

УДК 577.15/17:577.1502:541.128

## ПРИНЦИПЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

*Л. А. Николаев*

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	580
II. Краткий исторический обзор	583
III. Некоторые модели важнейших ферментов	586
IV. Сопоставление свойств моделей и биокатализаторов	598

## I. ВВЕДЕНИЕ

Сто тридцать лет назад в солодовом экстракте было обнаружено вещество, способное каталитически превращать крахмал в сахар. Открывшие этот природный катализатор Пайон и Персо называли его диастазой, т. е. «разделяющей», обратив внимание на вызываемое им разделение декстрина и оболочки зерен крахмала<sup>1</sup>. Эти ученые не могли предполагать, что именно им выпало на долю подойти к границе области, в которой деятельность удивительных химических «машин» неуловимыми нитями связана с жизнью. Возрастающая притягательная сила проблем энзимологии направила к ним внимание химиков и физиков, и ни один из них не нашел в новом и таинственном мире ничего, что он мог бы назвать тривиальным с позиций своей науки.

Биокатализаторы представляют собой продукты длительной эволюции, продолжавшейся, по-видимому, несколько миллиардов лет. За это время вещества, обычно применяемые в технике для целей катализа (окислы, соли, сульфиды и т. п.), успели в значительной мере дезактивироваться, — хорошо известно, что будучи свежеприготовленными соединения обладают большей активностью, чем в той форме, в какой их находят в недрах земли. Таким образом, характер развития каталитически активных систем по биологической ветви принципиально отличался от типичной эволюции неорганических продуктов.

Биокатализ является одной из сторон жизни. В глазах тех, кто размышлял об основных законах биохимии, биокатализаторы приобрели совершенно особое значение, когда выяснилось, что почти все химические процессы, протекающие в клетках, являются каталитическими.

Развитие и совершенствование форм жизни, а также ее возникновение оказались, таким образом, обусловленными совокупным действием катализаторов. Жизнедеятельность разнообразных организмов по существу и была уже с отдаленных (в геологическом отношении) времен важнейшим каналом, по которому снижались химические потенциалы. Следовательно, появление и развитие биокатализаторов можно рассматривать как выражение общего закона, в силу которого процессы выравнивания потенциалов в природе каким-то образом формируют необходимые для них механизмы.

Фактически дело обстоит так, что почти любое богатое энергией вещество, образовавшееся на земле, в итоге действия радиации или нагрее-

вания может стать субстратом для питания того или иного организма — гетеротрофного или автотрофного. При этом каталитические системы оказываются обладающими необычайной универсальностью. Ферменты, или точнее их совокупности, способны производить эффекты, реализация которых при помощи обычных катализаторов очень трудна, а иногда и невозможна.

Универсальность ферментов как химических инструментов подчеркивается тем, что эти инструменты практически одинаковы и у простейших, и у очень сложных организмов. Более того, эволюция форм живых организмов почти не сказалась на химической природе биокатализаторов, необходимых для жизнедеятельности.

Одним из самых поразительных заключений, к которому пришла эволюционная биохимия, является заключение, что формирование биохимических систем, осуществляющих метаболические процессы, в основном закончилось в отдаленные времена<sup>2</sup>. Таким образом, какие-то стимулы, которые действовали до этого времени, по неизвестным причинам перестали играть роль факторов химической перестройки, словно задача, поставленная перед ними на какой-то ступени развития, оказалась разрешенной.

Было бы очень интересно выяснить, в силу каких причин тот или иной фактор прекращает свою «творческую» деятельность, и почему в определенных условиях химическая эволюция важнейших каталитических систем чрезвычайно замедлилась, а практически вовсе прекратилась. Ответ на этот вопрос при настоящем положении дел можно, по-видимому, дать только в самой общей форме. Если мы будем рассматривать какую-либо часть сложной химической системы и проследим, как отражается влияние данного химического фактора на структуру выбранной нами части системы, то обнаружим ряд последовательных изменений состава, и, как следствие, — также и макроструктуры. Действующим фактором может быть, например, окисление посредством перекиси водорода или фосфорилирование, приводящее к образованию пирогосфатных связей. Действие данных факторов может прекратиться по двум причинам. Первая из них сводится просто к возникновению молекул или групп молекул, инертных по отношению к данному фактору. В этом случае резистентность не будет постоянной, так как химическая эволюция все-таки имеет какую-то возможность возобновиться в результате накопления вещества.

Другая причина прекращения действия внешнего фактора — это возникновение в рассматриваемом участке системы определенного катализатора: например, окислительный эффект и соответствующая химическая перестройка системы под влиянием перекиси водорода станут невозможными как только эволюция приведет к возникновению каталазы. Появление ферментов, переносящих остатки фосфорной кислоты, конечно, внесет элемент регулирования в процессы образования эфиров фосфорной кислоты и т. д.

Можно даже приблизительно представить себе последовательность, в которой внешние химические атаки теряли свой деформирующий хаотический характер и благодаря развитию каталитических систем приобретали характер пусковых механизмов для согласованных процессов, поддерживаемых одними и теми же катализаторами.

Вероятно, процессы, связанные с переносом богатых энергией групп, а также процессы переноса водорода надо отнести к наиболее древним, т. е. раньше всех подвергшихся регулированию.

Значительно позже были упорядочены и прекратили свое формирующее действие процессы с участием молекулярного кислорода. То же, по-видимому, относится и к процессам фотосинтеза. В связи с этим полезно обратить внимание на статью Камена<sup>3</sup>, в которой указывается, что анаэробы, синтезирующие хлорофилл, отличающийся от того, который

необходим для фотосинтетического образования кислорода, не могут существовать в атмосфере, содержащей даже следы кислорода. Все живые организмы ранее были анаэробами. Различные виды этих организмов, имевшие фотосинтетический аппарат, располагали системой катализаторов, очень сходной с той, которая обеспечивает дыхание аэробов; только отсутствие цитохромоксидазы, характерное для анаэробов, играет, по-видимому, важную роль в их судьбе.

Высокие молекулярные массы белков и сложная структура активного центра протеолитических ферментов дают основание полагать, что эти каталитические системы возникли относительно позднее. Все эти догадки, несомненно, очень спорны, однако нам кажется целесообразным искать связь между причинами, вызвавшими прекращение химических перестроек клеточного вещества, и действием биокаталитических систем. Основная трудность этой проблемы заключается в том, что при ее анализе надо учитывать не только внешние, но и внутренние факторы, и поэтому, быть может, было бы правильно искать решения аналогичных задач на модельных структурах.

Однако само по себе прекращение действия того или иного внешнего химического фактора в результате формирования катализатора, конечно, совершенно недостаточно для объяснения важных сторон деятельности систем катализаторов в природе и прежде всего недостаточно для истолкования процесса развития.

Желая понять смысл законов, которым подчинено развитие биокаталитических систем, мы можем сделать предположение, что эти законы способны проявить себя и в гораздо менее сложных структурах, чем живой организм. Это соображение приводит к задаче моделирования как отдельных «узлов» биохимических «машин», так и биокаталитических систем в целом.

В наши дни термин «моделирование» употребляется, вероятно, гораздо чаще, чем в какую-либо иную эпоху развития естествознания.

Характерно, что моделирование сделалось целью исследований, с одной стороны, биохимиков, сравнивающих химическую природу ферментов и менее сложных соединений, а с другой — физиков и инженеров, интересующихся проблемами кибернетики. Молодая отрасль науки — бионика занимается созданием механизмов, воспроизводящих системы связи в сложных совокупностях клеток. При этом химик обращает внимание главным образом на молекулы, которые, по его представлениям, скрывают в своих недрах ключи к тайнам поведения клеточного вещества, а инженер, собирая реле и другие детали, имитирующие функции нейронов, мало интересуется тем, из какого материала они сделаны. Но такое разделение точек зрения может быть только временным.

В действительности ход биохимической эволюции привел к формированию систем, в которых «материал» наилучшим образом удовлетворяет требованиям дальнейшего развития. Это развитие уже не связано с существенной перестройкой молекул материала: чисто химическая эволюция, как было отмечено, в основном завершилась очень давно. С этого времени ход развития все более сложных форм жизни действительно стал напоминать комбинирование готовых «реле» в руках «конструктора». Однако если мы ограничимся, с одной стороны, копированием систем связей организмов, а с другой, моделями отдельных ферментов, мы упустим из вида необходимость исследования закона, в силу которого возникает такая «независимость от материала».

Вопрос о моделировании процесса саморепродукции рассматривали Нейман, Пенроз и Кроль (см. <sup>4</sup>).

Во всех случаях «среда» состояла из радиотехнических деталей, которые заменяли питательную среду организмов и служили сырьем для самоорганизующихся машин. Кроль заметил, что поскольку таких искусственных сред в природе не существует, мы не можем стать свидете-

лями эволюции машин, не приготовив искусственно необходимые среды. Это замечание крайне характерно — оно указывает на ситуацию, в которой проблема решается «с двух концов». Очевидно, что наиболее сложной является проблема на «стыке» двух направлений — молекулярного и машинного, и в то же время именно она представляет исключительный интерес.

