

პრაქტიკული ენგინეროლოგია

დამტკიცებულია საქართველოს სსრ უმაღლესი და საშუალო სპეციალური განათლების სამინისტროს მიერ, პრაქტიკულ სახელმძღვანელოდ უმაღლესი სასწავლებლების ბიოლოგიის, ქიმიისა და ტექნოლოგიური ფაკულტეტების სტუდენტებისათვის

ორგანიზმის ცხოველმყოფელობაში ფერმენტებს ვადამწვევები როლი ენიჭება. თეორიული მნიშვნელობის გარდა ფერმენტები ფართო გამოყენებას პოულობენ სახალხო მეურნეობის სხვადასხვა დარგებსა და მედიცინაში. სახელმძღვანელოში განხილულია ფერმენტების აგებულება, მათი მოქმედების მექანიზმები, კინეტიკური და რეგულატორული თვისებები. განსაკუთრებული ყურადღება ეთმობა ფერმენტების გამოყენების, გაწმენდისა და განსაზღვრის როგორც კლასიკურ. ისე უახლეს მეთოდებს (იზოელექტრული ფოკუსირება, აფინური ქრომატოგრაფია და სხვა).

წიგნში მოცემულია ფერმენტების კინეტიკური პარამეტრების დადგენის თანამედროვე საშუალებები. დიდი ადგილი აქვს დათმობილი ფიზიოლოგიურად და სამრეწველო თვალსაზრისით მნიშვნელოვანი ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრის მეთოდებს.

სახელმძღვანელო განკუთვნილია ბიოლოგიის, ქიმიის და ტექნოლოგიის ფაკულტეტის სტუდენტებისათვის, ასპირანტებისათვის, მეცნიერ მუშაკებისათვის, სამეცნიერო კვლევითი ინსტიტუტებისა და წარმოებაში მომუშავე ინჟინერ-ტექნიკური პერსონალისათვის.

რედაქტორი აკად. პ. ქო მ ე თ ი ა ნ ი

ავტორებისაბან

ენზიმოლოგია ითვლება თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთ ყველაზე სწრაფად მზარდ მეცნიერებად. ამჟამად გაშიფრულია მრავალი ფერმენტის პირველადი სტრუქტურა, დადგენილია აქტიური ცენტრის აღნაგობა და მოლეკულის სივრცითი კონფიგურაცია, გარკვეულია მათი მოქმედებისა და ალოსტერიული რეგულაციის მექანიზმები და სპეციფიკურობა. მოლეკულური ბიოლოგიის უდიდეს მიღწევად ითვლება გენეტიკური ინფორმაციის მატარებელი ნუკლეინის მჟავების ბიოსინთეზში მონაწილე ფერმენტების (პოლინუკლეოტიდფოსფორილაზა, დნმ-პოლიმერაზა, რნმ დაპოკიდებული დნმ-პოლიმერაზა ანუ რევერტაზა და სხვა) აღმოჩენა და მათი მოქმედების მექანიზმების დადგენა. უკანასკნელი დროის დიდ მიღწევად უნდა ჩაითვალოს ფერმენტ რიბონუკლეაზის და განსაკუთრებით გენის ქიმიური სინთეზი.

თანამედროვე ენზიმოლოგიის — მოლეკულური ენზიმოლოგიის — ძირითად ამოცანას წარმოადგენს ფიზიოლოგიურად და სამრეწველო თვალსაზრისით მნიშვნელოვანი ფერმენტების ქიმიური სინთეზი და მათ სტრუქტურასა და ფუნქციას შორის კავშირის დადგენა. ენზიმოლოგიის მთავარ პრობლემად კვლავ რჩება სიცოცხლის პროცესებში ფერმენტების ინტიმური მექანიზმების გარკვევა.

ფერმენტებს, კატალიზური უნარის გამო, სულ უფრო მზარდი მნიშვნელობა ენიჭება სახალხო მეურნეობის ისეთ დარგებში როგორცაა პურის, ყველის, ლუდის, ღვინის, ჩაის, თამბაქოს წარმოება. ფერმენტები ფართოდ გამოიყენება ვიტამინების, ანტიბიოტიკების, სამკურნალო პრეპარატების, სასუქებისა და ქიმიური რეაქტივების წარმოებაში.

წინამდებარე წიგნი წარმოადგენს პრაქტიკულ სახელმძღვანელოს უმაღლესი სასწავლებლების იმ სტუდენტებისათვის, რომლებიც სასწავლო პროგრამით შეისწავლიან ბიოქიმიასა და ენზიმოლოგიას. სახელმძღვანელოს დანიშნულებაა გააცნოს სტუდენტებს

ენზიმოლოგიის თანამედროვე მდგომარეობა, შეასწავლოს ექსპერიმენტული შედეგების დამუშავება და შესძინოს, ის აუცილებელი ცოდნა რომელიც გაუადვილებს მათ კვლევით მუშაობას აღნიშნულ დისციპლინებში.

