Доклады Академии наук СССР
1955. Том 100, № 3

БИОХИМИЯ

П. В. АФАНАСЬЕВ и В. В. МОСОЛОВ

О СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ ФЕРМЕНТОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 20 X 1954)

Вопрос об эффективности совместного действия катализаторов, ускоряющих один и тот же химический процесс, — один из сложных и важных для теории и практики химического катализа. Не менее важен этот вопрос и для теории и практики ферментативного катализа и, следовательно, для биохимии.

В химическом катализе известны многие случаи аддитивности (суммирование действий) при совместном действии нескольких катализаторов. Известны также случаи, когда один катализатор понижает действие другого. Часто встречаются каталитические процессы, в которых действие смеси катализаторов больше суммы действий каждого из них в отдельности — явление усиления.

Первое отчетливое явление усилия действия катализаторов при совместном их действии было показано Прайсом [1] на реакции между персульфатом и иодидом, сильно катализируемой ионами железа и ионами меди. Особенно многообразны и сложны явления усиления в гетерогенном катализе.

Теоретическая разработка вопроса усиления в гомогенном катализе была проведена Шпитальским [2]. Исходя из предположения, что каталитически активными являются не только промежуточные соединения, содержащие каждый катализатор в отдельности, но и промежуточные соединения, содержащие оба катализатора смеси, Шпитальский вывел уравнение зависимости скорости процесса от концентраций катализаторов смеси. Уравнение содержит два члена, определяющие аддитивное действие, и член, обусловливающий отклонение от аддитивности, т. е. определяющий усиление. В результате исследований Шпитальского явление усиления, наблюдаемое при совместном действии некоторых катализаторов в гомогенном катализе, стало принципиально понятным.

Необходимо отметить, что изучение явлений и закономерностей совместного действия ферментов (биологических катализаторов), катализирующих один и тот же химический процесс, в биохимии не проводилось. Не подлежит сомнению, что этот вопрос весьма важен для разработки теории ферментативного катализа и для изучения биохимических сторон жизненных явлений.

Нами проведено теоретическое исследование этого вопроса, показавшее, что при совместном действии двух ферментов, катализирующих один и тот же химический процесс, каталитический эффект может существенно отклоняться от суммы эффектов, вызываемых отдельными ферментами.

Теоретический анализ показывает, что на основе представлений Михаэлиса и Ментен [3], Холдена [4], Белицера и Ходоровой [5] не может быть понято явление усиления при совместном действии нескольких ферментов. Представление о том, что каталитически активным комплексом является соединение одной молекулы фермента с моле-

кулой субстрата, требует полной независимости действия каждого фермента смеси и, следовательно, суммирования эффектов — аддитивности.

Совершенно иначе может быть представлена схема совместного действия ферментов, если полагать, что каталитически активным комплексом является соединение двух молекул фермента с молекулой субстрата, как это предложено П. В. Афанасьевым ([6]). В этом случае легко представить возможность образования смешанных каталитически активных комплексов, содержащих оба фермента смеси. Появление новой возможности образования смешанного, «гибридного» комплекса существенно усложняет зависимость скорости ферментативного процесса от концентраций ферментов смеси, что приводит к отклонению от аддитивности.

Теоретически можно представить следующую схему элементарных процессов при совместном действии двух ферментов, катализирующих один и тот же химический процесс:

$$1.\ F_1 + S \underset{x_1}{\rightarrow} F_1S. \quad 2.\ F_2 + S \underset{x_2}{\rightarrow} F_2S. \quad 3.\ F_1S + F_1 \underset{y_1}{\rightarrow} F_1SF_1.$$

$$4.\ F_2S + F_2 \underset{y_2}{\rightarrow} F_2SF_2. \quad 5.\ F_1S + F_2 \underset{z_1}{\rightarrow} F_1SF_2. \quad 6.\ F_2S + F_1 \underset{z_2}{\rightarrow} F_2SF_1.$$

$$7.\ F_1SF_1 \rightarrow 2F_1 + p. \quad 8.\ F_2SF_2 \rightarrow 2F_2 + p. \quad 9.\ F_1SF_2 \rightarrow F_1 + F_2 + p.$$

$$10.\ F_2SF_1 \rightarrow F_2 + F_1 + p.$$

F_1 и F_2 — концентрации свободных ферментов; S — концентрация субстрата; p — концентрация продуктов реакции; x_1 и x_2 — концентрации неактивных комплексов ферментов с субстратом; y_1 и y_2 — концентрации активных комплексов ферментов с субстратом; z_1 и z_2 — концентрации смешанных активных комплексов ферментов с субстратом; $K_1, K_2, \ldots, K_{10}$ — константы скоростей соответствующих реакций.