Вероятно, независимость от материала ощущается особенно отчетливо, когда речь идет о высших функциях сложных организмов одного и того же вида. Если тождественность реакций, лежащих в основе таких явлений, как например, мышечная работа человека и свечение насекомого, может вызвать удивление, то еще более поразительным кажется необычайное разнообразие форм психической деятельности человека, т. е. систем, химические, энергетические и другие свойства которых представляют глубокое сходство.

Исследование роли химических структур в организмах показывает, что мы имеем дело с такими исходными соединениями, которые способны образовывать структуры высшего порядка, более высокого ранга организации, обладающие совершенно новыми свойствами и необычайной стабильностью. При этом они сами не являются статичными — они возникают и распадаются так, что это собственно некоторые «формы» процесса или совокупности процессов, связанные со средой обратными связями. Важнейшим условием их существования можно считать удивительно согласованную работу каталитических систем тех самых ферментов, модели которых с каждым годом привлекают возрастающее внимание. Мы хотели бы подчеркнуть, что изучение моделей ферментов нельзя отделить от общих проблем биохимической эволюции.

## II. КРАТКИЙ ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР

Вопрос о моделировании биокатализаторов — ферментов имеет полувековую историю. Первые попытки воспроизведения функций ферментов характеризовались стремлением прежде всего добиться высокой активности, так как именно эта сторона действия фермента особенно привлекала внимание химиков.

Сюда относятся опыты с коллоидными металлами — платиной, палладием и другими. Полученные в начале текущего столетия Паалем и Скита золи металлов обнаружили высокую каталитическую активность в ряде реакций, особенно в реакциях гидрирования<sup>5, 6, 7</sup>. Эксперименты Бредига и других показали, что в некоторых отношениях (высокая активность, способность отравляться) золи металлов действительно напоминают ферменты. Однако глубокое различие в химической природе между металлом и белковым веществом фермента не дает основания считать золи моделями биокатализаторов.

В 1908 г. Бредиг и Фаянс нашли, что никотин обладает каталитическими функциями и, в частности, расщепляет оптические изомеры камфорных кислот<sup>8</sup>.

К 1912 г. относится работа Гоффмана и Готлоба<sup>9</sup> по органическим ускорителям процесса вулканизации. В 1926 г. был сделан первый шаг по исследованиям активности групп, характерных для фермента. Кун и Бранн изучили зависимость каталитической активности железа в зависимости от формы связи. Они исследовали каталитическую активность гемина, т. е. органического комплексного соединения железа с протопорфириновым ядром. Соединения этого типа представляют собой активную группу большого числа ферментов, катализирующих окислительные процессы, и поэтому вопрос о свойствах гемина был важен с точки зрения моделирования. В ферментах гемин связан с белком, и измерения активности изолированного гемина в какой-то степени проливали свет на роль белка в биологических катализаторах<sup>10</sup>.

Изучению каталитической активности гемина было посвящено довольно большое число работ (см<sup>11</sup>). Гемин является активным катализатором распада перекиси водорода и ряда окислительных процессов. Однако именно эти эксперименты показали особенно отчетливо, что активная группа, отделенная от своего носителя, обладает значительно меньшей активностью и весьма слабо выраженной избирательностью. Интересно, что активность гемина в реакции разложения перекиси водорода можно увеличить при адсорбции его на угле. Адсорбция активирует гемин по отношению к определенным, но не всем реакциям, в которых он вообще проявляет себя как катализатор.

Простые ионы железа тоже активируются при адсорбции на угле. Такие системы можно рассматривать как простейшие и очень грубые модели ферментов, в которых уже более определенно намечены активная группа и носитель.

Обугливание гемина дает уголь, содержащий железо. Этот уголь, по данным Варбурга<sup>12, 13</sup>, сам по себе проявляет значительную активность при окислении аминокислот. Изучение его магнитных свойств и рентгеноструктурный анализ привели нас к заключению, что и здесь мы имеем дело со сложными органическими соединениями железа, прочно адсорбированными на угле и содержащими азот<sup>14</sup>.

Кун и Бранн в 1926 г. отметили отчетливое пероксидазное действие комплексных соединений железа<sup>10</sup>. Баудиш годом раньше изучал пероксидазные свойства катализатора, представляющего собой натриевую соль типа пентацианоферроата и обнаружил, что это вещество ускоряет окисление перекисью водорода смеси фенилендиамина с бензидином<sup>15</sup>.

В 1929 г. Эйлер и Янсон<sup>16</sup> указали, что комплексные соединения меди с оксикислотами и аминокислотами почти не обнаруживают активности в реакции разложения перекиси водорода, но комплексы с пиридином и аммиаком — активны. Вероятно, вследствие того, что эти авторы работали со слабыми растворами, они получили неправильное значение активности пиридинового комплекса. В действительности активность по крайней мере в 15 раз больше, чем указано в их статье.

Большое внимание привлекло исследование, проведенное Маншо и Пелан над комплексами железа с  $\alpha, \alpha$ -дипиридилем<sup>17</sup>. Катализная функция этого комплекса, по-видимому, не связана с изменением заряда иона двухвалентного железа, и активен комплексный ион, содержащий одну и две молекулы дипиридила на ион железа.

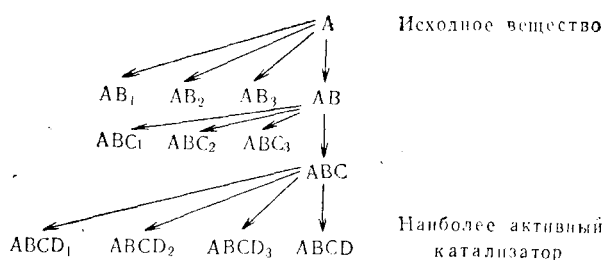
В 1932 г. появились исследования Бреди́га и Герстнера по так называемым фазер-катализаторам. Эти катализаторы представляли собой целлюлозу, химически связанную с диэтиламинем. Амин играл роль активной группы, а целлюлоза — роль носителя. Фазер-катализаторы, которые Лангенбек считает первыми моделями ферментов, ускоряли отщепление углекислоты от бромкамфорных кислот и обнаруживали признаки оптической избирательности<sup>18</sup>.

Шибата с сотрудниками изучали стереохимическую избирательность действия комплексных соединений кобальта, обладавших оптической активностью. В частности, было найдено, что *d*-катехин окисляется быстрее под влиянием *d*-форм комплексных соединений кобальта<sup>19, 20</sup>.

Особенно интересны работы Лангенбека<sup>21</sup>, который, изучая органические катализаторы для определенной реакции, развил и практически применил принцип «систематического активирования». Смысл принципа заключался в подборе ряда веществ, оказывающих на данную реакцию ускоряющее действие: из этого ряда выбирают активные вещества и их молекулы химическим путем изменяют. Изменение состоит в замещении и присоединении новых групп. Из всех полученных производных вновь отбирают наиболее активные и снова подвергают дальнейшему усложнению посредством замещения. Этот путь привел Лангенбека к крупному успеху. Ему удалось, подбирая катализаторы для реакции де-

карбоксилирования, постепенно настолько повысить активность катализатора, что наиболее совершенная модель имела активность лишь на порядок меньше, чем природный фермент. Начальным звеном в цепи этих катализаторов был метиламин, являющийся довольно слабым катализатором, а конечным — 1-метил-3-аминооксиндол. Субстратом реакции служила фенилглиоксиловая кислота.

Общая схема метода Лангенбека может быть кратко записана в виде:



Лангенбек получил далее и гетерогенную модель карбоксилазы, применив в качестве носителя салицилово-метиловый эфир и лецитин, которые растворяли катализаторы и в водном растворе образовывали эмульсию.

Метод постепенного усложнения молекулы путем замены определенных атомов в органическом катализаторе на радикалы оказался плодотворным и по отношению к порфириновым комплексам железа. Лангенбек показал, что присоединение к гемину имидазола или его производных резко увеличивает каталитическую активность по отношению к разложению перекиси водорода и окислению пирогаллола и цистеина.

Изучая модели дегидраз, Лангенбек использовал ранние наблюдения Траубе и нашел, что изатин можно рассматривать как модель аминоксидразы. Интересно, что при этом водород, отданный аминокислотой, может быть передан не только кислороду, но и другому акцептору, например метиленовой сини.

Активные группы ряда важных ферментов содержат комплексно связанный металл. Поэтому вполне естественно, что одной из задач моделирования было выяснение возможностей использования комплексных соединений в качестве катализаторов. Однако проблема оказалась более сложной, чем это могло показаться на основании анализов каталазы или оксидаз различного типа. Большое число металлов существенно необходимо для функционирования биокаталитических систем, причем способ действия катионов часто остается неясным, хотя наличие того или иного катиона — «активатора» в каталитической системе не вызывает сомнений.

В настоящее время установлено, что в живых организмах очень часто недостаток ионов какого-либо металла возмещается избыточным содержанием другого.

Недавно Хэвит<sup>22</sup> опубликовал обзор случаев метаболизма микроэлементов в растениях. В клетках растений возможна общая или частичная замена кальция на стронций, молибдена на вольфрам или ванадий, калия на рубидий и т. д. Это обстоятельство, несомненно, связано с активирующим действием ионов металлов на различные ферменты. Несомненно, что большое число ферментов, активные группы которых не содержат металлов, способны проявить свое действие только в присутствии ионов металлов, играющих роль активаторов.

