

## ТЕМА 1 ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

### 1 Биохимический состав растительной клетки.

Большую часть массы живых клеток составляет вода (около 80 %). Остальная масса называется «сухим веществом». «Сухое вещество» состоит из неорганических, или зольных, или минеральных (около 5 %) и органических веществ. Органические вещества, в свою очередь, делятся на вещества основного обмена (белки, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты, витамины, гормоны) и вещества вторичного метаболизма (гликозиды, терпеноиды, алкалоиды и пр.), каковые не все и не всегда присутствуют в клетке. Химический состав активно функционирующих растительных клеток весьма сходен.

**Белки** (протеины, полипептиды) – высокомолекулярные органические вещества, состоящие из альфа-аминокислот, соединенных в цепочку пептидной связью. Аминокислотный состав белков определяется генетическим кодом, при синтезе используется 20 «протеиногенных» аминокислот. Множество их комбинаций создают молекулы белков с большим разнообразием свойств..

Белки обладают свойством амфотерности, то есть в зависимости от условий проявляют как кислотные, так и основные свойства. В белках присутствуют несколько типов химических группировок, способных к ионизации в водном растворе: карбоксильные остатки боковых цепей кислых аминокислот и азотсодержащие группы боковых цепей основных аминокислот. Каждый белок характеризуется изоэлектрической точкой – кислотностью среды), при которой суммарный электрический заряд молекул данного белка равен нулю и, соответственно, они не перемещаются в электрическом поле (например, при электрофорезе). В изоэлектрической точке гидратация и растворимость белка минимальны.

Белки различаются по степени растворимости в воде. Растворимость белка определяется не только его структурой, но внешними факторами, такими как природа растворителя, ионная сила и рН раствора.

Белки также делятся на гидрофильные и гидрофобные. К гидрофильным относится большинство белков цитоплазмы, ядра и межклеточного вещества. К гидрофобным относится большинство белков, входящих в состав биологических мембран, взаимодействующих с гидрофобными липидами мембраны.

Как правило, белки достаточно стабильны в тех условиях (температура, рН и др.), в которых они в норме функционируют. Резкое изменение этих условий приводит к денатурации белка. Денатурация белка может быть полной или частичной, обратимой или необратимой.

Молекулы белков представляют собой линейные полимеры, состоящие из остатков  $\alpha$ -L-аминокислот (которые являются мономерами). Белки длиной от 2 до нескольких десятков аминокислотных остатков часто называют пептидами, при большей степени полимеризации – белками, хотя это деление весьма условно.

Выделяют 4 уровня структурной организации белков: первичную, вторичную, третичную и четвертичную. Первичная структура (последовательность аминокислотных остатков) полипептида определяется структурой его гена и генетическим кодом. Первичную структуру белка можно определить методами секвенирования белков или по первичной структуре его мРНК, используя таблицу гене-

тического кода. Вторичная структура – локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями. Самые распространенные типы вторичной структуры белков:  $\alpha$ -спирали – плотные витки вокруг длинной оси молекулы;  $\beta$ -листы (складчатые слои) – несколько зигзагообразных полипептидных цепей, неупорядоченные фрагменты. Третичная структура – пространственное строение полипептидной цепи. Структурно состоит из элементов вторичной структуры, стабилизированных различными типами взаимодействий, в которых важнейшую роль играют гидрофобные взаимодействия. Четвертичная структура (или субъединичная, доменная) – взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса. Белковые молекулы, входящие в состав белка с четвертичной структурой, образуются на рибосомах по отдельности и лишь после окончания синтеза образуют общую надмолекулярную структуру. В состав белка с четвертичной структурой могут входить как идентичные, так и различающиеся полипептидные цепочки. Надмолекулярные белковые комплексы могут состоять из десятков молекул.

Помимо пептидных цепей, в состав многих белков входят и неаминокислотные группы, и по этому критерию белки делят на две большие группы – простые и сложные белки (протеиды). Простые белки состоят только из полипептидных цепей, сложные белки содержат также неаминокислотные, или простетические, группы. В зависимости от химической природы простетических групп среди сложных белков выделяют следующие классы:

- Гликопротеины, содержащие в качестве простетической группы ковалентно связанные углеводные остатки;
- Липопротеины, содержащие в качестве простетической части нековалентно связанные липиды.
- Металлопротеиды, содержащие негемовые координационно связанные ионы металлов.
- Нуклеопротеиды, содержащие нековалентно связанные ДНК или РНК. К нуклеопротеидам относится хроматин, из которого состоят хромосомы;
- Хромопротеиды содержат окрашенные простетические группы различной химической природы.

**Функции белков.** *Каталитическая.* Наиболее хорошо известная функция белков в организме – катализ различных химических реакций. Ферменты – это белки, обладающие специфическими каталитическими свойствами, то есть каждый фермент катализирует одну или несколько сходных реакций. *Структурная.* Структурные белки цитоскелета, как своего рода арматура, придают форму клеткам и многим органоидам и участвуют в изменении формы клеток. *Защитная.* Это, например, связывание токсинов белковыми молекулами, обеспечивающее их детоксикацию. *Регуляторная.* Многие процессы внутри клеток регулируются белковыми молекулами, которые не служат ни источником энергии, ни строительным материалом для клетки. Эти белки регулируют продвижение клетки по клеточному циклу, активность других белков и многие другие процессы. *Сигнальная* – способность белков служить сигнальными веществами, передавая сигналы между клетками, тканями, органами и организмами. Часто сигнальную функцию объединяют с регуляторной, так как многие внутриклеточные регуля-

торные белки тоже осуществляют передачу сигналов. *Транспортная*. Некоторые мембранные белки участвуют в транспорте малых молекул через мембрану клетки, изменяя ее проницаемость. *Запасная (резервная)*. Некоторые белки запасаются в качестве источника энергии и вещества. Ряд других белков используется в качестве источника аминокислот, которые в свою очередь являются предшественниками биологически активных веществ, регулирующих процессы метаболизма. *Рецепторная*. Белковые рецепторы могут находиться как в цитоплазме, так и встраиваться в клеточную мембрану. Одна часть молекулы рецептора воспринимает сигнал, которым чаще всего служит химическое вещество, а в некоторых случаях – свет, механическое воздействие и другие стимулы. При воздействии сигнала на определенный участок молекулы – белок-рецептор – происходят ее конформационные изменения. В результате меняется конформация другой части молекулы, осуществляющей передачу сигнала на другие клеточные компоненты. *Моторная (двигательная)*. Целый класс моторных белков обеспечивает движения, например, ресничек и жгутиков, а также активный и направленный внутриклеточный транспорт

Мономерами **нуклеиновых кислот** являются нуклеотиды, которые, в свою очередь, состоят из трех соединений: азотистого основания - пиридинового или пуринового; сахара - рибозы ( $C_5H_{10}O_5$ ) или дезоксирибозы ( $C_5H_{10}O_4$ ); остатка ортофосфорной кислоты.

Нуклеотид - фосфорный эфир нуклеозида. В состав нуклеозида входят два компонента: моносахарид (рибоза или дезоксирибоза) и азотистое основание. Нуклеотиды при соединении друг с другом, образуют длинные полимерные цепи. Связь между нуклеотидами осуществляется через остаток фосфорной кислоты одного и сахарный компонент другого.

Полинуклеотидная цепь состоит из многих сотен и даже тысяч отдельных нуклеотидов. Рибонуклеиновая (РНК) и дезоксирибонуклеиновая (ДНК) кислота различаются своим сахарным компонентом: в молекуле РНК это рибоза, в ДНК - ее производное - дезоксирибоза, которая отличается от рибозы только тем, что у второго углеродного атома в ее молекуле стоит не гидроксильная группа, а атом водорода.

