ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Ферменты, или энзимы, — это белки, выполняющие функцию биологических катализаторов. Ферменты присутствуют во всех живых клетках и обеспечивают превращение одних веществ в другие. Они участвуют практически во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах, направляя и регулируя обмен веществ. Отличительной особенностью ферментов по сравнению с небелковыми катализаторами является их высокая специфичность: константа связывания некоторых субстратов с белком может достигать 10^{10} моль/л, а эффективность ферментов значительно превышает эффективность небелковых катализаторов.

О существовании ферментов ученые знают давно, уже более 100 лет, так что современная энзимология — наука о ферментах — весьма развитая научная и техническая дисциплина. Энзимология тесно связана с такими быстро развивающимися сегодня областями знания, как биохимия и медицина. Косвенным свидетельством перспективности энзимологии служит рост числа ферментов и ферментных препаратов, используемых в самых разных областях человеческой деятельности — от нефтехимической промышленности до производства лекарств. Возможно, интерес к энзимологии связан именно с необычайно широкими возможностями, открывающимися в связи с использованием ферментов в жизненно важных областях, в первую очередь в медицине. Поэтому не вызывает удивления рост числа учебных дисциплин и специализаций, включающих изучение и освоение тех или иных аспектов энзимологии, в вузах и других учебных учреждениях.

Энзимологии как научной дисциплине посвящено большое количество монографий, справочников, учебников и учебных пособий, различного рода методических разработок и руководств как в мировой, так и отечественной литературе. Чем же отличается от них предлагаемая читателю книга? Дело в том, что материал, который нашел отражение здесь, не совсем традиционен для такого рода литературы, поскольку учебники по энзимологии акцентируют внимание читателя природе ферментов, причинах, закономерностях и механизмах ферментативного катализа, кинетике и регуляции ферментативных реакций, получении ферментативных препаратов, возможностях их химической и/или генно-инженерной модификации, путях технологического использования. Короче говоря, «классический» учебник нацелен на формирование у читателя представлений и знаний о том, как устроен фермент и как, почему и где он работает. Однако за рамки такого учебника, как правило, полностью выносится информация о том, а как же, собственно, работать с ферментами. В связи с этим многие практические вопросы энзимологии оказываются нераскрытыми и неясными не только для студентов, но порой возникают неожиданные методические и экспериментальные

затруднения даже у специалистов, которые обучались в свое время как раз по классическим учебникам.

Помочь научиться работать с ферментами и ферментативными системами — главная задача предлагаемой книги. Конечно, фундаментальные основы энзимологии нашли здесь достаточно полное отражение, хотя и без детализации. Самое же важное, что книга насыщена общими и конкретными экспериментальными методиками и практическими указаниями. Здесь изложены основные экспериментальные приемы работы с ферментами, начиная от методов выделения и очистки ферментов, кончая методами регистрации конкретных ферментативных реакций. Подробно изложены основы спектрометрических и электрохимических методов и их приложение к ферментам. Даны многочисленные примеры приготовления рабочих растворов и реакционных систем. Рассмотрены методы определения активности ферментов, относящихся к разным классам, причем все приведенные методики можно легко воспроизвести в лаборатории или в студенческом практикуме. Целая глава книги посвящена методам изучения связывания ферментов с лигандами. В связи с растущей биотехнологической значимостью энзимологии следует особо подчеркнуть, что немалое внимание уделено методам получения технологических препаратов ферментов, рассмотрены способы подготовки носителей для иммобилизации, сами методы иммобилизации и способы определения активности иммобилизованных ферментов. Имеются материалы по практическому использованию ферментов и ферментативного катализа, в том числе в иммуноферментном анализе, биосенсорах и биореакторах. В приложении в сокращенном варианте представлена современная классификация известных ферментов.