Обозначим общую аналитическую концентрацию ферментов F_{1_0} и F_{2_0}. Очевидно $F_{1_0} = F_1 + x_1 + 2y_1 + z_1 + z_2$ и $F_{2_0} = F_2 + x_2 + 2y_2 + z_1 + z_2$.

Полагая концентрации промежуточных комплексов квазистационарными, можно написать систему уравнений:

$$1.\ \frac{dx_1}{dt} = K_1F_1S - K_3F_1x_1 - K_5F_2x_1 = 0.$$

$$2.\ \frac{dx_2}{dt} = K_2F_2S - K_4F_2x_2 - K_6F_1x_2 = 0.$$

$$3.\ \frac{dy_1}{dt} = K_3F_1x_1 - K_7y_1 = 0. \quad 4.\ \frac{dy_2}{dt} = K_4F_2x_2 - K_8y_2 = 0.$$

$$5.\ \frac{dz_1}{dt} = K_5F_2x_1 - K_9z_1 = 0. \quad 6.\ \frac{dz_2}{dt} = K_6F_1x_2 = K_{10}z_0 = 0,$$

где t — время. Решая эту систему уравнений, получим

$$\frac{dS}{dt} = K_1F_1S + K_2F_2S = V;$$

$$F_{1_0} = F_1 + \frac{K_1F_1S}{(K_3F_1 + K_5F_2)} + \frac{2K_1K_3F_1^2S}{K_7(K_3F_1 + K_5F_2)} +$$

$$+ \frac{K_1K_5F_1F_2S}{K_9(K_3F_1 + K_5F_2)} + \frac{K_2K_6F_1F_2S}{K_4(K_4F_2 + K_6F_1)};$$

$$F_{2_0} = F_2 + \frac{K_2F_2S}{(K_4F_2 + K_6F_1)} + \frac{2K_2K_4F_2^2S}{K_8(K_4F_2 + K_6F_1)} + \frac{K_1K_5F_1F_2S}{K_9(K_3F_1 + K_5F_2)} + \frac{K_2K_6F_1F_2S}{K_{10}(K_4F_2 + K_6F_1)}.$$

Если полагать, что смешанные, «гибридные» комплексы не образуются, т. е. $K_5 = K_6 = 0$, то

$$V = K_1 \frac{\left(F_{1_0} - \frac{K_1}{K_3}S\right)S}{\left(1 + 2\frac{K_1}{K_7}S\right)} + K_2 \frac{\left(F_{2_0} - \frac{K_2}{K_4}S\right)S}{\left(1 + 2\frac{K_2}{K_8}S\right)}.$$

Таким образом, в случае невозможности образования смешанных активных комплексов действие смеси ферментов строго аддитивно. В случае образования также и смешанных активных комплексов действие смеси ферментов должно существенно отклоняться от аддитивного.

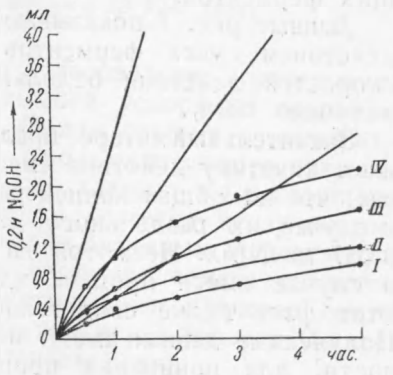


Рис. 1

Для экспериментальной проверки теоретических ожиданий мы сочли удобным изучить совместное действие трипсина и химотрипсина на белковый субстрат. Возможность образования смешанных каталитически активных комплексов трипсина и химотрипсина нами допускалась на основе представлений Афанасьева, высказанных при теоретическом анализе кинетики активирования химотрипсиногена трипсином ([7]). Субстратом служил 5% раствор сывороточного альбумина человека в $M/5$ фосфатном буфере, pH 8,68. Ферменты — кристаллические препараты трипсина и химотрипсина, полученные по Кунитцу и Нортропу ([8]).