В состав молекул ДНК и РНК входят по четыре азотистых основания. Три из них одинаковы: аденин (А), гуанин (Г) и цитозин (Ц). Четвертое основание в составе молекулы РНК - урацил (У), а ДНК - тимин (Т). У и Т являются пиримидиновыми основаниями, А и Г – пуриновыми.

РНК и ДНК отличаются по структуре молекул: первая состоит из одной полинуклеотидной цепи, вторая - из двух.

Цепочки нуклеотидов в молекуле ДНК расположены так, что их основания направлены внутрь, а углеводные и фосфорные группы - наружу. Азотистые основания двух полинуклеотидных цепей соединены друг с другом при помощи водородных связей. Эти связи подчинены строгой закономерности: аденин обязательно соединен с тимином, а гуанин - только с цитозином. Такое расположение нуклеотидов называется комплементарным. Между А и Т образуются две водородные связи, между Г и Ц - три.

Две полинуклеотидные цепи молекулы ДНК спирально закручены одна вокруг другой. Внешний вид молекулы ДНК грубо можно представить в виде спиральной лестницы, стойки которой состоят из сахарофосфатных нитей, а перекладины - из комплементарных пар азотистых оснований, определяя основу генетического кода.

Согласно принципу комплементарности определенная последовательность нуклеотидов в одной полинуклеотидной цепи молекулы ДНК автоматически ведет за собой строго определенную последовательность нуклеотидов другой цепи. В последнее десятилетие стало очевидным, что некоторые параметры классической В-формы нужно пересмотреть и даже что ДНК может образовывать другие типы двуспиральных структур. Под полиморфизмом ДНК подразумевается способность двойной спирали принимать различные конформации (А-, В- и Z-формы).

У нуклеиновых кислот, как и у белков, различают первичную, вторичную и третичную *структуру*. Предполагается наличие и четвертичной структуры. Первичной структурой нуклеиновых кислот называют последовательное чередование нуклеотидных остатков. ДНК обычно существует в виде разнообразных волокнисто-кристаллических вторичных структур. Третичная структура ДНК характеризуется сложной суперспирализацией, образованием различных кольчатых форм, компактных клубков.

Характерной особенностью вторичной структуры РНК является спирализация полинуклеотидной цепи в строго фиксированных зонах, а третичной - образование из спиральных цепочек различных по форме клубков и петель.

По функциональному значению, локализации и молекулярным массам выделяют информационные, транспортные и рибосомальные РНК.

*Информационные РНК* выполняют матричную функцию в процессе синтеза белка, образования полипептидных цепей.

*Транспортные РНК* располагаются в цитоплазме, ядерном соке, в строме хлоропластов и матриксе митохондрий. Они осуществляют кодирование аминокислот и перенос их в рибосомальный аппарат клетки.

*Рибосомальные РНК*, располагаясь в рибосомах, являются их структурной основой.

В молекуле ДНК записана информация о первичной структуре всех белков данной клетки в виде *генетического кода*, т. е. каждая молекула аминокислоты закодирована определенным сочетанием 3-х нуклеотидов (триплетов) ДНК в форме кодонов.

Определенному сочетанию этих 3-х нуклеотидов в молекуле ДНК соответствует определенное сочетание аминокислот в молекуле белка. Например, кодон на молекуле ДНК молекулы аминокислоты тирозина ТГА. По принципу комплементарности кодон тирозина на молекуле иРНК представлен АЦУ (вместо тирозина (Т), здесь урацил). Как уже указывалось, наряду с иРНК в биосинтезе белка принимают участие и транспортные РНК (тРНК). Количество их равно числу протеиногенных аминокислот. На одном конце тРНК будет располагаться антикодон молекулы тирозина УГА, а другой будет служить для прикрепления аминокислоты. Если на молекуле ДНК находится триплет ТГА, то к полипептиду в полири-

бosome клетки присоединится с помощью пептидной связи -СО-NH - активированная аминокислота тирозин.

Роль **углеводов** в жизни растений трудно переоценить. Они - основной питательный и структурный материал растительных клеток и тканей, образуются в процессе фотосинтеза. Углеводы входят в состав клеточной оболочки, участвуют во многих процессах жизнедеятельности, служат запасными и энергетическими веществами растения.

Все многообразие углеводов делится на две большие группы: монозы, или моносахариды (простые углеводы), и полиозы, или полисахариды (сложные углеводы).

**Монозы** представляют собой производные многоатомных спиртов. Простые углеводы хорошо растворимы в воде и легко транспортируются по всему растению. Они принимают активное участие в таких важнейших процессах жизнедеятельности, как фотосинтез, дыхание.

В молекуле моноз одновременно содержатся гидроксильные и альдегидные или кетонные группы. При наличии в молекуле альдегидных остатков монозы носят название *альдоз*, кетонных - *кетоз*.

Различают монозы и по количеству атомов углерода в молекуле: *триозы* (глицериновый альдегид, или альдотриоза, фосфодиоксиацетон, или кетотриоза, и др.), *тетрозы* (эритроза), *пентозы* (рибоза, дезоксирибоза, ксилоза, арабиноза и др.), *гексозы* (глюкоза, фруктоза и др.), *гептозы* (манногептулоза, седогептулоза).

Пентозы *арабиноза* и *ксилоза* являются компонентами гемицеллюлоз клеточной оболочки, а рибоза и дезоксирибоза входят в состав нуклеиновых кислот, АТФ, АДФ и других важных соединений. Фосфорилированная пентоза рибулозо-1,5-дифосфат служит акцептором углекислоты в процессе фотосинтеза. В древесных растениях встречается много моноз, но наиболее распространенными из них являются глюкоза и фруктоза.

**Полиозы**, в свою очередь, делятся на *олигосахариды*, или *полиозы 1 порядка* (сахароза, мальтоза, стахиоза и др.), у которых в молекулах содержится небольшое число монозных остатков, и *полисахариды 2 порядка* (крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза, инулин, пектиновые вещества и др.), состоящие из множества остатков простых углеводов. Из дисахаридов - углеводов, состоящих из двух моноз, наиболее важными в жизни растений являются сахароза, мальтоза и целлобиоза. При гидролизе дисахаридов происходит их распад на 2 молекулы моноз: сахарозы - на глюкозу и фруктозу, мальтозы и целлобиозы - на 2 молекулы глюкозы, лактозы - на глюкозу и галактозу.

*Сахароза*  $C_{12}H_{22}O_{11}$  - дисахарид; широко распространен в мире растений. Вместе с крахмалом является основным запасным углеводом. Особенно много сахарозы в корнеплодах сахарной свеклы (до 20 %) и сахарном тростнике (до 25 %). Это и основная транспортная форма углеводов у большинства растений, в том числе древесных. Молекула сахарозы состоит из остатков  $\alpha$ -глюкопиранозы и  $\beta$ -фруктофуранозы, соединенных между собой своими гликозидными гидроксильными группами.

*Мальтоза*, или солодовый сахар, обычно образуется при гидролизе крахмала. В большом количестве содержится в солоде, откуда и ее второе название.

Один из остатков глюкозы в молекуле мальтозы является  $\alpha$ -глюкозой. Поэтому этот дисахарид представляет собой  $\alpha$ -глюкозидоглюкозу.