Активирующее действие ионов металлов гораздо менее специфично, чем функция ионов, образующих комплексные катализаторы с постоян-

ным составом. Так, например, фермент тирозиназа активируется ионами железа, кобальта, марганца; лейцинаминопептидаза активируется магнием и марганцем; аргиназа — марганцем, кобальтом, никелем и железом; активаторами карбоксилазы являются ионы марганца, кадмия, цинка, свинца, никеля, железа, магния, бария и меди. Столь же велико число активаторов у некоторых видов фосфатаз.

Таким образом, каталитические функции ионов металлов переходного типа довольно отчетливо делятся на две группы в соответствии с механизмом действия.

Первую группу составляют случаи каталитического действия, когда металл образует определенные соединения с узко ограниченными функциями. Сюда следует отнести, конечно, такие комплексные соединения, как каталазу, пероксидазу и другие геминовые ферменты, витамин  $B_{12}$  — комплексное соединение кобальта. Как правило, в этой группе нельзя заменить один металл другим без глубокого изменения каталитических свойств.

Ко второй группе следует отнести те процессы, в которых ионы металлов являются только активаторами. Основания для такого деления лежат именно в том, что ионы, относящиеся к первой группе, оказываются «незаменимыми», и, следовательно, механизмы действия в обеих группах не могут быть вполне идентичными. Следует отметить, что в то время как многие свойства отдельных комплексных соединений первого типа хорошо исследованы, механизм действия активаторов в большинстве случаев неизвестен и иногда кажется совершенно загадочным<sup>23, 24, 25</sup>.

Особенно важен тип активных сочетаний, включающих ион металла, в котором повышение активности иона достигается посредством связывания его с определенными аддендами, не являющимися субстратом реакции. Классическим примером таких комплексов являются металлопорфирины. Большой активностью в окислительно-восстановительных реакциях обладают аминные комплексы меди и ряд комплексов железа, кобальта и других металлов.

Еще более сложна система, в которой высокая активность достигается путем связывания комплекса металл — адденд с протеиновым носителем. Представителями этого класса являются ферменты и некоторые их «модели». В известном обзоре этой проблемы, сделанном Швабом и Ростом около четверти века тому назад (см.<sup>26</sup>), можно найти сводку модельных катализаторов, в которой авторы не разделяли моделей, имитирующих собственно активную группу, и моделей, включающих высокомолекулярный носитель. Модели были разделены на пять групп. К первой авторы отнесли «неорганические ферменты», т. е. коллоидные гидроокиси металлов и гидроокиси, обладающие гидролазными (фосфатазными) функциями, ко второй — «дыхательные модели» Варбурга и Краузе, т. е. уголь и смеси гидроокисей переходных металлов, затем следовали органические основания и комплексные катализаторы (соединения кобальта), изученные Шибата. В четвертой группе находились катализаторы типа металл — кварц и фазер-катализаторы. В пятую группу были помещены гемин и «главновалентные» катализаторы Лангенбека.

### III. НЕКОТОРЫЕ МОДЕЛИ ВАЖНЕЙШИХ ФЕРМЕНТОВ

В настоящее время число модельных катализаторов возросло, и прогресс знаний в области ферментологии позволил найти лучшие критерии для отнесения того или иного катализатора к числу «моделей», чем данные о его активности. Золи металлов и кварц, по-видимому, совершенно нецелесообразно рассматривать в качестве моделей. Близость общего типа химической структуры модели к типу строения истин-

ного активного центра фермента постепенно становится отправной точкой поисков в этой области.

В докладе, представленном V Международному биохимическому конгрессу, Вестхеймер указал на успехи в области моделирования, которые привели к созданию каталитических систем, работающих в условиях, близких к условиям клетки, и по механизмам, подобным ферментам. Он выразил уверенность, что уже скоро мы сможем рассматривать не модели, а аналоги ферментов<sup>27</sup>.

Вместе с тем выяснилось, что в механизме действия ферментов имеются своеобразные черты, для которых мы не можем подобрать простых аналогий в обычном катализе. Поэтому было бы разумнее моделировать не столько катализаторы, сколько сам катализ в тех высокоорганизованных системах, в которых действуют ферменты.

Что касается отдельных соединений, обладающих сходством в строении и активности с ферментами или их кофакторами, то, не пытаясь исчерпать всю литературу вопроса, мы приведем некоторые типичные модели важнейших ферментов. Окислительно-восстановительные ферменты моделировались особенно часто. Каталаза, активная группа которой является металлопорфирином, и донные представляет собой излюбленный объект моделирования. Модели активной группы каталазы искали среди комплексных соединений различных металлов.

С 1946 г. в нашей лаборатории<sup>28, 29, 30, 31</sup> проводились исследования каталитической активности различных комплексных соединений меди, железа, кобальта, никеля, цинка, свинца и других металлов по отношению к реакциям разложения перекиси водорода, окислению полифенолов, бензальдегида, фенилендиамина, аскорбиновой кислоты, сероводорода и некоторых других субстратов. Особенно детально изучались соединения меди, так как каталитическая функция иона меди может быть активирована посредством комплексообразования с аммиаком и аминами почти в миллион раз. Соответствующие комплексы могут поэтому рассматриваться как «медные» модели фермента каталазы. Варьируя природу аддендов, мы можем оценить в какой мере существенны для уровня каталитической активности такие факторы, как образование хелатов, замещение в координационной сфере атомов азота на другие атомы, величина pH, стабильность комплексов и т. д. Для большинства исследованных нами комплексов порядок реакции по перекиси водорода был близок к первому, т. е. картина в целом очень походила на то, что наблюдалось у аммиака.

Общей закономерностью является наличие максимума на кривой, показывающей зависимость активности от концентрации свободного адденда в растворе. Величины концентраций аминсоединений, отвечающие максимумам активности, конечно, зависят от природы амина и иногда бывают довольно велики<sup>32</sup>. Это связано с образованием более или менее лабильных комплексов с шестерной координацией при избытке адденда. Свободные места в координационной сфере существенно необходимы для катализа. Практически активность часто удобно оценивать количеством молей перекиси водорода, подвергшихся разложению за 1 минуту начального периода реакции (например за первые 5 или 10 минут) в расчете на 1 *г-ион* меди. Если кривая зависимости количества разложившейся перекиси во времени заметно отклоняется от линейного хода, экстраполяцией находят тангенс угла наклона касательной к этой кривой в начале координат. Концентрацию амина целесообразно поддерживать при этом на уровне, отвечающем максимальной активности. Поставив опыты с различными буферными растворами можно ввести поправку на pH, т. е. привести активности к одному pH. В табл. 1 указаны наиболее характерные модели каталазы. Некоторые из них столь активны, что лишь на один — два порядка уступают ферменту. Необходимо помнить, что каталаза является совершенно исклю-



чительным по своей активности биокатализатором, и поэтому создание столь деятельных моделей представляет интерес и с точки зрения теории катализа безотносительно к проблеме моделирования.

Интересно, что пиперидин дает очень мало активный комплекс (активность 1, 2). Это указывает на значение, которое имеет аминный азот в проявлении каталазной функции комплекса.

ТАБЛИЦА 1

Некоторые модели каталазы, содержащие металл\*

Ион металла	Адденд	Активность	Ссылк на литературу
$\text{Cu}^{\text{II}}$	Аминокислоты, пиперидин, пептиды, белки	слабая	28, 32, 33
$\text{Fe}^{\text{III}}$	Салициловая кислота	слабая	34
$\text{Cu}^{\text{II}}$	Амиды, аминоспирты, пиридин, пиколин	средняя	28, 35
$\text{Fe}^{\text{III}}$	Гем, его производные, фенантролин, фталодианины	средняя	21, 36
$\text{Cd}^{\text{II}}$ , $\text{Zn}^{\text{II}}$ $\text{Pb}^{\text{II}}$ , $\text{Fe}^{\text{III}}$ , $\text{Co}^{\text{II}}$	Основания Шиффа	средняя и слабая	37, 38
$\text{Cu}^{\text{II}}$	Аммиак, амины, диамины, N-замещенные диамины, биурет	высокая	28, 30
$\text{Fe}^{\text{III}}$	Триэтиламинотетрамин	высокая	39

\* Катализаторы, проявляющие активность, близкую к I, названы слабоактивными, если активность  $\sim 10$ , катализаторы среднеактивны и при активности более 100 — высокоактивны.

Заслуживает внимания вопрос о каталитических функциях комплексов, образуемых ионами переходных металлов с биуретом, триуретом, пептидами и белками<sup>37</sup>.

Биуретовые комплексы обладают наивысшей активностью на границе своего разложения; если увеличить в растворе концентрацию биурета так, чтобы комплекс сделался устойчивым, активность резко падает<sup>34</sup>.

Мы исследовали разложение перекиси водорода биуретовым комплексом при разных температурах. Было установлено, что температурный коэффициент этой реакции очень мал. Энергия активации равна 1500—2000 ккал/моль. Таким образом, высокая каталазная активность здесь соответствует низкой энергии активации. Биуретовый комплекс более активен, чем аммиакат меди и несомненно представляет собою мощный каталазный катализатор, содержащий медь.