Широкий охват и глубокая проработка темы делают эту книгу действительно уникальной, имеющей несомненную ценность для достаточно широкой аудитории. Иными словами, перед вами не просто еще один учебник по энзимологии, который в любом случае оказался бы нелишним и нашел свою аудиторию. У меня нет сомнений, что читательская аудитория данной книги окажется большой и даже очень большой. Книга может быть рекомендована в качестве учебного пособия для студентов и аспирантов медицинских, фармацевтических, биологических, химических и биотехнологических факультетов университетов и вузов, специализирующихся в области физико-химической, медицинской и инженерной энзимологии, а также как справочник для всех, кто работает в этих областях.

А.В. Левашов,
профессор кафедры химической энзимологии
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

ПРЕДИСЛОВИЕ

Ферментами[1] *мы называем органические вещества в живых организмах, которые в определенных условиях способны ускорить достижение равновесия реакций между органическими веществами растительного и животного происхождения. При ферментизации эти органические вещества, входя в контакт с ферментами, испытывают определенные изменения, в результате чего образуются молекулы с более низкой теплотой сгорания, распад которых происходит уже без участия ферментов обычным химическим путем.*

Е.Ф. ф. Горуп-Безанец «Учебник по физиологической химии», 1878,
[E.F. v. Gorup-Besanez (1878) Lehrbuch der Physiologischen Chemie,
4th ed., Vieweg, Braunschweig]

Существует множество прекрасных учебников по биохимии, посвященных в частности методам выделения, структуре, механизму катализа и кинетическим закономерностям действия ферментов. Однако лишь в немногих книгах доходчиво изложена суть ферментативного анализа и возможности его практического применения. Это объясняется огромным количеством научных результатов, которые невозможно свести в одну-единственную книгу. На самом деле все труды в области энзимологии либо разрастаются до гигантских размеров, как *Methods in Enzymology*, либо просто прерываются при достижении определенного объема, как классические труды *Method*s *of Enzymatic Analysis* (ed. H.U. Bergmeyer) или *The Enzymes* (Academic Press, San Diego). Подобная ситуация, естественно, не может удовлетворять исследователя, работающего в клинической или аналитической лаборатории, которому методики эксперимента необходимо иметь прямо на рабочем столе и для которого понятная книга, ограниченная определенным набором методов и не претендующая на полноту охвата основ биохимии, может оказаться гораздо полезней, чем масса литературы, имеющейся в библиотеке. Исходя из вышесказанного, в данной книге основное внимание уделено ферментативному анализу в его узком понимании, а также изучению связывания лигандов и эффекторов. В книге излагаются основные теоретические принципы и экспериментальные методы, а также общие правила работы с ферментами и различные аспекты их технологического применения. Для сокращения объема книги препаративные процедуры и методы, используемые при решении более широкого круга проблем, такие как электрофорез, здесь не рассматриваются.

Основной целью автора было помочь читателю понять основы соответствующих методов. Поскольку невозможно отдельно описать каждый фермент и условия реакции в каждой ферментативной системе, мою

[1] В английской и немецкой литературе используют термин «энзим».

книгу можно рассматривать как справочник, помогающий адаптировать соответствующую методику к конкретным условиям или создать специфический тест. Таким образом, здесь рассматриваются не только наиболее распространенные, но и довольно специфические методы исследования. Для иллюстрации конкретных методов, таких как фотометрическое титрование или равновесный диализ, обычно приводится лишь одна или несколько типичных методик. Эти методики можно либо воспроизвести непосредственно в том виде, в котором они представлены в книге, что позволит исследователю ознакомиться с методом, либо использовать в качестве руководства при разработке методики анализа для какой-либо иной системы. Приведенные примеры можно использовать для студенческих практикумов, так как они обеспечивают достаточный уровень аналитического сигнала и могут быть выполнены на приборах с не самым высоким уровнем чувствительности.

Необходимо подчеркнуть неоценимый вклад, который внесли Райнер Фигура, д-р Клаус Мошель и д-р Мериам Нойами-Бахманн в написание главы, посвященной иммобилизации ферментов. Автор также чрезвычайно признателен д-ру Комфорту У. Иньянгу за лингвистические исправления.