*Целлобиоза* входит в состав молекулы целлюлозы. В свободном виде встречается в пасоке некоторых деревьев. От мальтозы отличается лишь наличием  $\beta$ -1,4-гликозидной связи, являясь  $\beta$ -глюкозидоглюкозой.

Из тетрасахаридов следует назвать *стахиозу*. Она широко распространена у многих растений, а из древесных - у ясеня. Молекула стахиозы состоит из двух остатков  $\alpha$ -галактозы, одного остатка  $\alpha$ -глюкозы и одного остатка фруктозы.

Из полисахаридов 2-го порядка следует особо выделить целлюлозу и крахмал. *Целлюлоза*, или клетчатка,  $(C_6H_{10}O_6)_n$  - широко распространена в растениях. Молекула целлюлозы является линейным полимером глюкозы, соединенной попарно в целлобиозы.

Целлюлоза - основной компонент оболочек растительных клеток. Отличается исключительной стойкостью, нерастворимостью в воде, кислотах и щелочах. Лишь при кипячении в крепкой серной кислоте гидролизуется с образованием глюкозы. Целлюлоза имеет огромное промышленное значение (бумажная, гидролизная и текстильная промышленность, изготовление взрывчатых веществ и др.).

*Крахмал* в растениях находится в виде зерен, различающихся даже у одного и того же растения своими формами, размерами, свойствами и химическим составом. Это позволяет обнаруживать примеси одного продукта в другом, например, в пшеничной муке - примесь муки из кукурузы или овса. Молекула крахмала состоит из смеси двух полисахаридов - амилозы и амилопектина. Амилоза состоит из многих глюкозных остатков, связанных гликозидными связями между 1-м и 4-м атомами углерода.

Молекула амилопектина также состоит из многочисленных остатков глюкозы, но кроме связей между 1-м и 4-м углеродными атомами имеет и связи между 1-м и 6-м с образованием разветвленной структуры.

Исключением из общего правила является крахмал яблок, состоящий только из молекул амилозы. Амилоза и амилопектин различаются своей растворимостью в воде: амилоза легко растворяется в теплой воде, амилопектин - весьма трудно. Водные растворы амилозы нестойки, амилопектина, наоборот, очень устойчивы.

Крахмал - одно из основных запасных веществ растительных клеток. Он нерастворим в воде, с йодом дает характерное синее окрашивание, что позволяет легко его обнаруживать в различных частях растения.

Из других полисахаридов 2-го порядка необходимо упомянуть инулин, В молекуле которого мономером выступает фруктоза. Это также запасное вещество, встречающееся в клубнях и корнях некоторых растений (топинамбур, цикорий, одуванчик, георгин), заменяя в них крахмал. Инулин растворим в воде, осаждается из водных растворов при добавлении спирта. В растениях, содержащих инулин, а также в плесневых грибах и дрожжах имеется фермент инулаза, гидролизующая инулин до фруктозы. Промышленный способ получения фруктозы из растений, содержащих инулин, заключается в его гидролизе различными кислотами. Фруктоза отличается наиболее высокой сладостью из всех известных сахаров.

Важную роль в проявлении свойств живой клетки играют *липиды*:

- они являются структурными компонентами биологических мембран и определяют проницаемость как клетки в целом, так и клеточных компонентов, активность ряда ферментов;
- участвуют в процессах адсорбции различных веществ;
- откладываются в запас;
- выполняют защитные функции, предохраняя растения от обезвоживания, проникновения инфекции, повышая устойчивость растений к низкой отрицательной температуре;
- обладают способностью ориентирования молекул различных веществ относительно структурных компонентов клетки и т. д.

Содержание их составляет 2 - 3 % на сухую массу, а в маслянистых семенах - до 60 %.

Липиды обладают характерными гидрофобными свойствами, нерастворимы в воде. Растворяются они лишь в различных органических растворителях: бензине, бензоле, хлороформе, эфирах. В группу липидов входят жиры и жироподобные вещества, или липоиды. Отсюда различная химическая природа липидов.

**Жиры** являются важнейшими запасными веществами клетки, фосфолипиды, гликолипиды и стероиды - компонентами биологических мембран. Воски выполняют защитную роль, покрывая поверхность листьев и плодов.

В химическом отношении жиры - сложные эфиры, состоящие из трехатомного спирта глицерина и высокомолекулярных насыщенных (не содержащих двойных связей) и ненасыщенных (с двойными связями) жирных кислот. Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и их абсолютное количество влияют на свойства жиров. К насыщенным жирным кислотам относят пальмитиновую, стеариновую и др., к ненасыщенным - олеиновую, линолевую, линоленовую и др.

К **липоидам** относятся воски, фосфолипиды, гликолипиды, сульфоллипиды, стероиды.

**Фосфолипиды** отличаются от жиров наличием в молекуле остатка фосфорной кислоты.

Если молекулы фосфолипидов содержат остатки холина, то они носят название *лецитинов*; *фосфатилсерин*ом называют фосфолипид, содержащий остаток серина, *фосфатидилэтанол*имин (кефалином) - фосфолипид, содержащий остаток этаноламина.

Фосфолипиды обладают *полярностью*: так называемая головка молекулы фосфолипида, состоящая из холина или других указанных выше веществ и фосфорной кислоты, имеет гидрофильные, а остатки жирных кислот другого конца молекулы - гидрофобные свойства. Ориентированные строго определенным образом на границе раздела двух фаз, фосфолипиды играют важную роль как в структуре цитоплазмы и биологических мембран, так и в определении их свойств, в частности проницаемости, а также активности мембранных ферментов.

**Воски** представляют собой сложные эфиры, образованные жирными кислотами и высокомолекулярными одноатомными спиртами. В их состав входят как уже названные жирные кислоты, так и характерные только для восков: карнаубовая, церотиновая, монтановая и др.

**Гликолипиды** - сложные соединения, которые образуются путем взаимодействия жирных кислот не только с глицерином, но и с углеводами. В качестве углеводных компонентов выступают галактоза, а также глюкоза и шестиатомный спирт инозит. При взаимодействии с сульфатом гликолипиды образуют *сульфолипиды* - вещества, принимающие участие в структуре хлоропластов. Гликолипиды, входя в состав биологических мембран, играют важную роль в регулировании метаболизма клетки. Выполняют они и запасную функцию в растениях.

**Органические вещества вторичного происхождения.** Растения синтезируют огромное количество разнообразных веществ, которые не участвуют в основном обмене клеток. Традиционно такие соединения называют вторичными, а их обмен – вторичным метаболизмом. По способности образовывать вторичные метаболиты растения являются «рекордсменами», оставляя далеко позади представителей других царств живых существ. Наряду с фотосинтезом, вторичный метаболизм – характеристическое свойство растительного организма, его «визитная карточка». Парадоксально, но биологи достаточно долго оставляли этот важнейший аспект жизнедеятельности растений без должного внимания. Гораздо больше знали о вторичных метаболитах провизоры, фармацевты и криминалисты, поскольку лекарственные и ядовитые свойства растений чаще всего обусловлены именно этими соединениями.

К настоящему времени на предмет присутствия вторичных метаболитов исследовано около 20–30 тыс. видов растений, т.е. 10–15 % от всей флоры Земли. Несмотря на это уже идентифицировано около 100 000 индивидуальных соединений вторичного метаболизма, и ежедневно в мире идентифицируют около десятка новых. Очевидно, что при таком широком представительстве в мире растений считать вторичные метаболиты синтезированными «случайно» не корректно. Также маловероятно, что такое количество разнообразных соединений не имеет функциональной роли в жизни растения.

