназу, можно определять стереоизомеры арабинитола и лактата.

Был предложен способ определения Н2О2 с по­мощью угольного электрода с адсорбированной на нем пероксидазой. В качестве субстрата пероксидазной реакции выступал о-дианизидин. В аналитической ферментной системе использовались серебряный катод и угольный элект­род с иммобилизованным на нем ферментом. Измеритель­ная схема включала нагрузочное сопротивление 200 кОм. Линейная зависимость сигнала от концентрации наблюдалась для концентраций 5-1000 им. Определяемое количество H2О2 10 - 2000 пмолей. Время одного измерения - 1 мин, количество вводимого образца - 1 мкл.

Разработана конструкция индикаторного электрода для проточно-инжекционного анализа. Электрод изготавли­вался из сетчатого стеклографита с химически модифициро­ванной поверхностью путем ковалентного присоединения глю­козооксидазы. Контролировали ферментативную реакцию по количеству образующейся перекиси водорода. Электрод пред­варительно выдерживали при 0,9 В (н.к.э.). Гидродинами­ческие и электрохимические свойства разработанного электро­да делают его перспективным для использования в качестве детектора глюкозы. Воспроизводимость методики характеризуется относительным стандартным отклонением 0,02. Ток в системе линеен в области концентраций 2,5-10 мМ при чувствительности 400 нА/мМ. Электрод сохраняет 30% своей первоначальной активности при хранении в течение 40 сут при 2°С.

Был установлен прямой электронный транспорт между ковалентно иммобилизованными флавоэнзимами и модифицированной поверхностью графито­вого электрода. Глюкозооксидазу, L-аминокислотную оксидазу, ксантиноксидазу ковалентно связывали с поверхно­стью графитового электрода, модифицированного хлористым циануром. При этом электроны переносились непосредственно с модифи­цированного электрода. Были обнаружены пики восстанов­ления флавинадениндинуклеотидов. Показано, что для ковалентно связанного флавоэнзима пики восстановления сущест­венно выше по сравнению с пиками для ферментов, находя­щихся в растворе или адсорбированных на поверхности электродов. Величина тока определяется только взаимодей­ствием флавоэнзима с субстратом и не зависит от реакций, протекающих в растворе. Ферментные электроды могут быть быстродействующими и достаточно селективными в области концентраций 10-5 -10-2 М.

Биокаталитический процесс исследовался с использованием дискового электрода с иммоби­лизованной на нем глюкозооксидазой. В качестве дискового электрода применяли окисленный графит, платину, углеродный пастовый электрод. Глюкозооксидазу связывали с поверх­ностью электрода сорбционным и ковалентным методами. Показано, что связанный фермент на поверхности электрода ведет себя подобно тонкому слою толщиной 1-50 мкм. За протеканием биокаталитического процесса наблюдали по образованию перекиси водорода. Отмечено, что иммобилизованный фермент не оказывает какое-либо препят­ствие электронному переносу на дисковый электрод. Изменяя скорость вращения электрода, исследовали массовый перенос. При высоких скоростях вращения порядка 1600 об/мин система с иммобилизованным ферментом функционирует без диффузионных ограничений, и скорость процесса подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен.

Завершая рассмотрение использования электроферментативных систем в анализе, необходимо отметить еще одну важную тенденцию создания электроферментативных сенсоров - минитюризацию и пространственное совмещение ферментной электродной системы с элементами электроники, что обеспечивает увеличение уровня и устойчивости электрического сигнала. На этом пути начинают широко использоваться современные достижения технологии полупроводников и иммобилизации ферментов. В результате были разработаны ферментные транзисторы с компьютерной обработкой первичных сигналов сенсеров.

**Контрольные вопросы**

1. Способы регенерации коферментов в природе и технике.

2. Принципы функционирования биоэлектрохимических топливных элементов.

3. Схема и принцип работы биологического генератора тока.

4. Расскажите о ферментативных реакторах.

5. Электроферментативные реакторы для получения биоорганических соединений.

6. Электроферментативные анализаторы метаболитов.

7. Схема проточного амперометрического датчика.

8. Ферментативные и электроферментативные анализаторы токсичности.

9. Пастовый электрод.