Активность белково-биуретовых комплексов, хотя и слабо, но все же зависит от природы белка. Глобулины дают наиболее активные комплексы; затем следуют желатина, казеин и альбумин.

Переходя к рассмотрению каталитических свойств комплексных соединений железа, мы прежде всего подчеркнем, что железо-порфириновые комплексы, являющиеся, как известно, активной частью ряда окислительных ферментов и переносчиков электронов, могут проявлять значительную активность и будучи изолированы от белкового носителя. Присоединение к железо-порфириновым комплексам некоторых веществ

повышает их активность. К таким веществам относятся пиридин, имидазол и его производные, резко повышающие активность гема. Особенно интересно, что, выбирая различные производные имидазола, мы получаем возможность влиять на специфичность каталитического действия: соединение гема с 4,5-имидазолсульфонокислым натрием обладает сильно выраженными пероксидазными свойствами и не катализирует разложение перекиси водорода: однако соединение гема с имидазолом в четыре раза активнее в этой реакции, чем сам гем<sup>21</sup>. Соединения подобного типа, по-видимому, могут образовываться в организмах и выполнять определенные биологические функции, однако их все же можно рассматривать как модели, поскольку в этом случае избирательность действия регулируется не белковой частью катализатора, а гораздо менее сложной группой.

Введение амминного азота в координационную сферу комплекса активирует каталазную функцию иона железа. При обработке растворов нитропруссиды натрия аммиаком, как известно, получается соединение состава:  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$ .

Мы сравнили каталазную активность растворов ферроцианида калия, нитропруссиды и указанного аммиачного комплекса.

Гексациановый комплекс и нитропруссид обладают очень малой активностью. Введение аммиака в комплекс резко увеличивает его каталазную активность — наблюдается тот же эффект, который с такой ясностью мы констатировали, рассматривая комплексные соединения меди.

Комплексные соединения металлов с основаниями Шиффа, в частности полученными из *o*-аминофенола и салицилового альдегида (САФ), представляют объект исследований, заслуживающий внимания, так как, несмотря на малую устойчивость к действию перекиси водорода, они проявляют в неводных и смешанных растворах такие эффекты, которые не удастся наблюдать в чисто водных средах.

Савич, Кудрявцев, Кундо и Николаев изучали разложение  $\text{H}_2\text{O}_2$  в воде, в боратном буфере. При pH, равном 6—7, в водном растворе активны только соединения кобальта, меди и никеля; другие ионы не образуют с САФ активных комплексов. В боратном буфере при pH 9,8 проявляется значительно большая активность и притом у всех ионов; порядок возрастания активности иной: никель, кадмий, медь, цинк, свинец, железо, кобальт. Более чем в три раза повышается активность комплекса, содержащего кобальт, очень резко повышается активность соединений железа<sup>37, 38, 40</sup>.

Особенно интересно появление активности у соединения цинка. Дело в том, что ион цинка почти не обнаруживает каталазной активности. В этом случае мы имеем дело с возникновением качественно новой каталитической функции при переходе от иона к комплексу.

Еще более поразительные результаты наблюдаются у растворов в пиридине. Каталазная активность ионов свинца в форме комплексов с САФ возрастает (при пересчете на металл) почти в 300 раз по сравнению с активностью простого иона. Тот же порядок активации наблюдается и у железа, кобальта и никеля. Последнее заслуживает внимания, так как и ион никеля и многие его комплексы почти лишены каталазной активности. Порядок возрастания активности в пиридиново-водных смесях (10% воды) следующий: цинк, кадмий, медь, никель, кобальт, железо, свинец. Сопоставление данных о строении аддендов и активности различных комплексов позволяет сделать заключения более или менее общего характера, по крайней мере для водных растворов. Каталазной активности благоприятствует наличие амминного азота в координационной сфере: именно присутствие четырех атомов азота и хелатная структура комплекса. Расчеты распределения электронной плотности, выполненные для некоторых активных комплексов меди Гудо<sup>41</sup>, пока-

зали, что большой активности отвечает наличие отрицательного заряда на ионе меди, т. е. имеет место выраженный донорный эффект.

Каталазная активность снижается, если в координационную сферу входит кислород, или если получается координационно насыщенный комплекс. Относительно малая устойчивость комплекса обычно характерна для высоко активных соединений.

Что касается механизма реакции разложения перекиси этими комплексами, то радикальный механизм, по нашим данным, здесь мало вероятен. Имеются основания считать, что комплексы образуют промежуточные продукты, содержащие  $\text{HO}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В большинстве случаев эти продукты образуют «рыхлые» переходные состояния, и кинетические уравнения содержат большие энтропийные множители и сравнительно высокие значения энергии активации. Однако это не является общим правилом, и некоторые комплексы (например  $\text{Cu}$ -биурет) характеризуются низкой энергией активации.

Оксидазные функции комплексных соединений представляют картину большего разнообразия, чем каталазные, хотя обычно не удается наблюдать столь резкого подъема активности в результате комплексообразования, как это имело место, например, у иона меди. В окислительных реакциях, катализируемых ионами металлов, комплексообразование и, в частности образование хелатов, может снизить каталитическую активность, свойственную иону. Подобное явление обычно происходит при соединении иона с аддендами, дающими прочные комплексы <sup>46</sup>.

ТАБЛИЦА 2

Модели различных оксидаз и пероксидазы

Ион металла	Адденд	Реакция	Ссылки на литературу
$\text{Mn}^{\text{II}}$ $\text{Fe}^{\text{II}}$	Дисалицилиден-этилендиамин	Окисление циклогексена	42
$\text{Fe}^{\text{II}}$	Пирокатехин	Окисление аскорбиновой кислоты	43
$\text{Fe}^{\text{II}}$	Антипириントлуол-сульфокислота	То же	43
$\text{Fe}^{\text{II}}$	Нитропруссид натрия	Окисление пирогаллола	44
$\text{Fe}^{\text{II}}$	ЭДТА	Окисление тетралина, окталина, пинена, метилциклогексена, пирогаллола, бензальдегида, олефинов и т. д.	45
$\text{Cu}^{\text{II}}$	Гистидин, инсулин	Окисление аскорбиновой кислоты	43
$\text{Mn}^{\text{II}}$	Дисалицилиден-этилендиамин	Окисление льняного масла	46
$\text{Cu}^{\text{II}}$	Аминспирты, пиридин, этилендиамин, пропилендиамин, морфолин	Окисление пирогаллола	47, 48
$\text{Cu}^{\text{II}}$ , $\text{Co}^{\text{III}}$ , $\text{Ni}^{\text{II}}$	Основание Шиффа	Окисление аскорбиновой кислоты и пирогаллола	40
$\text{Co}^{\text{III}}$	Этилендиамин, аммиак, хлор	Окисление катехина	19

Шэк и Смит<sup>42</sup>, исследовавшие окисление циклогексена в присутствии ионов меди, марганца, железа установили, что все ионы ускоряют процесс: медь в ~ 100 раз, железо — в 10 раз и марганец в 200 раз. Связывание этих металлов дисалицилденэтилендиамином резко повысило активность железа (в ~ 40 раз), немного увеличило активность марганца и в ~ 10 раз уменьшило активность меди. Этот пример характерен в том отношении, что он показывает насколько специфично действие того или иного адденда на качественное и количественное выражения каталитической функции иона. В связи с этим Тьюе обращает внимание на явное сходство в структурах комплекса железа с ЭДТА и цитохрома<sup>43</sup>.

Другой аналогичный пример мы находим при рассмотрении фталоцианинов. Фталоцианины по типу структуры очень похожи на порфирины, и поэтому оправдан интерес к результатам сопоставления каталитических свойств металлических комплексов того и другого класса. Фталоцианины натрия, калия, кальция, бария и кадмия проявляют свойства солей, производные других металлов являются комплексными соединениями. В 1938 г. Кук<sup>36</sup> предпринял исследования каталитических свойств комплексных фталоцианинов различных металлов по отношению к реакции разложения перекиси водорода и реакциям окисления. Фталоцианины очень плохо растворяются в воде, и поэтому Кук растворял их в 75%-ном пиридине, а в некоторых случаях даже в концентрированной серной кислоте.

Были изучены каталазные свойства соединений железа, цинка, хрома, ванадия. Наибольшей активностью обладали, по данным Кука, соединения двухвалентного железа, Кук исследовал не только гомогенное разложение перекиси водорода. Стремясь сопоставить свойства гемина со свойствами фталоцианиновых комплексов, он наносил фталоцианиновые соединения на древесный уголь. Известно, что при адсорбции гемина на угле активность гемина сильно увеличивается. Сходный эффект получился и для фталоцианина железа. Адсорбированный на угле катализатор проявлял способность отравляться цианидами.

Кук исследовал катализированные металлофталоцианинами реакции окисления кислородом воздуха органических веществ, причем активным оказалось соединение железа. Фталоцианин железа способен функционировать как переносчик кислорода. Ввиду плохой растворимости комплекса в большинстве опытов речь шла о гетерогенном катализе и, кроме того, в некоторых реакциях окисления имело место значительное разложение фталоцианинового комплекса.

Пако<sup>50</sup> применил фталоцианиновые комплексы для ускорения окисления воздухом олефиновых углеводородов.