Наиболее аргументирована к настоящему времени гипотеза, согласно которой соединения вторичного метаболизма в отличие от первичных метаболитов имеют функциональное значение не на уровне клетки, а на уровне целого организма. Скорее всего, эти вещества выполняют «экологические» функции, т.е. имеют значение для защиты растения от различных вредителей и патогенов; они участвуют в размножении растения (окраска и запах цветков, плодов), во взаимодействии растений между собой и другими организмами в экосистеме. Условия окружающей среды для разных видов растений весьма разнообразны, более того, каждый вид растения может «решать» сходные задачи по-своему. Отсюда становится понятным огромное разнообразие соединений вторичного метаболизма растений и уникальность их набора для вида растения, зависимость от фазы развития растения, условий его выращивания. Из «экологических» задач также следует, что многие вторичные метаболиты должны обладать биологической активностью. Действительно, большинство лекарственных и ядовитых растений обязаны своими свойствами присутствию вторичных метаболитов. Выделение и химический анализ действующих веществ из таких растений показали еще одну особенность вторичных метаболитов: эти соединения, как правило, имеют относительно низкую молекулярную массу (у большинства она не превышает 2,0 – 3,0 кДа).

И, наконец, еще одна черта вторичных метаболитов – они синтезируются из очень небольшого числа предшественников: 7 – 8 аминокислот для алкалоидов, фенилаланин или тирозин для фенольных соединений, мевалоновая кислота или 5-оксисилулоза для изопреноидов.

### **Признаки вторичных метаболитов**

По химической структуре молекулы отличить вторичные метаболиты от первичных можно далеко не всегда. Структуры белковых аминокислот (первичные метаболиты) и небелковых аминокислот (типичные вторичные метаболиты) часто отличаются лишь наличием или отсутствием метильной, гидроксильной либо другой функциональной группы.

Признаки вторичных метаболитов:

- 1) присутствие не во всех растениях;
- 2) наличие биологической активности;
- 3) относительно низкий молекулярный вес;
- 4) небольшой набор исходных соединений для их синтеза.

Это именно признаки вторичных метаболитов, поскольку каждый из них, в общем-то, не обязателен. Ряд вторичных метаболитов найден практически во всех растениях (например, многие фенилпропаноиды); достаточно много вторичных метаболитов без выраженной биологической активности (хотя не исключен вариант, что ее просто не обнаружили); известны высокомолекулярные вторичные метаболиты (например, каучук и гуттаперча). Однако совокупность указанных признаков достаточно четко очерчивает круг вторичных метаболитов растений.

Наиболее обоснованно отнести соединение к первичным или вторичным метаболитам можно только после выяснения его роли в жизнедеятельности растения, т.е. на основе его функциональной значимости. Функциональное определение вторичного метаболизма в первом приближении можно дать как метаболизм соединений, *имеющих значение на уровне целого организма, но не на уровне клетки.*

**Принципы классификации вторичных метаболитов**, как и названия индивидуальных соединений, изменялись по мере их изучения. Сейчас можно встретить элементы по крайней мере четырех вариантов классификации.

*Эмпирическая (тривиальная) классификация.* Самый «древний» принцип классификации, основанный на определенных свойствах вторичных метаболитов. Например, алкалоиды – соединения, имеющие щелочные свойства; сапонины – вещества, образующие при встряхивании пену (от *Saponaria* – мыльнянка); горечи – соединения с горьким вкусом; эфирные масла – ароматные летучие вторичные метаболиты. Подобный принцип классификации имеет много недостатков, однако его элементы встречаются до сих пор в силу традиции и длительного употребления.

Вторичные метаболиты получали (и получают) свои названия, как правило, также эмпирически. Чаще всего названия происходят от растения, из которого впервые было выделено соединение. Например, алкалоиды папаверин (*Papaver* – мак), берберин (*Berberis* – барбарис), кокаин (*Erythroxylum coca* – кокаиновый куст). Довольно часто названия связаны с мифологией, историей, личностями и т.д. Например, алкалоид морфин получил свое название в честь бога сна Морфея,

алкалоид тебаин – от египетского города Тсбаис, рядом с которым в древности был центр по производству наркотиков, каучук в переводе с индейского – «слезы дерева».

Подобный способ классификации и формирования названий соединений часто приводит к недоразумениям. Например, биологически активные тритерпеновые гликозиды женьшеня практически одновременно начали изучать в Японии и в России. Японские исследователи предложили их называть гинзено-зилами – по видовому названию женьшеня (*Panax ginseng*), тогда как русские исследователи – панаксозидами, т.е. по родовому названию. Позже, когда стало ясно, что одни и те же соединения называются по-разному, пришлось публиковать «таблицы соответствия» гинзенозидов и панаксозидов.

*Химическая классификация.* Этот вариант классификации основан на признаках химической структуры вторичных метаболитов и на данный момент времени наиболее разработан и распространен. Однако и эта классификация не лишена недостатков. Например, алкалоиды по такой классификации – соединения, имеющие атом азота в гетероцикле. По этому признаку гликоалкалоиды картофеля или томатов – типичные алкалоиды, однако по способу синтеза, структуре и ряду свойств эти соединения являются изопреноидами.

*Биохимическая классификация.* Эта классификация базируется на способах биосинтеза вторичных метаболитов. Например, согласно этой классификации упомянутые выше гликоалкалоиды относятся к тритерпеновым псевдоалкалоидам, так как синтезируются, как и стероидные гликозиды, по изопреноидному пути. Это, по-видимому, наиболее объективный вариант классификации. Однако поскольку биохимия вторичного метаболизма еще недостаточно разработана, такая классификация находится в периоде становления.

*Функциональная классификация,* основана на функциях вторичных метаболитов в интактном растении. Этот вариант принципиально отличается от предыдущих и должен существовать параллельно с ними. Согласно функциональной классификации в одну группу соединений могут попадать химически разные структуры. Например, фитоалексины (вторичные метаболиты, имеющие защитные функции и синтезирующиеся в ответ на атаку патогена) представлены в разных видах фенольными соединениями, изопреноидами, полиацетиленами и др. Разработка функциональной классификации вторичных метаболитов только начинается, но она имеет принципиальное значение для физиологии растений.

Наличие разных вариантов классификации вторичных метаболитов приводит к определенным сложностям. В частности, при использовании разных признаков, используемых при химической классификации, возможно «перекрывание» групп вторичных метаболитов. Например, в «фармакогнозии» в качестве действующих веществ многих лекарственных растений выделяют гликозиды (соединения, молекула которых состоит из агликона и углеводного фрагмента) в отдельную группу. В то же время по структуре агликона эти гликозиды могут быть отнесены к фенольным соединениям, изопреноидам или другим группам вторичных метаболитов. Еще больше проблем возникает, когда соединение содержит ряд признаков, характерных для разных групп вторичных метаболитов (например,

пренилированные фенольные соединения). В ряде случаев появляющиеся проблемы можно снять, корректируя химическую классификацию биохимической.

**Основные группы вторичных метаболитов.** В настоящее время известно более десятка групп (классов) вторичных метаболитов. При этом некоторые группы насчитывают по несколько тысяч индивидуальных соединений, тогда как другие – лишь единицы. Так же неравномерно распределены группы в растительном мире. Например, изопреноиды и фенольные соединения присутствуют во всех видах растений, тогда как некоторые группы (например, тиофены или ацетогенины) характерны лишь для единичных видов.