**Тесты к учебному пособию**

1. **Группу макроэлементов образуют:**

водород, кислород, углерод, азот

водород, кислород, углерод, натрий

водород, кислород, хлор, азот

водород, кальций, углерод, азот

2. **Существенная роль при функционировании живой клетки отводится** **микроэлементам:**

натрию, кальцию, фосфору, сере, калию, хлору, железу, цинку, марганцу, кобальту, меди, никелю, йоду и фтору

натрию, кальцию, фосфору, углероду, калию, хлору, железу, цинку, марганцу, кобальту, меди, никелю, йоду и фтору

натрию, кальцию, фосфору, сере, калию, хлору, железу, азоту, марганцу, кобальту, меди, никелю, йоду и фтору

натрию, кальцию, кислороду, сере, калию, хлору, железу, цинку, марганцу, кобальту, меди, никелю, йоду и фтору

**3. К** **группе** **ультрамикроэлементам относят:**

бром, золото, селен, серебро, ванадий

бром, углерод, селен, серебро, ванадий

бром, золото, селен, серебро, марганец

бром, золото, кислород, серебро, ванадий

**4. Водородное связывание возникает между:**

водородом и кислородом

водородом и натрием

водородом и серой

водородом и железом

**5. Вода**

Гидрофильный растворитель

Гидрофобный растворитель

Дифильный растворитель

**6. Энтропия имеет математическое выражение, которое определяется функцией состояния**

ΔS = ΔQ/T

ΔS = ΔQ·T

ΔQ = ΔS·T

ΔQ = ΔS/T

**7. Свободную энергию ΔG при постоянной температуре и давлении можно определить из уравнения**

ΔG = ΔH - TΔS

ΔG = ΔH·T·ΔS

ΔG = ΔH/TΔS

ΔG = ΔH +TΔS

**8. Процессы жизнедеятельности являются…**

необратимыми

обратимыми

возобновляемыми

**9. Энтропией называется…**  
мера разупорядоченности системы  
теплосодержание системы  
свободная энергия  
общая энергия системы

**10. Энтальпией называют …**

теплосодержание системы

мера разупорядоченности системы

свободная энергия  
общая энергия системы

**11. Пептидная связь это:**

-СОNH-

-COSH-

-SHNH-

-NHPO-

**12. При гидролизе 1 моля АТФ до аденозин-5ʹ-дифосфата (АДФ) и неорганического фосфата выделяется более …**

7,3 ккал свободной энергии

10,4 ккал свободной энергии

5,7 ккал свободной энергии

20,5 ккал свободной энергии

**13. Для веществ: креатинфосфата и аргининтрифосфата, выполняющих функцию энергетического «депо» свободная стандартная энергия гидролиза составляет …**

~ - 10,3 ккал.

~ - 15,8 ккал.

~ - 8,5 ккал.

~ - 20,3ккал.

**14. Какое количество АТФ образуется за сутки в организме взрослого человека?**  
40-45кг  
800-1200мг  
18-20кг  
100-200г  
80-100кг

**15. Способность НАД к окислению-воcстановлению определяется наличием в его структуре…**  
никотинамида  
аденина  
рибозофосфата

**16. Первичными акцепторами электронов в дыхательной цепи являются…**  
НАД  
ФАД  
цитохромоксидаза  
ФМН  
убихинон

**17. В активный центр ферментов дыхательной цепи входят атомы…**  
железа  
селена  
меди  
цинка  
йода

**18. Какие компоненты дыхательной цепи транспортируют только электроны?**  
цитохром «в»  
цитохромоксидаза  
НАД  
ФМН  
убихинон

**19. Какие из представленных веществ являются макроэргами?**  
гуанозинтрифосфат  
креатинфосфат  
S-аденозилметионин  
рибозофосфат  
инозитолтрифосфат

**20. Пиридиновые ферменты являются…**  
первичными дегидрогеназами  
вторичными дегидрогеназами  
аутооксидабельными ферментами

**21. Какие из представленных ферментов не относятся к дыхательной цепи?**  
фумараза  
лактатдегидрогеназа  
цитохромоксидаза  
убихинолдегидрогеназа  
НАДН-дегидрогеназа