Миер<sup>46</sup> показал, что образование комплексов с диаминами значительно повышает каталитическую активность ионов железа (на 300%) и ионов марганца (на 480%), в реакции окисления льняного масла; интересно, что комплексообразование с этими аддендами почти не повлияло на каталитическую активность иона кобальта. По отношению к марганцу активирующим аддендом является дисалицилденэтилендиамин, а по отношению к железу — *o*-фенантролин. Для проявления активности важно образование цикла из 5 или 6 звеньев, включающего ион металла, связанный с азотом.

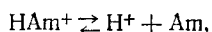
Медь в виде иона катализирует самые разнообразные окислительные реакции: окисление аскорбиновой кислоты, гидрохинона, цистеина, глутатиона и т. д.

Нам удалось обнаружить вещества, несколько активирующие окислазную функцию меди. В этих случаях сложный комплекс: активатор — медь — субстрат окисляется быстрее, чем комплекс: медь — субстрат. Активатором окислазной функции является гистидин, обладающий хотя и слабым, но вполне отчетливым активирующим действием на ион ме-

ди<sup>43</sup>. По отношению к окислению пирогаллола медно-гистиридиновый комплекс оказался неактивным.

Представляет значительный интерес изучение моделей ферментов, окисляющих полифенолы. Классические исследования А. Н. Баха, как известно, привели к заключению, что фермент, окисляющий пиррогаллол, содержит медь. В работах Корпусовой и Николаева<sup>47</sup> были исследованы различные комплексные соединения иона меди с точки зрения их способности ускорять окисление растворов пирогаллола газообразным кислородом. В результате было доказано, что образование комплексных соединений в ряде случаев позволяет значительно повысить каталитическую активность иона меди. Наиболее активные соединения получаются с моноэтаноламином и этилендиамином; очень активны также комплексы с изопропаноламином и пропилендиамином.

Особенно интересно, что сами по себе амины проявляют заметную каталитическую активность. Этот эффект, по-видимому, можно истолковать, предполагая, что в результате взаимодействия между пирогаллолом и аминами возникает водородная связь, в которой водород гидроксильной группы соединяется с амино-группой. Возникновение водородной связи облегчает окисление водорода. В водном растворе имеет место конкуренция между молекулами воды и пирогаллолом за электронную пару атомов азота в молекуле амина. Отсюда следует, что чем прочнее будет связь между водородом гидроксильной группы и амином, тем активнее будет соответствующий амин. Таким образом, если выразить взаимодействие между протоном и амином уравнением:



где  $\text{HAm}^+$  — протонизированная форма амина, то чем меньше будет константа равновесия этой реакции (т. е. чем выше будет концентрация протонизированной формы амина), тем большую активность должен

ТАБЛИЦА 3

Амин	Активность, см <sup>3</sup> О <sub>2</sub> /3 мин.	$K = \frac{[\text{H}^+][\text{Am}]}{[\text{HAm}^+]}$
Пиридин	0,8	$1,6 \cdot 10^{-6}$
Триэтиламин	1,1	$1,2 \cdot 10^{-8}$
Диэтиламин	1,4	$1,1 \cdot 10^{-10}$
Моноэтаноламин	3,2	$2,5 \cdot 10^{-10}$
Пропилендиамин	8,5	$1,1 \cdot 10^{-10}$
Этилендиамин	9,5	$3,0 \cdot 10^{-10}$

будет проявлять амин. Это действительно и наблюдается. В табл. 3 приведены величины констант равновесия и активности различных аминов.

Как видно из табл. 3, между константой равновесия и каталитической активностью наблюдается отчетливая симбатность.

Если сравнить активность этих лигандов с активностью комплексов, то оказывается, что повышение активности, связанное с комплексообразованием, зависит от природы амина и особенно отчетливо выражено у моно- и диэтиламина. Активность этилендиамина и пропилендиамина в результате комплексообразования почти не изменяется.

Таким образом, включение металла в лабильную систему амин — полифенол повышает скорость окисления не во всех случаях, а насколько можно судить по ограниченному данным, только когда мы имеем дело с аминами, не образующими хелатных структур. Эксперименты, проведенные нами с различными аминами, показали, что разность энтропий катализированной и некатализированной реакции зависит от природы амина. При этом изменяется не только ее величина, но и знак разности. Так, для изопропаноламина и моноэтаноламина эта разность положительна, и переходный комплекс, содержащий катализатор, имеет большую энтропию, чем переходный комплекс нормальной реакции.

Наоборот, катализаторы, в которых аддендами были пикколины, отвечают переходному комплексу с пониженной энтропией, и ускорение реакции связано с падением энергии активации.

Каталитическое действие комплексных соединений меди с морфолином в реакции соединения дифенолов было изучено Брекманом и Хавинга. Они предложили схему реакции, в которой существенная роль отводилась превращениям хинонов<sup>48</sup>. Эти авторы также обнаружили повышение уровня активности меди в результате комплексообразования. Многочисленные комплексные соединения с основаниями Шиффа в ряде случаев обнаруживают каталитическую активность. В 1956 г. появились работы Лангенбека и Кехлера<sup>37</sup>, в которых описывались каталитические свойства комплексов с основаниями Шиффа, полученными на основе сульфосалицилового альдегида. Параллельно были изучены хелаты, образуемые пиридоксалем, структура которого имеет некоторое сходство с салициловым альдегидом. В реакции окисления пирогаллола в пурпурогаллин активность проявили хелаты обоих типов. Очень активными оказались хелаты кобальта. Основание Шиффа с салициловым альдегидом активировало ион кобальта в 10 000 раз, а пиридоксальевое соединение — в 1000 раз.

Нами<sup>40</sup> было показано, что комплексы меди, кобальта и никеля с основаниями Шиффа, полученными из салицилового альдегида и *o*-аминофенола (САФ), проявляют заметную оксидазную активность. При исследовании зависимости каталитических функций комплексов этого типа от природы металла были изучены водные и водно-пиридиновые растворы комплексов кобальта, меди, никеля, цинка, кадмия, свинца и железа.

Привлекает внимание высокая активность комплекса, содержащего медь, которая, как известно, является специфическим катализатором окисления аскорбиновой кислоты. На втором месте оказывается железо и на третьем — кадмий и кобальт. Этот факт указывает на возможность активации оксидазной функции у таких мало активных ионов с постоянной валентностью, как кадмий.

При окислении пирогаллола в пиридине наибольшую активность проявил комплекс, содержащий кобальт. Все остальные ионы значительно уступают ему по оксидазной активности. На втором месте по активности стоит ион кадмия, в то время как железо обладает крайне малой активностью.

Значительно более трудна проблема моделирования гидролитических ферментов. Модели этих ферментов были получены, с одной стороны, при помощи типичных хелатных комплексов, а с другой, — при помощи некоторых аминокислот (табл. 4). Большинство теорий ферментативного гидролиза допускает в той или иной форме поляризационные эффекты<sup>51</sup>, которые могут быть обусловлены как ионами металлов, так и действием различных полярных групп. Активные группы гидролаз являются сочетанием структурных элементов полипептидных цепей. В активную группу химотрипсина, трипсина и других протеаз и эстераз входит определенная комбинация аминокислот, в которой большую роль играет гистидин. Механизм действия, по-видимому, основан на ацилировании фермента и гидролизе ацилированной формы; кроме гистидина важна последовательность гли-асп-сер-гли. Рядом авторов

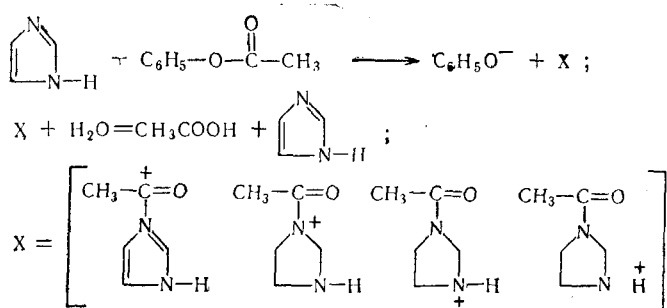
ТАБЛИЦА 4

Некоторые модели гидролаза

Соединение	Реакция	Ссылки на литературу
Комплексные соединения: Медь с аддендами: этилендиамином, дипиридином, гистидином, фенантролином, имидазолом	Гидролиз динизопропил-фторфосфата	52
Имидазол и его производные	Гидролиз фенилацетата	53

было показано, что трипсин и химотрипсин гидролизуют нитрофенилацетат (см. <sup>54, 55</sup>).