Ханс Биссвангер
Тюбинген, апрель 2004

СОКРАЩЕНИЯ

ε	Коэффициент поглощения
A	Поглощение света
A, B, C	Специфические лиганды (например, субстраты)
BAPNA	N-Бензоил-L-аргинин-*n*-нитроанилид
BCA	Бицинхониновая кислота
E	Фермент
E	Электродвижущая сила
E1o	α-Оксоглутарат дегидрогеназа в ОГДГК
E1p	Пируватдегидрогеназа в ПДГК
E2o	Дигидролипоамид-сукцинилтрансфераза в ОГДГК
E2p	Дигидролипоамид-ацетилтрансфераза в ПДГК
E3p, E3o	Дигидролипоамид-дегидрогеназа в ПДГК и ОГДГК
ELISA	Твердофазный иммуноферментный анализ
F	Константа Фарадея
GLUPHEPA	N-Глутарил-L-фенилаланин-*n*-нитроанилид
h	Постоянная Планка
I	Интенсивность света
k	Константа скорости
k_{cat}	Каталитическая константа
K_d	Константа диссоциации
K_M	Константа Михаэлиса
M_r	Относительная молекулярная масса
P, Q, R	Продукты реакции
PMSF	Фенилметилсульфонилфторид
PN	Продуктивность микроорганизмов
R	Универсальная газовая постоянная
S	Субстрат
SMCC	(4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоновой кислоты N-гидроксисукцинимидный эфир
SUPHEPA	N-Сукцинил-L-фенилаланин-*n*-нитроанилид
TES	*N*-Трис[гидроксиметил]метил-2-аминометан-сульфоновая кислота
TLCK	L-1-Хлор-3-(4-тозиламидо)–7-амино-2-гептанон
TPCK	L-1-Хлор-3-(4-тозиламидо)-4-фенил-2-бутанон
V_{max}	Максимальная скорость
АБТС	2,2-Азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота
АДГ	Алкогольдегидрогеназа

АНС	1-Анилинонафталин-8-сульфонат
АсАТ	Аспартатаминотрансфераза
БСА	Бычий сывороточный альбумин
Г6ФДГ	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГАФДГ	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
ГДГ	Глутаматдегидрогеназа
ГО	Глюкозооксидаза
ДМСО	Диметилсульфоксид
ДТТ	1,4-Дитио-L-трейтол (реагент Клеланда)
ДХФИФ	2,6-Дихлорфенолиндофенол
ИФА	Иммуноферментный анализ
КДИ	Карбонилдиимидазол
КоА	Кофермент А
ЛАП	Лейцинаминопептидаза
ЛДГ	Лактатдегидрогеназа
МБС	3-Малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид
МДГ	Малатдегидрогеназа
МЕ	Международные единицы (ферментативной активности)
НАД	Никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ОГДГК	α-Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс
о-НФГ	о-Нитрофенил-β-D-галактопиранозид
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПДГК	Пируватдегидрогеназный комплекс
ПК	Пируваткиназа
ПО	Пероксидаза
РИА	Радиоиммуноанализ
ТДФ	Тиаминдифосфат
Трис	Трис(гидроксиметил)аминометан
ТХУ	Трихлоруксусная кислота
ФГК	3-Фосфоглицераткиназа
ФМН	Флавинмононуклеотид
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
ФТА	Фосфотрансацетилаза
ЦС	Цитратсинтаза
ЭГТА	Этиленгликоль-бис-(β-аминоэтилэфир)-N,N,N,N-тетраацетат
ЭДТА	Этилендиаминтетраацетат

1 ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день описано свыше 3000 различных ферментов, а по оценкам, в природе их существует около 25 000, однако в настоящее время не более десятой части описанных ферментов поступают в продажу. Ферменты — чрезвычайно эффективные катализаторы, и большинство катализируемых ими реакций не могли бы протекать без их участия, во всяком случае, за какое-то разумное время. Ферменты ускоряют спонтанные реакции в 10^8–10^{10} раз, а иногда и в 10^{12} раз (Menger, 1993). Приведем пару удивительных примеров: оротидин-5′-фосфат–декарбоксилаза в 10^{17} раз ускоряет реакцию, которая без ее участия протекает с периодом полуреакции 78 миллионов лет (Radzicka & Wolfenden, 1995). Триозофосфатизомераза более чем в 10^9 раз ускоряет переход дигидроксиацетонфосфата в енольную форму (Alberty & Knowles, 1976).