**22. Какие компоненты дыхательной цепи способны транспортировать электроны и протоны?**  
убихинон  
ФМН  
цитохромоксидаза  
цитохром «с»  
цитохром «в»

**23. Организмы, использующие в качестве источника энергии свет**  
фототрофы  
хемотрофы  
аэробы  
облигатные анаэробы  
факультативные анаэробы

**24. В дыхательной цепи между убихиноном и цитохромом с1 расположен**  
цитохром «в»  
цитохром «с»  
цитохром «в5»  
цитохром «а»

**25. Организмы, получающие энергию за счет окислительно-восстановительных реакций**  
хемотрофы  
фототрофы  
аэробы  
анаэробы

**26. Выбрать ферменты дыхательной цепи**  
НАДН-дегидрогеназа  
цитохромоксидаза  
убихинолдегидрогеназа  
цитратсинтетаза  
глутатионредуктаза

**27. Восстановление ФАД (ФМН) сопровождается присоединением протонов**  
к атомам азота  
к атомам углерода  
к атомам кислорода

к атомам серы

**28. Убихинон легко диффундирует в мембране митохондрий, потому что является**  
небольшой липофильной молекулой  
небольшой гидрофильной молекулой  
крупной липофильной молекулой  
крупной гидрофильной молекулой

**29. Конечным акцептором электронов в дыхательной цепи является**  
кислород  
водород  
убихинон  
НАД  
цитохромоксидаза

**30. При гидролизе макроэргической связи выделяется энергии**  
не менее 5 ккал/моль  
1 ккал/моль  
более 100 ккал/моль  
не менее 30 ккал/моль

**31. Донор электронов в дыхательной цепи**  
водород  
кислород  
сера  
железо  
медь

**32. Пиридиновые ферменты являются**  
оксидоредуктазами  
гидролазами  
трансферазами  
синтетазами  
лиазами  
изомеразами

**33. Протоны и электроны, необходимые для процесса восстановления в клетке извлекаются из:**

воды

атмосферы

белков

коферментов

**34. Механизм действия НАД включает**  
присоединение протона к атому углерода  
присоединение протонов к атомам азота  
присоединение протонов к атому кислорода

**35. Способность ФАД к окислению-восстановлению определяется наличием в его структуре**  
изоаллоксазина  
рибитола  
рибозофосфата  
аденина

**36. Из каких компонентов состоит НАД**  
витамина РР  
рибозофосфата  
бензохинона  
изоаллоксазина

**37. Из каких компонентов состоит ФАД**  
рибофлавин  
рибозофосфат  
тиамин  
бензохинон

**38. Из каких компонентов состоит ФМН**  
рибофлавин  
фосфорная кислота  
тиамин  
рибоза  
пиридоксин

**39. Первичным источником клеточной энергии является**  
солнечный свет

АТФ  
Red/Ox реакции  
углеводы

**40. Какое количество энергии выделяется при окислении 1 г липидов?**  
9,3 ккал  
4,1 ккал  
7,8 ккал  
20 ккал

**41. Какое количество энергии выделяется при окислении 1 г углеводов и белков?**  
4,1 ккал  
9,3 ккал  
15 ккал  
7,5 ккал

**42. Установлено, что 55 % энергии расщепления глюкозы аккумулируется в макроэргических связях**

АТФ  
ДНК

РНК

НАД

**43. В дыхательной цепи между флавиновыми дегидрогеназами и цитохромом «в» расположен…**  
убихинон  
цитохром «с1»  
цитохром «с»  
НАД

**44. Выбрать основной пищевой углевод**  
крахмал  
сахароза  
фруктоза  
глюкоза  
лактоза  
гликоген  
целлюлоза

**45. Выбрать незаменимые жирные кислоты**  
арахидоновая  
линолевая  
линоленовая  
олеиновая  
пальмитиновая

**46. Какие углеводы не усваиваются организмом, но должны обязательно поступать с пищей?**  
целлюлоза  
пектины  
гликоген  
крахмал  
лактоза  
мальтоза

**47. Выбрать макроэргические соединения**  
сукцинил-КоА  
цитидиндифосфат  
1,3-дифосфоглицерат  
пируват  
аденозинмонофосфат