ვინაიდან მსგავსი ხასიათის სახელმძღვანელო ენზიმოლოგიაში არ მოგვეპოვება არა თუ ქართულ, არამედ რუსულ ენაზედაც კი, და ვინაიდან ეს არის პირველი ცდა ამ მიმართულებით, ცხადია წიგნი არ იქნება დაზღვეული ხარვეზებისაგან. ჩვენ მაღლობით მივიღებთ ყველა იმ შენიშვნასა და რჩევას, რომლებიც გააუმჯობესებენ წიგნის ხარისხს და აუცილებლად გავითვალისწინებთ მათ შემდგომ გამოცემაში.

სახელმძღვანელოს მომზადებასა და გამოცემაში დიდი დახმარება გაგვიწია აკადემიკოსმა ს. დურმიშიძემ, რისთვისაც მას უღრნეს მადლობას მოვახსენებთ. გულითად მადლობას ვუძღვნიტ წიგნის რედაქტორს, აკადემიკოს პ. ქომეთიანს სახელმძღვანელოს გულდასმით გაცნობისა და საქმიანი, კრიტიკული შენიშვნებისათვის. აღვნიშნავთ აგრეთვე იმ შრომას, რომელიც გასწიეს თ. საღუნუშვილმა, თ. ალექსიძემ და ც. ბრეგვაძემ წიგნის ხელნაწერის მომზადებისა და მისი კორექტირებისას.

შესავალი

ფერმენტების ბუნებისა და თვისებების ცოდნა აუცილებელი პირობაა სასიცოცხლო პროცესების ინტიმური მექანიზმების გარკვევისა და შესწავლისათვის.

ენზიმოლოგია არის სწორედ ის მეცნიერება, რომელიც შეისწავლის ფერმენტებს, მათ გავრცელებას, ლოკალიზაციას, გამოყოფისა და გაწმენდის მეთოდებს, მოქმედების მექანიზმებსა და სპეციფიკურობას, ფიზიკო-ქიმიურ, რეგულატორულ და კინეტიკურ თვისებებს, აღნაგობასა და ფუნქციას, ბიოსინთეზსა და მის რეგულაციას.

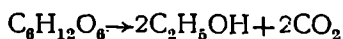
ძნელია მოიძებნოს ბიოლოგიურ მეცნიერებათა ისეთი დარგი, რომელშიც არ გამოაყენებოდეს ენზიმოლოგია. ასევე არ შეიძლება არსებობდეს მკვლევარი მომუშავე ბიოქიმიაში, ბიოფიზიკაში, ფიზიოლოგიაში, ციტოლოგიაში, მიკრობიოლოგიაში, მედიცინაში, კვების ტექნოლოგიაში და სხვ., რომელიც თავისი, თუნდაც ძალზე სპეციფიკური კვლევისას, მკიდროდ არ იყოს დაკავშირებული ენზიმოლოგიასთან და არ იყენებდეს ენზიმოლოგიური კვლევის თანამედროვე მეთოდებს. ყველაფერი ეს მეტყველებს ენზიმოლოგიის, როგორც მეცნიერების გადამწყვეტ მნიშვნელობაზე და მისი ღრმად შესწავლის აუცილებლობაზე. როგორც ჩვენთან, ისე საზღვარგარეთ გამოდის სპეციალური ჟურნალები და მონოგრაფიები, არსებობს სამეცნიერო-კვლევითი ცენტრები, სადაც სპეციალურად შეისწავლება ენზიმოლოგიის საკითხები.

სიტყვები „ფერმენტი“ და „ენზიმი“ სინონიმებია. ასევე მეცნიერება ფერმენტების ანუ ენზიმების შესახებ, ე. ი. „ფერმენტოლოგია“ და „ენზიმოლოგია“ სინონიმებია. ამჟამად, ქართულ, რუსულ, გერმანულ და ფრანგულ სამეცნიერო ლიტერატურაში იხმარება „ფერმენტი“, ხოლო ამერიკულ, ინგლისურ და ზოგიერთ სხვა ლიტერატურაში უმთავრესად იხმარება „ენზიმი“.