Изучалась кинетика протеолиза под действием одного трипсина, одного химотрипсина, а также их смеси при 37°. Антисептик — тимол. Для анализа брались пробы по 0,8 мл через 30 мин., 1, 2, 3 и 5 час. К пробам прибавлялось 0,8 мл 35% раствора формалина, 3 капли тимолфталеина и смесь титровалась $н/_{50}$ NaOH. О ходе протеолиза судили по разности расхода щелочи, пошедшей на титрование опытного раствора и на титрование исходного раствора субстрата до прибавления ферментов. Одновременно ставился контроль с одним субстратом без фермента в тех же условиях, который не обнаружил никаких изменений в течение 24 час. Экспериментальные данные одного из опытов представлены на рис. 1 и в табл. 1.

Таблица 1

Переваривание сывороточного альбумина

Время в час.	Прирост NH_2 — N в мл $н/50$ NaOH					
	I. Химотрипсин, 0,055 мг N/мл	*II.* Трипсин, 0,059 мг N/мл	*III.* Смесь ферментов, общ. конц. 0,057 мг N/мл	*IV.* Смесь ферментов, общ. конц. 0,114 мг N/мл	*V.* Сумма действия ферментов *I*+*II*	*VI.* Разность *IV*—*V*
0,5	0,21	0,39	0,38	0,71	0,60	0,11
1	0,40	0,58	0,69	1,07	0,98	0,09
2	0,55	0,79	1,09	1,55	1,34	0,21
3	0,69	—	1,31	1,86	—	—
5	0,97	1,18	1,66	2,24	2,15	0,09

Условия опытов: кривая *I* — 12,5 мл раствора субстрата и 5 мг химотрипсина, концентрация фермента 0,055 мг N/мл; кривая *II* — 12,5 мл раствора субстрата и 5 мг трипсина, концентрация фермента 0,059 мг N/мл; кривая *III* — 25 мл раствора субстрата, 5 мг трипсина и 5 мг химотрипсина, общая концентрация ферментов 0,057 мг N/мл; кривая *IV* — 12,5 мл раствора субстрата, 5 мг трипсина и 5 мг химотрипсина, общая концентрация ферментов 0,114 мг N/мл; ферменты вводились одновременно, чтобы не было изменения субстрата под действием только одного фермента.

Начальные скорости протеолиза определялись из наклона касательных к кинетическим кривым, проведенных через начало координат. Из анализа кривых *I*, *II* и *IV* рис. 1 видно, что начальная скорость протеолиза при совместном действии трипсина и химотрипсина значительно превышает сумму начальных скоростей раздельно действующих ферментов.

Данные рис. 1 показывают, что начальная скорость протеолиза под действием смеси ферментов составляет 162% от суммы начальных скоростей действия отдельных ферментов. В другой серии опытов получено 155%.

Значительный интерес представляет кривая *III* рис. 1, которая отражает кинетику действия смеси трипсина и химотрипсина, составленной так, что их общая концентрация была равна концентрациям ферментов в случае их раздельного действия (*I* и *II* на рис. 1) и составляла 0,057 мг N/мл. Несмотря на равную концентрацию азота ферментов, в случае смеси процесс идет намного более интенсивно (табл. 1). Этот факт также свидетельствует о взаимном влиянии ферментов. Полученные данные имеют и биологический интерес; они важны, в частности, для понимания процесса протеолиза в тонких кишках под влиянием смеси протеолитических ферментов. Смесь ферментов, повидимому, обусловливает наибольшее расщепление белков пищи за относительно короткий срок пребывания ее в пищеварительном тракте.

Полученные экспериментальные данные хорошо согласуются с теоретическими предположениями и в значительной мере подтверждают представление о содержании двух молекул фермента в каталитически активном комплексе.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
15 X 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Th. S. Price, Zs. phys. Chem., **27**, 474 (1898). [2] E. Spitalsky, ibid., **122**, 257 (1926). [3] L. Michaelis, M. Menten, Biochem. Zs., **49**, 333 (1913). [4] Дж. Холден, Энзимы, 1934. [5] В. А. Белицер, Е. Л. Ходорова, Укр. биохим. журн., **22**, 101 (1950). [6] П. В. Афанасьев, ДАН, **63**, 61 (1948); Биохимия, **14**, 259 (1949); Изв. АН СССР, сер. биол., **3**, 253 (1949). [7] П. В. Афанасьев, О природе и кинетике ферментативных процессов, Диссертация, М., 1950. [8] M. Kunitz, J. H. Northrop, J. Gen. Physiol., **19**, 991 (1936).