**48. В состав убихинона входят**  
бензохинон  
изопреноидная боковая цепь  
порфиновое кольцо  
рибозофосфат  
аденин

**49. Продуктом превращения липидов на втором этапе унификации энергетических субстратов является**  
ацетил-КоА  
глицерофосфат  
глицерин  
пируват

**50. На какой стадии унификации энергетических субстратов образуется наибольшее количество АТФ?**  
третьей  
второй  
первой  
на всех поровну

**51. При окислительном декарбоксилировании пирувата образуется**  
ацетил-КоА  
цитрат  
сукцинил-КоА  
лактат

**52. Как изменятся отношения НАД/НАДН и АДФ/АТФ в сердце во время сна (по сравнению с активным состоянием)?**  
оба уменьшатся  
оба увеличатся  
не изменятся  
первое уменьшится, второе увеличится  
первое увеличится, второе уменьшится

**53. Какие вещества, поступающие с пищей, являются предшественниками пирувата?**  
углеводы  
белки  
жирные кислоты  
холестерин  
целлюлоза

**54. Сколько молекул НАДН может образоваться за один оборот ЦТКК?**  
три  
две  
одна  
четыре  
ни одной

**55. На третьем этапе унификации энергетических субстратов происходит** превращение  
ацетил-КоА Н2О + СО2  
полисахариды моносахариды  
пируват ацетил-КоА  
жирные кислоты ацетил-КоА  
глицерин пируват

**56. В ходе ЦТКК превращение янтарной кислоты в яблочную происходит через**  
фумарат  
цитрат  
оксалоацетат  
сукцинил-КоА

**57. Где происходят реакции цикла Кребса?**  
матрикс митохондрий  
цитоплазма  
наружная мембрана митохондрий  
внутренняя мембрана митохондрий  
межмембранное пространство

**58. Сколько молекул ФАДН образуется в ходе ЦТКК?**  
одна молекула  
две молекулы  
ни одной

**59. В ходе реакций унификации энергетических субстратов образуется один общий метаболит**  
ацетил-КоА  
сукцинил-КоА  
пируват  
изоцитрат  
цитрат

**60. Выбрать правильную последовательность превращения углеводов в ходе унификации энергетических субстратов**  
полисахариды моносахариды пируват ацетил-КоА Н2О+СО2  
полисахариды моносахариды ацетил-КоА пируват Н2О+СО2  
полисахариды пируват моносахариды ацетил-КоА Н2О+СО2  
моносахариды полисахариды ацетил-КоА пируват Н2О+СО2  
моносахариды полисахариды пируват ацетил-КоА Н2О+СО2

**61. На первом этапе унификации энергетических субстратов происходят превращения**  
полисахариды моносахариды  
белки аминокислоты  
жиры глицерин + жирные кислоты  
пируват ацетил-КоА  
глюкоза пируват

**62. Какие реакции в ЦТКК катализируются НАД-зависимыми ферментами?**  
изоцитрат альфа-кетоглутарат  
альфа-кетоглутарат сукцинил-КоА  
малат оксалоацетат  
сукцинат фумарат  
оксалоацетат цитрат

**63. Сколько АТФ образуется при окислении одной молекулы ацетил-КоА?**  
12 АТФ  
6 АТФ  
9 АТФ  
3 АТФ  
15 АТФ

**64. Цикл Кребса выполняет функцию**  
обе функции  
анаболическую  
катаболическую

**65. Укажите НАД-зависимые ферменты**  
изоцитратдегидрогеназа  
малатдегидрогеназа  
цитратсинтетаза  
сукцинатдегидрогеназа  
сукцинил-КоА-синтетаза

**66. Первым этапом на пути окисления пирувата в ацетил-КоА является реакция**  
декарбоксилирования  
дегидрирования  
переноса ацетила

**67. Последовательность расположения ферментов дыхательной цепи определяется их**  
редокс-потенциалом  
липофильностью  
гидрофильностью  
молекулярным весом

**68. АТФ-синтетаза для образования АТФ использует энергию**  
трансмембранного протонного градиента  
макроэргической связи промежуточного соединения  
заключенную в НАДФН