Хорошо известны три самые большие группы вторичных метаболитов – *алкалоиды, изопреноиды (терпеноиды) и фенольные соединения*. Каждая из этих групп состоит из несколько тысяч соединений и подразделяется на многочисленные подгруппы. Известно также около десятка менее многочисленных групп вторичных метаболитов: растительные амины, небелковые аминокислоты, цианогенные гликозиды, полиацетилены, беталаины, алкиламины, тиофены и др. Количество соединений, входящих в эти группы, колеблется от единиц до нескольких сотен.

Вторичные метаболиты в растении практически никогда не присутствуют в «чистом виде», они, как правило, входят в состав сложных смесей. Такие смеси в зависимости от их состава и нахождения в растении часто носят собственные, исторически сложившиеся названия.

*Эфирные масла*, как правило, представляют из себя смесь легко испаряющихся изопреноидов (моно- и сесквитерпенов).

*Смоли* представлены главным образом дитерпенами.

*Камеди* состоят преимущественно из полисахаридов, но в их состав часто входят алкалоиды, фенольные соединения.

*Слизи* – это смесь водорастворимых олиго- и полисахаридов, сахаров, а также небольших количеств фенольных соединений, алкалоидов или изопреноидов.

## **2 Обмен веществ и энергии клетки.**

Все живые существа состоят из клеток. Клетка является не только его структурной, но и функциональной единицей. Живая клетка состоит из тех же химических элементов, что и неживая природа. Процессы, происходящие в клетке, подчиняются общим законам физики и химии. Согласно первому закону термодинамики энергия для клеточной работы не может создаваться из ничего и исчезать бесследно. Согласно второму закону термодинамики в клетке последовательно возрастает энтропия и происходит «разупорядочение» структуры. По сравнению с неживыми структурами скорость возрастания энтропии в живых системах минимальная.

Живые организмы представляют собой открытые системы, которые обмениваются с окружающей средой энергией, веществом и информацией.

Фотосинтезирующие клетки растений потребляют солнечную **энергию** и превращают ее в химическую форму. Универсальной клеточной «валютой» служат молекулы АТФ, обеспечивающие важнейшие процессы жизнедеятельности, прежде всего – биосинтезы.

АТФ представляет собой универсальное макроэргическое соединение, реакция гидролиза которого сопряжена со множеством энергозависимых процессов. Сопряжение осуществляется через образование общего для двух реакций промежуточного продукта: отщепляемый от АТФ фосфат временно переносится на молекулу одного из реагирующих веществ. В результате такого фосфорилирования энергия молекулы повышается, и это дает возможность пройти энергетически невыгодной реакции. Помимо АТФ в клетке есть и другие соединения с макроэргической связью и высокими значениями свободной энергии гидролиза, однако, именно АТФ является наиболее общим и прямым источником энергии в клетке.

Часть энергии АТФ затрачивается на механическую работу (например, движение цитоплазмы), другая часть идет на активный транспорт веществ против физико-химических градиентов. Большую роль играют в клетке механизмы, обеспечивающие сигналы о быстрых изменениях окружающей среды. При этом часть энергии АТФ превращается в электрическую (биопотенциалы) или световую (биохемилюминесценция), которые вновь высвобождаются в окружающую среду.

Образованные при фотосинтезе органические **вещества** участвуют в другом важнейшем процессе - дыхании. Окислительный распад дыхательных субстратов приводит к освобождению заключенной в них энергии - часть ее вновь локализуется в молекулах АТФ и может затем использоваться по перечисленным направлениям. Более половины энергии окисления превращается в теплоту и в этой форме выделяется в окружающую среду. Таким образом осуществляется обмен энергией между клеткой и средой.

**Обмен веществом** включает процесс поглощения из окружающей среды диоксида углерода, воды, минеральных веществ, участвующих в клетке в многочисленных биохимических реакциях. В результате этих процессов клетка строит и поддерживает свои структуры, а продукты распада и отходы жизнедеятельности выходят в окружающую среду, где они подвергаются превращениям.

**Обмен информацией** начинается с восприятия клеткой сигналов от внешних раздражителей. Возникающее в клетке возбуждение приводит к изменению функциональной активности клетки. Сигналы о происшедших переменах клетка посылает в окружающую среду.

*Клеточная энергетика.* Эукариотическая клетка разделена мембранами на несколько отсеков (**компарментов**). Компарменты эукариотической клетки называют органеллами. Органеллы специализируются на выполнении различных функций. Разделение клетки на компарменты, возможно, является следствием ее больших размеров (современная эукариотическая клетка больше бактериальной в 10-30 раз). При этом увеличение объема клетки сопровождается существенно меньшим увеличением поверхности ее плазматической мембраны, где протекают многие важнейшие метаболические процессы. Кроме того, с увеличением объема клетки затрудняется координация ее метаболизма (например, «доставка» нужных веществ в нужное место). Формирование компарментов позволяет пространственно разделить блоки метаболизма.

Все живые организмы не могут оставаться живыми и поддерживать высокий уровень организации без постоянного притока энергии извне. При этом они могут использовать только две формы внешней энергии - **световую и химиче-**

скую. Именно по способу получения энергии организмы делят на **фототрофы** и **хемотрофы**. Растения получают энергию в виде электромагнитного излучения Солнца, а животные используют энергию, заключенную в ковалентных связях органических молекул, которые поступают в организм с пищей. Полагают, что первые организмы древней Земли располагали избытком органических соединений, образующихся в ходе геохимических процессов. Они извлекали энергию, окисляя органические соединения в процессах, видимо, сходных с различными видами брожения. Эту способность сохранили клетки всех ныне живущих организмов, способные получать энергию при анаэробном распаде глюкозы в процессе *гликолиза*. Однако по мере исчерпания запасов органики эволюционное развитие получили фототрофы, использующие энергию света в процессе *фотосинтеза* и способные синтезировать углеводы из атмосферного  $\text{CO}_2$  и воды. Фотосинтез сопровождался образованием молекулярного кислорода. Насыщение атмосферы кислородом привело к возникновению и эволюционному доминированию аэробных форм жизни, которые научились получать необходимую им энергию в результате окисления углеводов кислородом в процессе *дыхания*. Дальнейшая эволюция разделила живых существ на прокариоты и эукариоты, одноклеточные и многоклеточные, на растения и животных, но возникшие на ранних этапах эволюции механизмы использования клеткой энергии остались в своей основе неизменными.

При всем разнообразии живых существ и условий среды, в которых они обитают, для получения энергии ими используются три основных процесса - *гликолиз, дыхание и фотосинтез*. При этом, несмотря на все различия в метаболизме растений, животных и бактерий, способы преобразования внешней энергии, будь то энергия света или энергия субстратов дыхания, в клеточные формы энергии базируются на общих фундаментальных принципах и подчиняются общим законам.

Для интеграции метаболизма в единое целое вся поступающая в клетку энергия, будь то световая энергия или энергия субстратов дыхания, сначала преобразуется и запасается в форме универсальных энергетических и восстановительных эквивалентов. Универсальными, или конвертируемыми, формами клеточной энергии в растительной клетке является: *трансмембранный градиент электрохимического потенциала ионов водорода*, или электрохимический протонный градиент  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  и АТФ.

Важнейшими восстановительными эквивалентами являются никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН). В фотосинтезе поглощение света сопровождается восстановлением НАДФН и синтезом АТФ в хлоропластах. В процессе дыхания, который имеет место в клетках растений и животных, восстановленный НАДН и АТФ образуются в митохондриях. В обоих случаях синтез АТФ опосредован образованием на тилакоидной или митохондриальной мембране электрохимического протонного градиента  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ .

Образование АТФ происходит путем фосфорилирования АДФ неорганическим фосфатом за счет энергии электрохимического потенциала ионов водорода на мембране. Например, образование АТФ при фотосинтезе, или в аэробной фазе дыхания. Мембранное фосфорилирование протекает во внутренней мембране митохондрий, в мембранах тилакоидов хлоропластов, в хроматофорах фотосинтези-

рующих бактерий, в цитоплазматической мембране бактерий. Эти мембраны, несущие ферменты переноса электронов и сопряженного с ним фосфорилирования, называются *сопрягающимися мембранами*.

Расход АТФ на обеспечение энергозависимых реакций должен восполняться ее синтезом, который требует адекватных энергетических затрат. Каким же образом происходит синтез АТФ в клетке и каким образом используется для этого энергия внешних ресурсов?

Небольшая часть АТФ может быть образована при анаэробном разложении глюкозы в биохимических реакциях гликолиза. Основная же часть АТФ в клетках растений, животных и многих бактерий образуется в процессах фотосинтеза или дыхания. В основе трансформации энергии (будь то энергия света или субстратов дыхания) в энергию молекулы АТФ лежит общий и единый механизм, который получил название *хемиосмотического сопряжения*. Впервые *хемиосмотическая теория* была постулирована в 1960 г. английским биохимиком Питером Митчеллом. Однако идеи Митчелла были столь необычны, что стали общепризнанными лишь спустя некоторое время, когда получили неопровержимые экспериментальные подтверждения. Впоследствии П. Митчелл получил за свое открытие Нобелевскую премию (1978). Рассмотрим в общих чертах, в чем смысл хемиосмотического сопряжения и какие события лежат на пути преобразования энергии в клетке.

В системах трансформации энергии ключевая роль принадлежит замкнутой, *сопрягающей* мембране, непроницаемой для ионов. К сопрягающим относятся тилакоидная мембрана хлоропластов, внутренняя мембрана митохондрий и плазматические мембраны бактериальных клеток. Как правило, сопрягающая мембрана обогащена белком и биохимически отличается от других мембран клетки, так как содержит уникальный фосфолипид - кардиолипин, который делает мембрану более жидкой и более непроницаемой для ионов.

Энергопреобразующие мембраны содержат *электрон-транспортные цепи (ЭТЦ)*. В процессах фотосинтеза и дыхания реализация энергии света или окисляемых субстратов в тилакоидной или митохондриальной мембране связана с возникновением *электронного транспорта в ЭТЦ*. Перенос электрона в фотосинтетической или дыхательной цепи неразрывно связан с векторной транслокацией иона  $H^+$  через мембрану против сил электрического поля и в направлении большей концентрации. В фотосинтезе действие ЭТЦ сопряжено с накоплением протонов внутри тилакоидного пространства. Дыхательная цепь перекачивает протоны из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. Процесс транслокации протона сопровождается *энергизацией* мембраны, т.е. возникновением на ней трансмембранной разности, или градиента электрохимического потенциала ионов водорода ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) или протондвижущей силы  $\Delta p$ . Генерируемый на мембране  $\Delta\mu_{H^+}$  представляет собой форму энергии, запасенную на мембране. Он используется для синтеза АТФ в процессах *фотофосфорилирования* и *окислительного фосфорилирования*. Синтез АТФ катализируется ферментом АТФ-синтазой, также локализованным в сопрягающих мембранах хлоропластов, митохондрий или бактерий.

Таким образом, система трансформации энергии включает следующие основные компоненты:

- замкнутая сопрягающая мембрана;
- локализованная в мембране ЭТЦ;
- трансмембранный электрохимический протонный градиент  $\Delta\mu_{H^+}$ , генерируемый работой цепи;
- АТФ-синтаза, катализирующая синтез АТФ из АДФ и  $P_n$  за счет энергии  $\Delta\mu_{H^+}$ .

Так выглядит общая схема преобразования энергии на мембране.

**АТФ-синтазы** разного происхождения - из митохондрий, хлоропластов или бактериальных мембран - имеют в целом схожее строение, что говорит о несомненно древнем эволюционном происхождении фермента. Комплекс  $F_1$  состоит из пяти разных субъединиц в определенном соотношении:  $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ . Основу его структуры составляют гомологичные субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$ , чередующиеся друг с другом. Места связывания для нуклеотидов есть на обеих субъединицах, но три активных центра, где происходит синтез АТФ, расположены в основном на субъединицах  $\beta$ . Субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  расположены поочередно вокруг  $\gamma$ -субъединицы, которая представляет собой стержень (9 нм) и, как втулка, проходит через каталитический центр, связывая факторы  $F_1$  и  $F_0$ . Субъединица  $\delta$ , расположенная на внешней стороне одной из  $\delta$ -субъединиц, служит сайтом прикрепления двух  $b$ -субъединиц, которые заякоривают комплекс  $F_1$  в мембране. Функции  $\epsilon$ -субъединицы связаны с регуляцией:  $\epsilon$ -субъединица избирательно препятствует гидролизу АТФ. Фактор  $F_1$  легко диссоциирует от  $F_0$  и проявляет *in vitro* АТФазную активность, гидролизуя АТФ.

Комплекс  $F_0$  состоит из трех типов белковых субъединиц в следующем соотношении:  $a_1b_2c_{9-12}$ . Он обеспечивает связывание  $F_1$  с мембраной и перенос протона. Небольшие, очень гидрофобные  $c$ -субъединицы, имеющие по два трансмембранных участка, формируют проводящий протоны канал, который обеспечивает прохождение  $H^+$  через всю мембрану. Интересно отметить, что такой сложный ферментный комплекс, как АТФ-синтаза, находится под двойным генетическим контролем: три субъединицы  $F_0$ -фактора и  $\alpha$ -субъединицы фактора  $F_1$  кодируются геномом митохондрий или хлоропластов, тогда как синтез остальных субъединиц контролируется ядерными генами.

**Организация ЭТЦ в мембране.** Электрон-транспортные цепи фотосинтеза и дыхания организованы в мембране сложным образом и представляют собой встроенные в нее суперкомплексы, состоящие из многих субъединиц белка. В их составе обязательно присутствуют трансмембранные белки, закрепляющие весь комплекс в мембране. Каждый суперкомплекс содержит, как правило, несколько активных центров: на белках в качестве простетических групп или за счет нековалентных взаимодействий удерживаются соединения, которые участвуют в переносе электрона. Некоторые комплексы из тилакоидных и митохондриальных мембран удалось выделить с помощью детергентов и получить в кристаллизованном состоянии.

Организация электронного транспорта такова, что перенос электрона по цепи неразрывно связан с направленной транслокацией ионов  $H^+$  через мембрану и генерацией  $\Delta\mu_{H^+}$ . В тилакоидной мембране протоны переносятся внутрь тилакоидного пространства, а в митохондриях - из матрикса в межмембранное пространство. Механизмы транслокации  $H^+$  через мембрану могут быть разными и в ряде случаев пока остаются неясными. Общим случаем является перенос протона через мембрану при участии подвижных переносчиков - хинонов.

Если в процессе электронного транспорта на мембране возникает  $\Delta\mu_{H^+}$ , который используется на синтез АТФ, то транспорт называется *сопряженным*. Однако могут быть ситуации, когда работа цепи не сопряжена с генерацией  $\Delta\mu_{H^+}$  и синтезом АТФ. Тогда электронный транспорт называется *разобщенным*. Разобщение электронного транспорта с фосфорилированием имеет место *in vitro*, при этом энергия электронного потока преобразуется (диссипирует) в тепло. Разобщение имеет место в митохондриях животных и растений и представляет особый механизм регуляции метаболизма.