Конечно, некоторые реакции могут протекать спонтанно, например реакция образования воды из водорода и кислорода в дыхательной цепи (хотя высвобождающееся в этой спонтанной реакции значительное количество тепла просто теряется). Тем не менее даже такие реакции протекают с участием ферментов, и каждая реакционная стадия метаболизма контролируется определенным ферментом. Таким образом, ферменты выполняют более обширную и более важную функцию, чем простое ускорение определенных процессов. Преимущество ферментативных реакций состоит не только в том, что они быстрее достигают равновесия, но также в том, что их можно контролировать путем добавления или удаления определенного количества катализатора. Кроме того, эффективность ферментов как катализаторов может регулироваться извне как положительным, так и отрицательным образом под действием активаторов или ингибиторов без изменения количества фермента в системе. Таким образом, клеточные процессы подвержены строго координированной регуляции, без которой невозможно было бы представить существования самой жизни. Итак, наиболее важной функцией ферментов можно считать регуляцию метаболизма клетки.

Белковая природа фермента идеально подходит для выполнения этой двойственной функции. Во-первых, функциональные группы аминокислотных остатков белка способны формировать специфические участки связывания и каталитические центры, во-

вторых, белки обладают достаточной гибкостью для того, чтобы способствовать образованию и стабилизации переходных состояний и индуцировать конформационные изменения, влияющие на эффективность катализа. Двадцати основных аминокислот с их гидрофильными, гидрофобными, кислыми и основными группами вполне достаточно для образования специфических участков связывания субстратов и регуляторных молекул и для реализации каталитической функции. Однако иногда, особенно для выполнения последней функции, необходимо участие веществ небелковой природы, таких как коферменты (специфические факторы, способные диссоциировать из комплекса с белком) и простетические группы (не способны диссоциировать). В качестве примеров коферментов можно назвать НАД(Ф), тиаминдифосфат и кофермент А, а в качестве примеров прочно связанных простетических групп — ФАД, цитохромы, порфирины, пиридоксамин, липоевую кислоту, биотин и тетрагидрофолиевую кислоту. Многим ферментам для выполнения своей функции и для сохранения структуры необходимы ионы металлов. Ионы Mg^{2+} способствуют связыванию фосфатных групп АДФ, АТФ и тиаминдифосфата с ферментами, а ионы железа (в цитохромах), кобальта (в корриновой системе колец), меди (в цитохромоксидазе, тирозиназе и др.), цинка (в карбоангидразе и алкогольдегидрогеназе), молибдена (в нитрогеназе), марганца (в аргиназе и ксилозо(глюкозо)изомеразе) и селена (в глутатионпероксидазе) необходимы для катализа.

Белковая природа ферментов помогает им адаптироваться к взаимодействию с любым необходимым лигандом в результате мутаций. Это свойство очень широко применяется в биотехнологии: методы направленного мутагенеза позволяют изменять специфичность и функции ферментов. Молекулярное моделирование (так называемый белковый дизайн) позволяет прежде смоделировать определенные модификации, а затем реализовать их путем введения соответствующих мутаций. Примером может служить гидроксиизокапроатдегидрогеназа, катализирующая восстановительное превращение α-кетокислоты в хиральную молекулу гидроксикарбоновой кислоты — гидроксианалог аминокислоты. Лучшим субстратом для данного фермента является α-кетокапроевая кислота. Аналог субстрата — α-изокетокапроевая кислота — подвергается превращению с гораздо меньшей эффективностью. Методом направленного мутагенеза каталитическая эффективность фермента по отношению к данному субстрату (k_{cat}/K_M) была повышена на четыре порядка, а по отношению к фенилглиоксилату — на два порядка по сравнению с физиологическим субстратом (Feil et al., 1994).