სიტყვა „ფერმენტი“ წარმოდგება ლათინური სიტყვიდან Fermentum, რაც ნიშნავს დუღილს (რუსულად „Брожение“). სიტყვა

„ენზიმი“ ბერძნული წარმოშობისაა და ნიშნავს „უჯრედში“. ამგვარად, „ფერმენტოლოგია“ ნაწარმოებია ლათინური და ბერძნული (ლოგოს — მეცნიერება) ენებიდან, ე. ი. ორი სხვადასხვა ენიდან; რაც შეეხება სიტყვას „ენზიმოლოგია“, იგი მხოლოდ ბერძნული სიტყვებიდანაა ნაწარმოები და ამდენად ნაკლებ უხერხულობას ქნის. რუსულ და ქართულ სპეციალურ ლიტერატურაში „ენზიმოლოგია“ უპირატესად მაშინ იხმარება, როდესაც იგულისხმება მეცნიერება, „ფერმენტი“ კი მაშინ, როცა საუბარია კატალიზური თვისების მქონე კონკრეტულ ცილაზე.

ინტერესმოკლებული არ იქნება თუ გავიხსენებთ ამ ორი ტერმინის — „ფერმენტისა“ და „ენზიმის“ წარმოშობის ისტორიას. ცნობილია, რომ საფუარი იწვევს მარტივი შაქრების, მაგალითად გლუკოზის სპირტად და ნახშირორჟანგად გარდაქმნას



ამ რეაქციის რაოდენობრივი მხარე ცნობილი იყო ჯერ კიდევ: მანამ, სანამ დადგინდებოდა საფუარის მონაწილეობა ამ პროცესში, რომელსაც სპირტული დუღილი ეწოდება. ცნობილმა ფრანგმა მეცნიერმა, თანამედროვე მიკრობიოლოგიის მამამთავარმა და ფუძემდებელმა ლუი პასტერმა (1822—1895 წწ.) დაამტკიცა, რომ სპირტული დუღილი ბიოლოგიური პროცესია და მისი წარმართვისათვის აუცილებელია მიკროორგანიზმები (საფუვრები).

ლუი პასტერის ეს აღმოჩენა ეწინააღმდეგებოდა გერმანელი მეცნიერის ი. ლიბიხის იმ დროს გაბატონებულ შეხედულებას სპირტულ დუღილზე, როგორც წმინდა ქიმიურ პროცესზე. მაგრამ ლ. პასტერი ცდებოდა: ის თვლიდა, რომ სპირტული დუღილი მხოლოდ ცოცხალი ორგანიზმების (საფუვრების) მონაწილეობისას მიმდინარეობდა. იგი ეყრდნობოდა შემდეგ ცდას: ყურძნის წვენის გაცხელებისას დახურულ კუთრქელში წყდებოდა სპირტული დუღილი და ამის მიზეზად პასტერს საფუვრების, თუ შეიძლება ასე ითქვას, სიკვდილი მიაჩნდა.

ე. ბუხნერმა 1897 წელს გერმანიაში (მოგვიანებით კი 1911 წ. ა. ლებედევმა რუსეთში) დაამტკიცა, რომ სპირტულ დუღილს იწვევს არა საფუარი, არამედ მასში მყოფი ნივთიერება. რადგან ჯერ კიდევ მაშინ მიაჩნდათ, რომ დუღილი საფუვრის მონაწილეობით არის კატალიზური პროცესი, ამ ნივთიერებებს ფერმენტები უწოდეს. ე. ბუხნერი საფუარის უჯრედებს სრესდა ინფუზორის მიწასთან ერთად და მიღებულ მასას ატარებდა სპეციალურ წნეხში. ამგზით მიღებულ საფუარის უჯრედებისაგან თავისუფალ გამჟვირ-

ვალე ფილტრატს მაინც გააჩნდა შაქრის სპირტად და ნახშირორჟანგად გარდაქმნის უნარი. აღუდებამდე გაცხელებული ფილტრატი მთლიანად კარგავდა სპირტული დუდილის უნარს. სწორედ ე. ბუხნერის აღმოჩენის დღიდან დაწყდა და დღესაც გრძელდება სამუშაოები ფერმენტის გამოყოფისა და გაწმენდისათვის. პირველი ფერმენტები, რომლებიც მიღებულ იქნენ კრისტალურ (მაგრამ არაპოლიმერულ) მდგომარეობაში, იყო ურეაზა (სამნერი, 1926) და პეპსინი (ნორტროპი, 1930). ამჟამად ათასობით ფერმენტია მიღებული კრისტალურ და პოლიმერულ მდგომარეობაში.