**Флавопротеиды.** Компонентами ЭТЦ являются флавопротеиды - белки, содержащие в качестве прочно связанной простетической группы флавинонуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). Функциональная часть этих соединений представлена системой ароматических колец, в состав которых входит остаток рибофлавина (витамина  $B_2$ ). Окисление – восстановление флавопротеидов связано с переносом двух атомов водорода. Окисленные формы флавинов имеют два максимума поглощения - при 375 и 450 нм, которые исчезают при восстановлении. Редокс-потенциалы флавопротеидов варьируют в широких пределах (от -0,49 до +0,19 В) в зависимости от структуры апобелка.

**Цитохромы.** Обязательными компонентами ЭТЦ являются цитохромы - железосодержащие белки, в составе которых присутствует гем. Основой структуры гема является порфириновое кольцо, образованное из четырех пиррольных колец, в центре которого расположен атом железа. В редокс-превращениях цитохромы функционируют как одноэлектронные переносчики, при этом железо меняет свою валентность, переходя из состояния  $Fe^{2+}$  в состояние  $Fe^{3+}$ . Восстановленные формы цитохромов имеют три характерных полосы поглощения в областях 545-600, 520-535, 415-445 нм.

**Железосерные белки.** Железосерные белки, или Fe-S-белки, содержат так называемые Fe-S-кластеры, или центры. Центры состоят из двух или четырех атомов железа, комплексно связанных с атомами неорганической серы или серы в остатках цистеина в структуре белка. В основе классификации железо-серных белков лежит структура кластера; в зависимости от этого различают 2Fe-2S- или 4Fe-4S-белки.

В состав центра входят несколько атомов железа, но каждый из центров способен принимать или отдавать только один электрон. Восстановление железосерных белков сопровождается исчезновением в спектре полосы 450 нм и появлением сигнала ЭПР (метод электронного парамагнитного резонанса), что указывает на появление свободного радикала. Для этой группы соединений диапазон значений  $E^\circ$  также достаточно широк: от -0,42 В до +0,35 В.

**Хиноны.** В качестве подвижных переносчиков, действующих в липидной фазе мембраны, функционируют хиноны, обозначаемые буквой Q (от англ. quinon), пластохинон в ЭТЦ фотосинтеза и убихинон в ЭТЦ дыхания. Хиноны состоят из ароматического кольца и боковой липофильной цепи, в составе которой может содержаться 9 (пластохинон) или 10 (убихинон) изопреноидных остатков. Свободно диффундирующие в мембране хиноны осуществляют связь между белковыми комплексами и могут переносить два атома водорода. Хиноны обладают двумя свойствами, исключительно важными для работы ЭТЦ по переносу протонов через мембрану. Во-первых, в ходе редокс-реакций хиноны могут захватывать или освобождать  $2\text{H}^+$  на границе раздела двух фаз - липид/вода с любой стороны мембраны. Во-вторых, в ходе электронного транспорта хиноны могут принимать или отдавать только один электрон, при этом находясь в течение какого-то времени в форме свободного анион-радикала - семихинона ( $\text{Q}^{\cdot-}$ ). Спектры поглощения хинонов находятся в УФ-области и маскируются поглощением других соединений, поэтому их окислительно-восстановительные состояния отслеживают, как правило, методом ЭПР. Редокс-потенциалы хинонов близки к нулю или имеют низкие положительные значения.

Итак, живые организмы используют энергию света и химическую энергию органических соединений в процессах фотосинтеза и дыхания. И в том и другом случае клетка превращает внешние энергетические ресурсы в конвертируемые формы клеточной энергии - АТФ и трансмембранный электрохимический протонный градиент. Преобразование энергии в процессах фотосинтеза и дыхания основано на общем механизме хемиосмотического сопряжения. Общим принципом клеточной биоэнергетики является *взаимопревращение на мембранах двух форм клеточной энергии - энергии ионных градиентов и АТФ*. Благодаря этим превращениям клетка обеспечивает энергией разнообразные процессы, протекающие как в растворе, так и на мембранах.

### 3 Структура, функции и классификация ферментов

Важнейшую роль в обмене веществ и трансформации энергии в клетке играют биологические катализаторы белковой природы - ферменты.

Все ферменты по своей химической природе разделяются на два больших класса:

- *однокомпонентные*
- *двухкомпонентные.*

Первые состоят исключительно из белка. В молекуле вторых кроме белка имеется небелковая часть. Белковая часть двухкомпонентного фермента носит название *апофермента*, а небелковая - *кофермента*. В качестве коферментов выступают, прежде всего, витамины  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$  и их различные производные, витамин  $\text{B}_6$ , никотиновая кислота и др., а также металлы (железо, медь, кобальт, марганец и др.).

По месту расположения ферменты делятся на три группы:

- *эндоферменты.* Действуют в клетке, где образовались;

- *эктоферменты*. Участвуют в процессах на цитоплазматической мембране;
- *экзоферменты*. Синтезируются в клетке, выделяются из нее и осуществляют свою работу вне цитоплазматической мембраны, снаружи от нее.

Высшим растениям более всего присущи ферменты первой группы. Так, ферменты фотосинтеза расположены в хлоропластах, дыхания - в митохондриях и т.д.

Ферменты второй и третьей групп особенно большое распространение получили в мире микроорганизмов. Они действуют главным образом в субстрате, на котором поселяются микробы. Поэтому их нередко называют внеклеточными ферментами. Однако и у высших растений наблюдается выделение ферментов из клеток, например из корня - в прикорневую зону (ризосферу) или из щитка зародыша злаков - в эндосперм. Выделению ферментов клетками корней нередко способствуют неблагоприятные внешние условия (анаэробноз и др.).

Ферменты отличаются следующими общими *особенностями*:

- *большой каталитической активностью*, значительно более высокой, чем у неорганических катализаторов (напомним, что катализ - это явление изменения скорости химической реакции или ее возбуждения с помощью катализаторов, химический состав которых и их количество после реакции остаются неизменными);
- *специфичностью действия*, под которой понимается способность фермента реагировать только с определенными веществами (субстратами) и действовать только на определенные химические связи; иначе эту особенность называют субстратной специфичностью фермента;
- *лабильностью*, т.е. способностью изменять скорость реакции в зависимости от действия ряда внешних и внутренних условий;
- *обратимостью действия* - способностью катализировать взаимоположную направленность хода реакции; эта особенность присуща далеко не всем ферментам.

Важной характеристикой любого фермента является *константа Михаэлиса*. Под этой константой понимается такая концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет половину от возможно максимальной концентрации. При малых количествах субстрата скорость ферментативной реакции пропорциональна его концентрации. С возрастанием концентрации субстрата ход реакции ускоряется все в меньшей и меньшей степени, а затем становится независимой от нее (выход кривой на плато) и будет уже определяться концентрацией фермента.

В живой клетке наряду с химической энергией (АТФ) имеется и другой источник унифицированной энергии - физическая (электрическая), которая носит название *мембранного потенциала*. Он представляет собой разность электрических потенциалов между цитоплазмой клетки и внеклеточной жидкостью.

По современным представлениям, химическая реакция может произойти только тогда, когда молекулы реагирующих веществ будут активированы, т.е. будут иметь определенное дополнительное количество энергии. Без катализатора

таких активированных молекул немного и реакции протекают очень медленно. При добавлении катализатора энергия активации, при которой начинается реакция, понижается, а число молекул, которые способны вступить в реакцию, увеличивается. Вместе с этим возрастает и число столкновений молекул между собой, скорость реакции увеличивается. Катализатор снижает энергию активации за счет обходных, дополнительных путей, через ряд промежуточных процессов, требующих меньшее количество энергии. Ниже приводится иллюстрация сказанному.