**69. Наиболее легко подвергаются перекисному окислению**  
линолевая к-та  
линоленовая к-та  
арахидоновая к-та  
аскорбиновая к-та  
масляная к-та

**70. Пункты сопряжения окисления и фосфорилирования расположены на участке между**  
ФМН убихинон  
цитохромоксидаза кислород  
цитохром в цитохром с1  
убихинон цитохром с  
цитохром с1 цитохром с

**71. Угарный газ (СО) нарушает биоэнергетические процессы, потому что блокирует**  
цитохромоксидазу  
АТФ-синтетазу  
цитохром в  
сукцинатдегидрогеназу

**72. Цианиды нарушают биоэнергетические процессы, потому что блокируют**  
цитохромоксидазу  
цитохром с  
АТФ-синтетазу  
цитратсинтетазу  
сукцинатдегидрогеназу

**73. Какой фермент использует энергию трансмембранного градиента ионов водорода?**  
АТФ-синтетаза  
пируватдегидрогеназа  
супероксиддисмутаза  
цитохром в  
малатдегидрогеназа

**74. Противоядие при отравлении цианидами**  
нитриты  
кислород  
углекислый газ  
этанол

**75. При окислении альфа-кетоглутарата до сукцината образуется**  
4 АТФ  
1 АТФ  
2 АТФ  
3 АТФ

**76. Коферментная форма витамина А**  
ретиналь  
тетрагидрофолиевая кислота  
пиридоксальфосфат  
тиаминдифосфат  
коэнзим А

**77. Коферментная форма витамина В1**  
тиаминдифосфат  
пиридоксальфосфат  
флавинаденинмононуклеотид  
никотинамидадениндинуклеотидфосфат  
ретиналь

**78. Биохимическая функция витамина Е**  
транспорт электронов (защита мембранных липидов)  
перенос водорода  
транспорт ацильных групп  
траспорт одноуглеродных групп  
транспорт СО2

**79. Биохимические функции витамина С**  
восстанавливающий кофактор монооксигеназ  
гидроксилирование пролина  
зрительный процесс

**Список литературы**

**Основная**

1. Трухан Э.М. Введение в биофизику // М.: 2008. 240 с.

2. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика // М.: «Дрофа», 2003. 559с.

3. Спирин А.С. Молекулярная биология //М.: «Академия» 2011. 496 с.

4. Фаллер Дж., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки // М.: «Бином», 2011. 256 с.

5. Скулачев В.П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. М.: «Высш. шк.», 1989. 271с.

6. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М: МИА, 2003.

7. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. Пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний/ Под ред. к.х.н. П. Д. Решетова, Т. И. Соркиной. 4-е изд. М.: 2012. 469с.

8. Черенкевич С.Н., Мартинович Г.Г., Хмельницкий А.И. Биологические мембраны: Пособие для студентов высших учебных заведений физических, биологических, биохимических, биотехнологических специальностей. г.Минск: БГУ, 2009, 183 с.

9. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2-х томах. Т.1. Пер. с англ. М.: Мир, 1993. 384 с.

10. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: В 3-х т., 2-е изд., пер. с англ. М.: Мир, 1994, 517 с.

11. Иммобилизованные клетки и ферменты // под ред. Дж. Вудворда М., 1988.

12. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974, 915 с.

13. Коферменты. М., 1983, 363 с.

**Дополнительная**

1. Борисова С.В. Биохимия: Учебно-методическое пособие. Федер. агентство по образованию, гос. образоват. учреждение высш. проф. образования «Казан. гос. технол. ун-т». г.Казань: КГТУ, 2008.178 с.

2. Камкин А.Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток: учебное пособие для студентов медицинских вузов // А.Г.Камкин, И.С.Киселева.-Москва: Академия, 2008. 584 с.

3. Биохимия: учеб. для студентов мед. вузов//под ред. Е. С. Северина.-3-е изд., испр.-Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2006.-779 с.

4. Березовский В. М. Химия витаминов. М., 1973.

5. Биокатализ //под ред. И. В. Березина. М., 1984.

6. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1966.

7. Уэбб Э. Ингибиторы ферментов и метаболизма. Общие принципы торможения. М.: Мир, 1966, 862 с.