С другой стороны, белковая природа ферментов делает их чрезвычайно чувствительными к влиянию окружающей среды — значению pH, ионной силы, температуры, — в результате чего максимальная активность реализуется лишь в строго определенных условиях. В клетках живого организма условия поддерживаются в оптимальном диапазоне (это не всегда так в отношении температуры, особенно в случае клеток микроорганизмов). Однако существуют ферменты, демонстрирующие неожиданную стабильность даже при экстремальных условиях. Хотя обычно считают, что ферменты весьма чувствительны к повышению температуры, ферменты из таких бактерий, как *Thermus*, *Thermotoga*, *Thermoplasma* переносят температуру до 100 °C. В процессе эволюции на Земле температура постепенно снижалась, поэтому очевидно, что более древние организмы и их структуры переносили гораздо более высокие температуры, чем современные организмы. Отсюда следует вывод, что все предшественники существующих сегодня ферментов были термостабильными, но утратили это свойство в связи со снижением температуры окружающей среды. Этим можно объяснить тот факт, что природа «выбрала» в качестве биокатализаторов именно белки, а не более стабильные нуклеиновые кислоты, хотя некоторые виды РНК также обладают каталитической активностью.

В данной книге мы рассмотрим некоторое количество ферментативных реакций и связанных с ними аналитических методов, в частности определение белка, причем особый акцент делается на иммобилизованные ферменты. Мы остановимся на наиболее часто используемых методах ферментативного анализа и поговорим о различных типах ферментов и методов, а также приведем несколько специфических тестов. Понятно, что такая большая тема не может быть полностью изложена в столь ограниченном объеме, так что выбор ферментов или методов иногда может показаться произвольным. Для получения более полной информации следует обращаться к учебникам и серийным изданиям по энзимологии.

Литература

Alberty, W.J., Knowles, J.R. **(1976)** *Biochemistry* 15, 5631–5640
Feil, I.K., Lerch, H.P., Schomburg, D. **(1994)** *Eur. J. Biochem.* 223, 857–863
Menger, F.M. **(1993)** *Acc. Chem. Res.* 26, 206–212
Radzicka, A., Wolfenden, R. **(1995)** *Science* 267, 90–93

Учебники и серийные издания

Advances in Enzymology, Wiley, New York
Bergmeyer, H.U., ed. **(1983)** *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn. Verlag Chemie, Weinheim
Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego
Schomburg, D., ed. **(2001f)** *Springer Handbook of Enzymes.* Springer, Berlin
The Enzymes, Academic Press, San Diego

2 НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Ферменты обычно имеют тривиальные названия, часто возникающие исторически и никак не связанные с их каталитической функцией, например, диафораза (дигидролипоамид дегидрогеназа) или старый желтый фермент (НАДФН:(акцептор) оксидоредуктаза). Иногда тривиальное название дает некоторую информацию о реакции, но не ее систематическое описание, например, тривиальное название фермента L-лактатдегидрогеназа говорит об окислении гидроксильной группы лактата до оксогруппы, но ничего не сообщает об акцепторе, как это делает систематическое название (L)-лактат:НАД$^+$ оксидоредуктаза. Однако систематические названия настолько неудобны для постоянного употребления, что общепринятыми являются тривиальные названия, даже в официальном языке, например в торговых операциях. Номенклатура ферментов рекомендует использовать особое тривиальное название (рекомендованное название) для каждого фермента.