На *скорость ферментативных реакций* наиболее сильное влияние из внешних факторов оказывают температура и pH среды.

С повышением *температуры* до определенных значений скорость ферментативной реакции возрастает, затем, достигнув максимальной величины, начинает падать, для большинства ферментов это 40 - 50° С. Начиная с 50° С и выше скорость ферментативной реакции снижается из-за потери активности фермента вследствие нарушения структуры белка, его денатурации. При этом восстановление активности с наступлением в последующем оптимальной температуры не происходит в отличие от действия пониженных температур, когда перенесение тканей в условия с благоприятной температурой восстанавливает свойственную ферментам активность. Сопоставление скоростей ферментативных и химических реакций при изменении температуры показывает - до момента достижения максимальной скорости работы фермента зависимость скорости химической реакции одинакова с ферментативной, а затем первая продолжает повышаться, в то время как ферментативная из-за денатурации белка ферментов резко падает.

Большинство ферментов полностью инактивируется при температуре 60° С. Встречаются и довольно устойчивые ферменты, например рибонуклеаза или пероксидаза хрена. После промораживания активность ферментов восстанавливается, поэтому в замороженном состоянии можно достаточно долго хранить ферменты вне клетки. В целом белки-ферменты более устойчивы к температуре, чем структурные белки цитоплазмы.

Значительная часть ферментов действует с наибольшей скоростью при реакции среды слабокислой или близкой к нейтральной. Вместе с тем, почти каждый фермент имеет свои кардинальные точки *pH среды*. Поэтому кислотность внутри клетки является одним из важнейших регуляторов обмена веществ.

На скорость ферментативных реакций оказывают также влияние *концентрация ионов, окислительно-восстановительный потенциал* и другие факторы.

В природе существует огромное количество не только отдельных ферментов, но и ферментных систем. Список ферментов 1972 г. уже содержал более 2000 наименований. Примерно двести из них получены в кристаллическом виде. Для сотен из них выяснены различные структуры. Для каждого фермента определено название, исходя из его основной функции, и присвоены *кодовые числа и шифры*. Шифр каждого фермента содержит четыре числа, разделенных точками, и составлен по следующему принципу: первое число указывает класс фермента, второе - подкласс, третье - подподкласс, четвертое - порядок фермента в подподклассе.

В *основу* классификации ферментов положена природа химических превращений, тип реакций, катализируемых ферментами. По этим признакам все многообразие ферментов раздельно на шесть классов: оксидоредуктазы (окислитель-

но- восстановительные ферменты); трансферазы; гидролазы (гидролитические ферменты); лиазы; изомеразы; лигазы (синтетазы).

К *оксидоредуктазам* относятся ферменты, катализирующие реакции окисления и восстановления. Они переносят протон или электрон от одного субстрата к другому, окисляя первый и восстанавливая второй. Эти ферменты участвуют во всех процессах биологического окисления - дыхания и брожения.

*Трансферазы* - ферменты, катализирующие реакции переноса химических групп между молекулами веществ: метильные (*метилтрансферазы*), аминные (*аминотрансферазы*), фосфатные (*фосфотрансферазы*) и многие другие. Фосфотрансферазы, для которых донором фосфатных групп служит АТФ, называются киназами.

*Гидролазы* катализируют реакции гидролитического, т.е. с участием воды, распада веществ.

*Лиазы* - ферменты, катализирующие реакции расщепления веществ без участия воды, т.е. негидролитическим путем, а также присоединения функциональных групп по двойным связям.

*Лигаза*, или синтетаза, осуществляют реакции синтеза разнообразных веществ. Известно, что все синтетические процессы требуют затраты энергии и поэтому протекают только при участии АТФ. Например, *пируваткарбоксилаза* осуществляет реакцию синтеза щавелевоуксусной кислоты из пирувиноградной кислоты и  $\text{CO}_2$ .

#### 4 Биосинтез белка в клетке

Белки синтезируются живыми организмами из аминокислот на основе информации, закодированной в генах. Каждый белок состоит из уникальной последовательности аминокислотных остатков, которая определяется нуклеотидной последовательностью гена, кодирующего данный белок. Генетический код представляет собой способ перевода нуклеотидной последовательности ДНК (через РНК) в аминокислотную последовательность полипептидной цепи. Этот код определяет соответствие трехнуклеотидных участков РНК, называемых кодонами, и определенных аминокислот, которые включаются в состав белка: например, последовательность нуклеотидов АУГ соответствует метионину. Поскольку ДНК состоит из четырех типов нуклеотидов, то общее число возможных кодонов равно 64; а так как в белках используется 20 аминокислот, то многие аминокислоты определяются более чем одним кодоном. Три кодона являются незначащими: они служат сигналами остановки синтеза полипептидной цепи и называются терминаторными кодонами, или стоп-кодонами.

Гены, кодирующие белки, сначала транскрибируются в последовательность нуклеотидов матричной РНК (мРНК) ферментами РНК-полимеразами. В подавляющем большинстве случаев белки живых организмов синтезируются на рибосомах – многокомпонентных молекулярных машинах, присутствующих в цитоплазме клеток. Процесс синтеза полипептидной цепи рибосомой на матрице мРНК называется трансляцией.

Рибосомный синтез белков принципиально одинаков у прокариот и эукариот, но различается в некоторых деталях. Так, мРНК прокариот может считываться

рибосомами в аминокислотную последовательность белков сразу после транскрипции или даже до ее завершения. У эукариот же первичный транскрипт сначала должен пройти серию модификаций и переместиться в цитоплазму (к месту локализации рибосом), прежде чем может начаться трансляция. Скорость синтеза белков выше у прокариот и может достигать 20 аминокислот в секунду.

Еще до начала трансляции ферменты аминоацил-тРНК-синтетазы специфично присоединяют аминокислоты к соответствующим им транспортным РНК (тРНК). Участок тРНК, который называется антикодоном, может комплементарно спариваться с кодоном мРНК, обеспечивая тем самым включение присоединенного к тРНК аминокислотного остатка в полипептидную цепь в соответствии с генетическим кодом.

Во время начальной стадии трансляции, инициации, инициаторный (обычно метиониновый) кодон узнается малой субъединицей рибосомы, к которой при помощи белковых факторов инициации присоединена аминоацилированная метиониновая тРНК. После узнавания стартового кодона к малой субъединице рибосомы присоединяется большая субъединица, и начинается вторая стадия трансляции – элонгация. При каждом шаге рибосомы от 5'- к 3'-концу мРНК считывается один кодон путем образования водородных связей между ним и комплементарным ему антикодоном транспортной РНК, к которой присоединен соответствующий аминокислотный остаток. Образование пептидной связи между последним аминокислотным остатком растущего пептида и аминокислотным остатком, присоединенным к тРНК, катализируется рибосомальной РНК (рРНК), образующей пептидилтрансферазный центр рибосомы. Этот центр позиционирует атомы азота и углерода в положении, благоприятном для прохождения реакции. Третья и последняя стадия трансляции, терминация, происходит при достижении рибосомой стоп-кодона, после чего белковые факторы терминации гидролизуют связь между последней тРНК и полипептидной цепью, прекращая ее синтез. В рибосомах белки всегда синтезируются от N- к С-концу.