წინათ ფერმენტებს ყოფდნენ „ორგანიზებულ“ და „არაორგანიზებულ“ ფერმენტებად. „ორგანიზებულ“ ფერმენტებს თვლიდნენ ინტაქტური საფუვრის უჯრედებად, ხოლო „არაორგანიზებულ“ ფერმენტებს — ექსტრაგირებად ანუ ხსნად ფერმენტებად (მაგალითად, პეპსინი).

1878 წ. გერმანელმა ფიზიოლოგმა ეილი კუნემ, რათა აეცილებინა ფერმენტების ასეთი ორმაგი გაგება და აქედან გამომდინარე გაუგებრობანი, წინადადება წამოაყენა „არაორგანიზებული“ ფერმენტებისათვის ეწოდებინათ „ენზიმი“, რომელიც, როგორც აღვნიშნეთ, ბერძნული წარმოშობისაა და ნიშნავს „უჯრედში“ (ენ ზუმე).

ცნობილია, რომ ფერმენტის სახელწოდება ბოლოვდება სუფიქსით — „აზა“ (ამილაზა, კატალაზა, მალატდეჰიდროგენაზა და ა. შ.). საინტერესოა ამ დაბოლოების ისტორია.

1833 წელს ა. პაიენმა და ჟ. პერსომ აღმოაჩინეს, რომ ალაოს ექსტრაქტზე სპირტის დამატება იწვევდა რაღაც ნივთიერების წარმოქმნას, რომელსაც გააჩნდა სახამებლის შაქრად გარდაქმნის უნარი. ამ ნივთიერებას, რომელიც ახლა ცნობილია როგორც ფერმენტი ამილაზა, ავთორებმა უწოდეს დიასტაზა. იგი პერძნული სიტყვაა და ნიშნავს ვანცალკეევბას. გარკვეული დროის განმავლობაში ყველა ფერმენტის საერთო სახელწოდება იყო დიასტაზა, რის გამოც 1898 წელს ლ. პასტერის მოწაფემ ემილ დუკლომ წინადადება წამოაყენა დიასტაზას ბოლო სამი ასო ე. ი. — აზა მიემატებინათ სუბსტრატის (ნივთიერება, რომელზეც მოქმედებს ფერმენტი. ტერმინი შემოტანილია გერმანელი მეცნიერების მიერ) სახელის ფუძისათვის. არის გამონაკლისიც, როდესაც ფერმენტის სახელწოდება მთავრდება სუფიქსით „ინი“, მაგალითად პეპსინი, ტრიპსინი.

ფერმენტთა სახელწოდებებზე, მათ წარმოების წესსა და კლასიფიკაციაზე ცალკე იქნება საუბარი. აქ აღვნიშნავთ მხოლოდ,

რომ ფერმენტთა ტრივიალურ სახელწოდებებს, რომლებიც ამჟამად იხმარება, საფუძველი ე. დუკლომ ჩაუყარა.

ბიოქიმიკოსის გაგებით სიცოცხლეს საფუძვლად უდევს დროსა და სივრცეში კოორდინირებული ქიმიური რეაქციების თანმიმდევრობა. ამ ქიმიური რეაქციების სიჩქარეები და წარმოქმნილ ნივთიერებათა ბუნება დამოკიდებულია იმ კატალიზატორების (ფერმენტების) თვისებებზე, რომლებსაც გამოიმუშავენ ცოცხალი სისტემები. ფერმენტები მიეკუთვნებიან ნივთიერებათა იმ კლასს, რომელსაც ცილები ეწოდება. ყველა ფერმენტი ცილაა, მაგრამ ყველა ცილა ფერმენტი არ არის, ე. ი. არა აქვს კატალიზატორის თვისება ანუ კატალიზის უნარი. ასე მაგალითად, ჰემოგლობინი სისხლში აწარმოებს ჟანგბადის ტრანსპორტირებას, მიოზინის საშუალებით წარმოებს კუნთის შეკუმშვა და, ბოლოს, ცილა უჭრედის ორგანოიდების ძირითადი საშენი მასალაა.

ცნობილია, რომ ცილები წარმოადგენენ მაღალმოლეკულურ პოლიმერებს, რომლებშიც ამინომჟავები ერთმანეთთან დაკავშირებული არიან გარკვეული თანმიმდევრობით პეპტიდური ბმების საშუალებით.

ფერმენტის მოლეკულაში ამინომჟავათა თანმიმდევრობა განაპირობებს ფერმენტებს შორის განსხვავებას და აქედან გამომდინარე მათ მიერ კატალიზირებულ რეაქციათა ხასიათს.