Свободный имидазол и его производные также обладают этим свойством. Промежуточный продукт — N-ацетилимидазол. Однако активность имидазоловой «модели» в  $10^5$  раз меньше активности фермента — химотрипсина. Исследовалась также каталитическая активность L-гистидина в этой реакции, причем оказалось, что блокирование аминной и карбоксильной групп в 3—4 раза повышает активность (см. <sup>54</sup>). Гидролитическая активность отмечена и у пептидов гистидина. Брюис и Шмир <sup>53</sup> исследовали каталитические свойства имидазола в реакции гидролиза фенолацетата. Авторы имели в виду роль, которую играют имидазольные группы гистидина как составные части активных участков гидролитических ферментов. Рассматривая механизм реакции гидролиза с участием имидазола, авторы пришли к заключению, что наиболее вероятна схема, согласно которой имидазол непосредственно реагирует с фенолацетатом, образуя фенол и некоторый продукт, последующая реакция которого с водой дает уксусную кислоту и снова катализатор; этот продукт, вероятно, представляет собой ацило-имидазольный комплекс, стабилизированный за счет суперпозиции нескольких структур:



Ионы металлов в природных гидролитических системах, несомненно, играют важную роль. Необходимость присутствия магния для гидролиза АТФ была истолкована (Слент-Дьерди <sup>56</sup>) на основе предположения, что магний оказывает поляризующее действие на изогнутую молекулу АТФ. Вполне естественно, что гидролитические эффекты могут быть вызваны комплексными ионами Вагнер-Яурега с сотрудниками <sup>57</sup> показали, что некоторые хелатные комплексы меди являются катализаторами гидролиза диизопропилфторфосфата. Наибольшей активности соответствуют комплексы, содержащие в качестве аддендов этилендиамин, α-дипиридил, гистидин, о-фенантролин, имидазол. Активные комплексы представляют собой координационно ненасыщенные соединения. Места в координационной сфере, представляющие собой реакционное пространство комплекса (пятое и шестое места), в водных растворах заняты гидроксидом или молекулой воды. Дальнейшие исследования обнаружили те же закономерности, что и наблюдавшиеся нами у каталитически активных комплексов. В частности, повышение устойчивости понижает каталитическую активность; активность является функцией рН и существенно зависит от наличия хелатного кольца.

Исследование комплексов, образованных ди- и триаминами, показало, что адденды этого типа можно расположить по убывающей активности комплексов в следующий ряд: тетраметилэтилендиамин, дипиридил, этилендиамин, гидроксиэтилэтилендиамин, дигидроксиэтилэтилендиамин, диэтилентриамин. Предполагается <sup>58</sup>, что гидролиз происходит в результате одновременного воздействия на субстрат ионов  $\text{OH}^-$  и двухводного металл-хелата. Возможно, что сначала возникает комплекс с субстратом, а затем следует атака со стороны гидроксид-иона.

Эта модель интересна в том отношении, что, по-видимому, субстрат (ДФФ) играет роль «организатора», сближающего в надлежащей конформации ионы ОН и собственно катализатор — хелат меди. В ферментологии неоднократно отмечали возможность организуемого влияния субстрата на компоненты активного центра. Интересно указание Анфинсена<sup>56</sup> на роль, которую играет третичная структура белков гидролитических ферментов в механизме их действия и уровне активности<sup>59</sup>. Автор пишет, что активный центр стабилизируется сложной системой взаимодействий, в результате которых возникают вторичная и третичная структуры, причем полная информация, нужная для формирования этих структур, заложена в определенной последовательности аминокислот в вытянутой полипептидной цепи.

Рассуждения Анфинсена касались рибонуклеазы. Вопрос об универсальности этой картины пока открыт, но, по-видимому, есть основания полагать, что активные центры ферментов могут формироваться «на высшем уровне», т. е. тогда, когда ход эволюции уже привел к значительному развитию структур высшего порядка. Крайне важно, что этот факт был открыт при исследовании ферментов, расщепляющих белки. Постепенное развитие полипептидных систем привело к формированию активного центра, скомпанованного из различных фрагментов изогнутой полипептидной цепи (или цепей), и рождение этого центра положило начало процессам гидролиза, вероятно, ограничившим процесс наращивания цепей.

Моделирование дегидраз формально не представляет трудности, так как известно большое число обратимо окисляющихся красителей, способных действовать по тому же механизму, по какому функционируют и ферментные системы. Краситель отнимает водород от некоторого субстрата, превращается в гидрированную форму, а затем отдает водород кислороду или иному акцептору. Таким образом, например метиленовая синяя, может действовать как катализатор окисления ряда веществ, в частности аскорбиновой кислоты (эта реакция ускоряется светом<sup>60, 61</sup>).

Интересно выяснить в какой мере действие той или иной модели указанного типа специфично по отношению к субстрату. В природе активные группы дегидраз ДПЗ и ТПН способны, взаимодействуя с субстратом и соответствующим белком, образовывать специфически действующие дегидразные системы. Поэтому до рассмотрения моделей дегидраз целесообразно обратиться к более общему вопросу о возможности моделирования ферментов системами, включающими высокомолекулярный носитель (табл. 5).

Простым примером может служить резкое увеличение каталазной активности иона железа при адсорбции его на угле. Порфириновый комплекс — гемин и фталоцианины железа также активируются этим носителем. Собственная активность угля мала, и отклонение от аддитивности выражено очень отчетливо. Специфичность эффекта подчеркивается тем обстоятельством, что большинство других ионов не активируются углем; ряд же носителей (двуокись олова, сульфат бария, алюминий) подавляют каталазную активность ионов. «Угольные модели» получали не только путем адсорции ионов из раствора, другой метод заключался в обугливании материалов, содержащих соединения металлов. В таких катализаторах было довольно трудно определить структуру активного центра и хотя бы приблизительно оценить «балласт», играющий роль активатора. Так, Варбург<sup>12</sup> обнаружил, что угли, полученные обугливанием гематина, обладают значительной каталитической активностью в реакциях окисления. В 1932 г. мы<sup>66</sup> наблюдали сильное каталитическое действие кровяного угля на реакции галоидирования органических соединений (из бензола были получены дигалоидозамещенные, из этанола — бромистый этил).

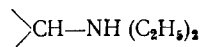


Модели, содержащие высокомолекулярный компонент

Активная группа	Высокомолекулярный компонент	Реакция	Ссылки на литературу
Гемин	Уголь	Разл. $\text{H}_2\text{O}_2$ ок. с щав. к-ты	12, 21
Фталоцианины тяжелых металлов	Уголь	Разл. реакции окисления	36
$\text{>CH-N (C}_2\text{H}_5)_2$	Целлюлоза	Разл. бромкамф. к-ты, образ. нитрила минд. к-ты	18
Метиленовая синь, тионин	Крахмал	Окисление метола и пирогаллола	60
Медь—гистидин	Инсулин	Окисление аскорбиновой кислоты	43
Медь—аминоспирты	Альбумин, леугмин, казенн	Окисление пирогаллола	62
Подихелатные комплексы металлов		Разложение	63, 64
Индиго-кармин	Целлюлоза	Окисление сероводорода	65

Для выяснения вопроса о форме связи железа в углях типа кровяного мы исследовали уголь, полученный обугливанием гематина. Магнитное и рентгеноструктурное исследования свидетельствуют о том, что в этом материале железо находится в виде азотсодержащего комплекса, в котором оно, вероятно, двухвалентно и связано всего лишь с тремя или четырьмя атомами азота и углерода, т. е. активирующий балласт здесь очень небольшой. Аналогичные эффекты мы наблюдали и при адсорбции ионов железа на угле, полученном сжиганием сульфаниловой кислоты. Этот уголь обладает очень большой поверхностью ( $700 \text{ м}^2/\text{г}$ ) и является рентгеноаморфным.

Природа связи активной группы и носителя представляется более ясной в так называемых фазер-катализаторах Бредига и Герстнера<sup>13</sup>. Эти авторы получили диэтиламиноцеллюлозу по методу Каррера и Верли и обнаружили, что она является катализатором, ускоряющим отщепление углекислоты от бромкамфорной кислоты. Катализатор обладал оптической избирательностью — его действие в процессе синтеза нитрила миндальной кислоты увеличивало левое вращение. Активная группа этого катализатора, по-видимому, имеет строение диаминопроизводного:



Обширные исследования Краузе и его сотрудников были посвящены изучению каталитической активности смешанных гидроокисей<sup>67</sup>. Активирующее действие гидроокиси меди на каталитическую функцию смеси гидроокисей марганца и кобальта привело этого автора к выводу, что гидроокись меди является аналогом активной группы фермента. Каталитические системы подобного типа очень интересны сами по себе, тем более, что гидроокиси способны также катализировать гидролиз сложных эфиров, т. е. моделировать эстеразы<sup>68</sup>, однако они, по-видимому, играли важную роль только на первых этапах биохимической эволюции и позже были заменены иными системами.

Ион меди, фиксированный на инсулине, а также медно-гистидиновый комплекс, связанный с этим белком, представляют, по нашим данным,

модели аскорбиноксидазы. В работе Николаева и Корпусовой<sup>62</sup> было обнаружено значительное активирующее действие белков — альбумина, казеина и легумина на полифенолоксидазную активность комплексов меди с аминспиртами и другими аддендами. Во всех этих случаях фиксация на носителях очень слабо сказывается на спектрах поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях. Активация аминспиртов на белках обусловлена, вероятно, комплексообразованием с аминокруппами белка, так как обработка белка формальдегидом уничтожает активирующее действие.

Значительную активацию можно наблюдать и в тех случаях, когда связь между активной группой и носителем выражена, в отличие от вышеприведенных примеров, очень слабо.

Красители, способные к обратимому превращению в лейкоформы, имеют несомненные черты сходства с активными группами дегидраз и с теми веществами, которые в биологических системах играют роль промежуточных звеньев в процессе переноса водорода.