Для точного обозначения каждого отдельного фермента и для четкого разграничения между огромным числом близких по своей сути ферментативных реакций Международный биохимический союз (IUB) в 1956 г. учредил Международную комиссию по ферментам, которую возглавил профессор М. Флоркин. Комиссия разработала классификацию и номенклатуру для всех известных ферментов. В 1961 г. комиссия была заменена Постоянным комитетом по ферментам, а в 1969 г. — Экспертным комитетом по ферментам, который до настоящего времени ведет работу по обновлению Номенклатуры ферментов (см. список литературы) и регулярно публикует дополнения в *European Journal of Biochemistry*. На сегодняшний день в списке насчитывается свыше 3000 ферментов. В списке фигурирует также цифровой код и систематическое название каждого фермента.

Названия ферментов (в том числе и тривиальные) подчиняются общим правилам. Обычно название имеет окончание «аза» и указывает на некие свойства катализируемой реакции (репараза, каспаза). Если фермент катализирует несколько реакций (например, если он состоит из нескольких субъединиц, катализирующих несколько последовательных реакций), его следует

называть *системой*, хотя часто подобные структуры называют *комплексами*, например пируватдегидрогеназная система (комплекс), система (комплекс) синтазы жирных кислот. Поскольку название фермента основано на катализируемой им реакции, ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию (ферменты из разных организмов или изоферменты), имеют один и тот же код и одно и то же систематическое название. Из этого правила есть несколько исключений, например кислая и щелочная фосфатазы или ацетилхолинэстераза и холинэстераза. Не имеющие каталитической функции белки не вносятся в список ферментов.

Для классификации фермента в соответствии с катализируемой им реакцией следует указать направление этой реакции. Внутри каждого класса ферментов направление всех реакций должно быть одинаковым, даже если в физиологических условиях реакция протекает в другом направлении. Систематическое название исходит из принятой формы записи реакции, в то время как тривиальное (рекомендованное) название чаще всего связано с тем направлением реакции, которое было продемонстрировано. Систематическое название состоит из двух частей: в первой части указывают субстрат (субстраты), затем ставят двоеточие и обозначают суть реакции, оканчивая слово на «аза», например, алкоголь:НАД$^+$ оксидоредуктаза. Систематические названия оксидоредуктаз следуют общей форме записи донор:(акцептор) оксидоредуктаза. В тривиальных названиях ферментов, катализирующих реакции с присоединением молекулярного кислорода, используется термин оксигеназа: монооксигеназа — если присоединяется один атом кислорода и диоксигеназа — если присоединяются оба атома. Если не возникает путаницы, то в тривиальных названиях опускают букву D для D-сахаров и L для L-аминокислот. Субстраты в анионной форме имеют окончание «ат» (мал**ат**дегидрогеназа). Если сразу за названием субстрата следует окончание «аза», значит, речь идет о его гидролизе (например, лактаза). Из общего правила заканчивать названия ферментов на «аза» существует несколько исключений, касающихся протеолитических ферментов, например пепсин, трипсин и др.

Цифровые коды классификации ферментов (КФ или ЕС коды — от англ. Enzyme Commission) состоят из четырех чисел, разделенных точками (например, КФ 3.2.1.4). Первая цифра указывает на принадлежность фермента к одному из шести основных классов:

1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы

3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы (синтетазы)

Следующие два числа обозначают подклассы и подподклассы ферментов, а последнее число — это серийный номер данного фермента в его подподклассе.

В приложении в конце данной книги приведен список, содержащий классы, подклассы и подподклассы ферментов, а также некоторые характерные примеры отдельных ферментов с указанием их рекомендованных тривиальных и систематических названий (для пептидаз (КФ 3.4) систематические названия не приведены). Для некоторых ферментов, кроме того, перечислены другие часто употребляемые тривиальные названия. С полным списком ферментов можно ознакомиться в соответствующих изданиях (см. список литературы).

Литература

Enzyme nomenclature **(1976)** *Biochim. Biophys. Acta* 429, 1–45
Номенклатура ферментов (Рекомендации 1972), пер. с англ., М., 1979
Schomburg, D., Salzmann, M. **(1990)** *Enzyme Handbook*, Springer Verlag, Berlin
Webb, E.C., ed. **(1992)** *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, San Diego