Каталитическое действие метиленовой сини и тионина на реакцию окисления пирогаллола и метола кислородом и их адсорбционная активация на крахмале были исследованы Юшиной<sup>60</sup>. Связь красителя и крахмала, вероятно, осуществляется за счет отрицательных зарядов коллоидных частиц крахмала и катионов красителя.

Носитель проявляет активирующее действие только в том случае, когда он находится в коллоидном состоянии. Потеря активности при адсорбции на порошке крахмала является, таким образом, аналогом дезактивации фермента при денатурации.

Нами было показано также<sup>65</sup>, что целлюлоза является хорошим активатором дегидразной функции индиго-кармина. Этот краситель способен к обратимому переходу в лейкоформу, быстро окисляющуюся кислородом воздуха. В присутствии целлюлозы можно наблюдать значительное ускорение реакции, если в качестве донора водорода использовать сероводород. Данная реакция протекает особенно легко, когда раствор сероводорода содержит ничтожные количества ионов металлов — меди или железа. Таким образом, индиго-кармин, адсорбированный на целлюлозе, моделирует каталитическую систему дегидразы. Как известно, для многих ферментов этого класса доказано активирующее действие небольших количеств металла.

Интересные перспективы открываются в области исследования каталитических свойств хелатных полимеров, содержащих ионы металлов, разделенные органическими группами. Катализаторы этого типа изучали Боресков, Кейер, Рубцова и Рухадзе<sup>63, 64</sup>. Авторы обнаружили, что каталитическая активность полихелатов существенно зависит как от природы иона металла, так и от природы «органических» узлов». Очевидно, варьирование структуры узлов открывает новые возможности в регулировании стерических и энергетических факторов каталитического процесса.

Реакция между индиго-кармином и перекисью водорода, изучающаяся Киценко, показывает, насколько иногда велика роль чисто ориентационных эффектов. Деструктивное окисление красителя, сопровождаемое его обесцвечиванием, ускоряется фазовыми границами различной природы<sup>69</sup>. Так, скорость реакции возрастает на границе водный раствор — бензол или толуол, на границе раствор — воздух и т. п. В этих случаях едва ли можно предполагать особое действие хемосорбции или образование промежуточных продуктов, но кинетический эффект не вызывает сомнений. Отсюда следует, что вообще появление новой фазы часто соответствует в сложных органических системах большому числу возможных каталитических действий даже и тогда, когда мы не можем индивидуализировать промежуточные активные продукты.

### III. СОПОСТАВЛЕНИЕ СВОЙСТВ МОДЕЛИ И БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Вполне понятно, что чем более жесткие требования предъявляются к моделям, тем меньшим будет их число. Это число сократилось после того, как требование высокой активности было дополнено условием близости химического типа структуры модели и фермента и механизма их действия. Однако и указанные ограничения все же оставляют в сфере рассмотрения слишком большое количество моделей и не устраняют трудностей в формулировке принципов отбора. Поэтому следует обратить внимание на те стороны биокатализа, которые, во-первых, не имеют аналогий в обычном катализе, а во-вторых, не моделировались в сколько-нибудь четкой форме. По-видимому, можно указать на следующие особенности каталитического действия биокаталитических систем, отличающих ферментный катализ от обычного.

1. Активные центры в ряде реакций получаются в результате развития структур высшего порядка — третичной, вероятно, и четвертичной структуры белков (гидролазы). Активный центр включает при этом не только группу атомов, непосредственно действующую в каталитическом акте, но и часть молекулы белка, выходящую далеко за ее пределы. Роль этой зоны сводится к обеспечению надлежащего расположения молекул субстрата и имеет отношение к специфичности действия.

2. Субстрат часто сам подвергается предварительному активированию. Так, сахара фосфорилируются прежде чем войти в цикл превращений, ведущий к пировиноградной кислоте; аминокислоты также фосфорилируются в процессах синтеза полипептидной цепи, жирные кислоты соединяются с КоА и т. д.

3. Активный центр часто представляет собой группу атомов, слабо связанную с белком и перемещающуюся от одного белка к другому.

При этом белок — субстрат и активная группа все же действуют совместно, причем связь между ними иногда возникает за счет включения металла — «сцепки». Специфическая адсорбция субстрата на белке есть одна сторона действия каталитической системы, а воздействие собственно кофакторов — другая, дополнительная. Следовательно, энтропийные и энергетические факторы, отчасти «разобщены». Моделью могла бы служить система, в которой субстрат подготовлен к реакции адсорбцией на носителе, создающем надлежащую ориентацию частей молекулы (или нескольких молекул), а активный центр или активная частица осуществляет собственно каталитическую реакцию в этой системе.

4. Катализаторы объединяются в системы по принципам энергетического или субстратного сопряжения, и энергия одной реакции используется для преодоления активационных барьеров другой, а субстрат одного процесса есть конечный продукт другого. Для этого необходима особая организация высокой степени сложности (митохондрии).

5. Синтез самих катализаторов неотделим от их функций и находится с ними в отношениях обратной связи. Доказано, что повышение концентрации продуктов действия определенных ферментов ведет к подавлению синтеза самих ферментов. Структуры, характерные для биокатализа, конечно, удовлетворяют этим требованиям. Полимерные цепи пептидов, включающие также аминокислоты, которые и сами по себе активны (гистидин, например, в реакциях гидролиза) обладают очень широкими возможностями для формирования активных центров и создания структур высших порядков, обеспечивающих точную «настройку» на субстрат. Активация субстрата достигается за счет присоединения к нему остатков фосфорной кислоты, причем фосфорная кислота (система богатая энергией — макроэргических — пирофосфатных связей) входит в состав и активных групп самих катализаторов (АТФ, ДПН и т. д.). Фиксация на группах высокомолекулярного носителя, дополненная дей-

ствием собственно катализатора в крайнем своем выражении, когда практически вся молекула субстрата связана с носителем и подвергается изменению во многих точках, приводит к тому, что структура носителя определяет строение получающегося продукта. Это принцип «матрицы» — очень характерный для биокатализа — требует точного структурного соответствия всех участников реакции и ведет к тому явлению, которое называют саморепродукцией\*. Исследуя свойства той или иной модели, конечно, нетрудно обнаружить ее недочеты в том или ином отношении и постепенно подойти к выводу о некоторой «уникальности» того набора биокатализаторов, который действует в клетках. Нельзя сказать, что катализаторы этого набора обладают каким-либо особым типом связи или механизмом действия. Виды связей в биологических системах не открывают нам ничего принципиально нового. Это ковалентные, донорно-акцепторные, водородные связи, взаимодействия, в основе которых лежат пространственные эффекты (например, типа клатратных), поляризационные эффекты и т. п.

Механизм действия, как правило, связан с образованием промежуточных лабильных форм, стерические характеристики которых близки к характеристикам переходного комплекса. В модельных соединениях обычно промежуточные продукты менее устойчивы и труднее идентифицируются, чем в случае ферментов, но нет повода предполагать, что элементарные акты в биокатализе отличаются принципиально от соответствующих стадий при катализе менее сложными катализаторами.

Своеобразие проявляется на более высоком уровне, и именно возможность перехода на более высокий уровень организации и играет роль фактора отбора при испытании множества сходных катализаторов.

Простые системы, содержащие катализаторы, возникали во множестве на ранних ступенях химической эволюции. Большинство из них быстро закончило свое существование, не обладая средствами для увеличения стабильности. Для них эволюция к наиболее устойчивому состоянию совпадала с нормальной термодинамической эволюцией открытых или закрытых систем. Те из них, которые приобрели возможность поддерживать уровень организации за счет обратных связей со средой, получили новые средства стабилизации и, что особенно важно, новые условия стабильности. Эти условия уже не связаны с экстремальными значениями энтропии и даже ее производной по времени, а скорее определяются совершенством работы регулирующих аппаратов, связывающих внешние воздействия и отклонения параметров системы. Проследим ход постепенного усложнения систем от самых элементарных (например разряженный газ) до высоко организованных (человек). Мы обнаружим, что условия, отвечающие стабильности системы, существенно различаются на концах этой последовательности. Если для газа термодинамика дает точные указания, какие именно функции в определенных условиях будут определять равновесие, то для человека, или даже для гораздо менее сложного живого организма, следование рецептам термодинамики приведет к гибели системы, а не к стабилизации. Стабилизация достигается совершенно иными средствами, появление которых термодинамика предвидеть не может.

В то же время организм состоит из механизмов, в основе которых имеются молекулы, находящиеся во взаимодействии друг с другом. Следовательно, постепенное усложнение систем приводит в определенных случаях к тому, что вновь возникающие системы стабилизируются в силу иных законов, чем те, которые регулировали переход в наиболее устойчивое состояние исходных систем — систем предшественников.

Действительно, переход к равновесному состоянию, отвечающему максимуму энтропии в изолированной системе или достижению стадио-

\* Интересные сведения об отпечатках, которые субстрат производит на поверхности катализатора, можно найти в статье Баландина<sup>70</sup>.

нарного состояния в «потоке» отличаются от стабилизации за счет развития систем обратных связей, хотя эти механизмы развились на том «материале», который стабилизируется вышеуказанным простым способом.

Отсюда следует, что только те элементарные системы могли стать отправной точкой эволюции, которые удовлетворяли основному требованию: условия стабильности для сочетаний систем отличаются от условий стабильности исходных систем. Именно этот принцип и приводит к той независимости от материала, о которой шла речь в начале этой статьи. С этих же позиций можно попытаться истолковать некоторые особенности эволюции в биологии. Действительно, в процессе последовательного усложнения органических веществ новые факторы стабильности возникли тогда, когда образовались катализаторы. В биологии немного найдется случаев химического регулирования и химических обратных связей без участия катализаторов. Наоборот, каждый простой случай действия катализатора, обратимо отравляющегося продуктами реакции, уже представляет собой пример химического регулирования. Вполне закономерно все последующее развитие базировалось на синтезе разнообразных катализаторов и совершенствовании механизмов их согласованного действия.

Таким образом, в процесс, ставший основой формирования живых структур, были вовлечены те вещества, которые легче всех других превратились в элементы каталитических систем и вышли, таким образом, из сферы действия законов стабилизации, характерных для простейших совокупностей разнородных молекул. Для механизмов стабилизации по типу обратных связей характерно то, что они препятствуют переходу системы в термодинамически равновесное состояние. Это сразу дает системе с обратными связями преимущество перед всеми остальными системами. Взаимоотношения системы этого «высшего» ранга со средой определяются тем, что и среда, и система будут стремиться, каждая к своему стабильному состоянию. Для среды это будет, например, максимум энтропии, а для системы — устойчивая работа аппарата регулирования, отвечающая минимальным изменениям параметров системы при данных внешних случайных воздействиях. Так установится своеобразное равновесие систем разных рангов, в котором рост энтропии среды окажется, по крайней мере феноменологически, связанным с уменьшением этой функции в системе.

Дальнейшее усложнение регулирующих аппаратов и общий рост степени организации системы возможен только в том случае, если возникающие связи будут повышать стабильность всех менее сложных аппаратов подобно тому, как разумная интеллектуальная деятельность человека направлена на стабилизацию всех механизмов, от которых так или иначе зависит его существование.

Эволюционный отбор из всего необозримого количества «моделей» биокатализаторов фиксировал в итоге огромного числа проб только те, которые оказались пригодными для синтеза систем катализаторов с обратными связями и способными поддерживать ход эволюции, к системам более высоких рангов с еще более разнообразными возможностями стабилизации. Моделирование химических самостабилизирующихся систем представляет одну из наиболее интересных задач будущего науки о катализе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. A. Payen, I. Persoz, *Annal. Chim. Physique*, **53**, 73.
2. Р. Л. Синг, Происхождение жизни на Земле, сб. докладов, Изд. АН СССР, 1957, стр. 78.
3. М. Камен, Труды V Междунар. биохим. конгресса, Симп. 3, 1961.
4. Ю. И. Кроль, *Биофизика*, **7**, 529 (1962).
5. C. Paal, *Ber.*, **35**, 2206, 2219 (1902).
6. Skita, *Meger, Ber.*, **45**, 3585, 5579 (1912).
7. E. Müller, F. Müller, *Ztschr. Phys. Chem.*, **107**, 347 (1923).

8. G. Bredig, K. Fajans, Ber., **41**, 752 (1908).
9. F. Hofmann, K. Gottlob, Герм. пат. 265, 261.
10. R. Kuhn, L. Brann, Ber., **59**, 2376 (1926).
11. R. Kuhn, B. Wassermann, Ber., **61**, 1550 (1928).
12. O. Warburg, Bioch. Ztschr., **119**, 134 (1920).
13. O. Warburg, U. Brefeld, Там же, **145**, 461 (1924).
14. Л. А. Николаев, Сообщение о работах об-ва им. Менделеева, 1950, № 4, 17.
15. O. Baudisch, Naturwiss., **13**, 752 (1925).
16. H. Euler, B. Jansson, Monatsh. **1929**, 1014.
17. W. Manchit, W. Pelann, Ztschr. anorg. u. allg. Chem., **211**, 1 (1933).
18. G. Bredig, F. Gerstner, Bioch. Ztschr., **260**, 414 (1932).
19. G. Shibata, R. Tsuchida, Bull. Chem. Soc. Japan, **4**, 192 (1929).
20. G. Shibata, G. Tanaka, S. Goda, Bull. Chem. soc. Japan, **6**, 1, 210 (1931); C., **32**, 1, 532.
21. В. Лангенбек, Органические катализаторы, ИЛ, М., 1961.
22. E. J. Hewitt, Nature, **180**, 1020 (1957).
23. М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, ИЛ, М., 1961.
24. P. Boyer, H. Lard, K. Myrbäck, The Enzymes. Ac. Press., 1959.
25. Mähler, J. Biol. Chem. **206**, 13 (1954).
26. G. Schwab, Handb. d. Katalyse, **3**, 549, (1941).
27. Westheimer, Труды V Межд. биохим. конгр., М., 1961.
28. Л. А. Николаев, ЖФХ, **25**, 712 (1951).
29. Л. А. Николаев, Вестник МГУ, **1946**, № 2, 142; **1947**, № 6.
30. Л. А. Николаев, Химич. наука и промышл., **1957**, № 2, 126.
31. Л. А. Николаев, ЖФХ, **25**, 1437, 1955 (1951).
32. W. Langenbeck, H. Mix, W. Titelbach-Heilrich, Ber., **90**, 2699 (1957).
33. H. Mix, Naturwist. **20**, 469 (1956).
34. Л. А. Николаев, Вестник МГУ, **1948**, № 10.
35. B. Kirson, Bull. Soc. Chim. France, **1954**, 157.
36. A. H. Cook, J. Chem. Soc., **1933**, 1761, 1768, 1774.
37. W. Langenbeck, F. Koeschler, Ber., **89**, 2455, 1956.
38. А. С. Кудрявцев, И. А. Савич, Н. Кундо, Л. А. Николаев, ЖФХ, **36**, 1382 (1962).
39. J. Wang, J. Am. Chem. Soc., **74**, 4715 (1955).
40. А. С. Кудрявцев, И. А. Савич, Л. А. Николаев, ЖФХ, **36**, 1852 (1962).
41. А. Гудо, ЖФХ, **31**, 1203 (1957).
42. A. Chalk, J. Smith, Nature, **174**, 802 (1954).
43. Л. А. Николаев, Вестник МГУ, **1947**, № 7, 147.
44. Л. А. Николаев, Вестник МГУ, **1947**, № 1, 71.
45. A. Masur, S. Green, E. Shorr, J. biol. Chem., **220**, 237 (1956).
46. R. Myer, A. Zettelemogers, Ind. Eng. Chem., **46**, 2220 (1954).
47. Р. Д. Корпусова, Л. А. Николаев, Научные доклады высшей школы, **2**, 233, 1958; ЖФХ, **30**, 2831, 1956.
48. Brackman, W. Havinga, Rec. trav. Chim., Pays-Bas, **74**, 937 (1958).
49. G. Thuillier, Bull. Soc. Chim. France, **10**, 1431 (1959).
50. C. Raquot, С. г., **209**, 171 (1939).
51. А. Мартелл, Р. Густавсон, С. Чебирик, Труды I Межд. конгр. по катализу, ИЛ, М., 1960, стр. 365.
52. Г. Гутфрейнд, Там же, стр. 326.
53. T. Bruice, G. Schmir, J. Am. Chem. Soc., **79**, 1663 (1957).
54. В. В. Мосолов, Успехи соврем. биол., **50**, 284 (1960).
55. B. Hartley, B. Kilby, Bioch. J., **50**, 673 (1952).
56. А. Сцент-Дьерди, Биоэнергетика, Физматгиз, 1960.
57. T. Wagner-Jauregg, R. Hackley, T. Lies, O. O. Wens, R. Proger, J. Am. Chem. Soc., **77**, 922 (1957).
58. Р. А. Мартелл, Р. Густавсон, С. Чебирик, Труды I Межд. конгр. по катализу, ИЛ, М., 1960, стр. 36.
59. Х. Б. Анфинсен, Труды V Межд. биохим. конгр., Симп. 3, стр. 3, М., 1961.
60. L. C. Charon, S. Charon, E. Uriot, Bull. Soc. Chim. France, 1957, № 6, 794.
61. В. В. Юшина, ЖФХ, **31**, 2358 (1957).
62. Р. Д. Корпусова, Канд. дисс., МГУ, 1963.
63. Г. К. Боресков, Н. П. Кейер, Л. Ф. Рубцова, Е. Г. Рухадзе, ДАН, **114**, 1069 (1962).
64. Н. П. Кейер, Г. К. Боресков, Л. Ф. Рубцова, Е. Г. Рухадзе, Кинетика и катализ, **3**, 680 (1962).
65. Л. А. Николаев, ЖФХ, **31**, 923, 1957.
66. Л. А. Николаев, ЖОХ, **1932**, 1035.
67. A. Krause, S. Reysner, Roczn. chem., **33**, 811, 1959.
68. E. Vamatn, Angew. Chem., **1930**, 9, 186.
69. L. Nicolaev, Actes de 2-me Congr. intern. de catalyse. Paris, 1960, стр. 361.
70. А. А. Баландин, Усп. химии, **31**, 1265 (1962).

Московский ин-т инженеров  
транспорта