ფერმენტების აღნაგობა

პირველადი სტრუქტურა

სხვადასხვა ცილის მოლეკულები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან როგორც ამინომჟავათა რიცხვითა და შედგენილობით, ისე დაკავშირების თანმიმდევრობით. ორი ამინომჟავისაგან შემდგარ პეპტიდს დიპეპტიდი ეწოდება, სამი ამინომჟავისაგან შემდგარს — ტრიპეპტიდი და ა. შ. მრავალი ამინომჟავისაგან შემდგარ პეპტიდს ზოგადად პოლიპეპტიდი ეწოდება. პოლიპეპტიდს ერთ ბოლოზე გააჩნია ამინოჯგუფი და ამიტომ ასეთ ბოლოს N-ბოლო ეწოდება, მეორე ბოლოზე კი კარბოქსილის ჯგუფი და მას C-ბოლო ეწოდება. ამინომჟავების ის ნაწილები, რომლებიც არ მონაწილეობენ პეპტიდური ბმის წარმოქმნაში, ქმნიან გვერდით ჯაჭვებს, რომლებიც განაპირობებენ ცილის ამა თუ იმ ფიზიკურ და ქიმიურ თვისებებს, რის გამოც მათ ფუნქციურ ჯგუფებს უწოდებენ. ცილის მოლეკულების ძირითადი თვისებები განისაზღვრება ამინომჟავების შედგენილობითა და მათი დაკავშირების თანმიმდევრობით. აქედან გამომდინარე, ცილის პირველადი სტრუქტურა ეს არის ამინომჟავათა შედგენილობა და პოლიპეპტიდურ ჯაჭვში მათი დაკავშირების თანმიმდევრობა. პირველად ამინომჟავური თანმიმდევრობა გაშიფრულ იქნა ფ. სენჯერის მიერ 1951 წ. ცილური ჰორმონის ინსულინის მაგალითზე. ამ სამუშაოსათვის მას მიენიჭა ნობელის პრემია. ამჟამად გაშიფრულია მრავალი ცილისა და ფერმენტის პირველადი სტრუქტურა, მაგალითად რიბონუკლეაზის, ლიზოციმის, ქიმოტროპსინოგენის, ტრიპსინოგენის, პაპაინის, მიოგლობინის, ჰემოგლობინის, ციტოქრომ c-ს, ასპარტატ-ამინოტრანსფერაზისა და სხვა.

პოლიპეპტიდურ ჯაჭვებში ამინომჟავათა დაკავშირებისა და მონაცვლეობის რიგი ძალზე სპეციფიკურია. არ არსებობს აბსოლუტურად მსგავსი თანმიმდევრობა თვისებებით ახლოს მდგომ ცილებ-

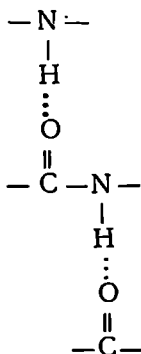
შიაც კი. თუმცა ზოგიერთ შემთხვევაში შესაძლებელია ცალკეული უბნების ამინომჟავათა თანმიმდევრობის დამთხვევა.

ამინომჟავათა თითოეულ ფუნქციურ ჯგუფს გარკვეული წვლილი შეაქვს ცილის თუ ფერმენტის ამა თუ იმ თვისების გამოვლინებაში.

ბიოლოგიური სტრუქტურა

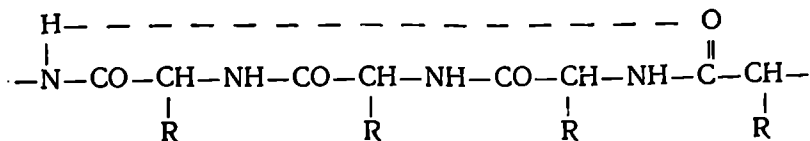
პოლიპეტიდური ჯაჭვების მნიშვნელოვან თვისებას წარმოადგენს ის გარემოება, რომ მათ გააჩნიათ ჯაჭვის გასწვრივ ურთიერთდაკავშირების უნარი და ამავე დროს წარმოქმნიან მრავალ წყალბადურ ბმას თვით ერთი პოლიპეტიდური ჯაჭვის ფარგლებში, რასაც მოსდევს ჯაჭვის თავისუფალი ენერგიის შემცირება და მისი სტაბილობის გაზრდა.

წყალბადური ბმა წარმოიშევა კარბონილის ჯგუფის ქანვბადა და ამიდის ჯგუფის წყალბადს შორის.



გასაგებია, რომ ასეთი ბმის წარმოსაქმნელად საჭიროა პოლიპეტიდური ჯაჭვის გარკვეული კონფორმაცია. ასეთი კონფორმაციები შეიძლება იყოს ორი ტიპის — სპირალური და ნაკეცენოვანი.

პეტიდური ბმის წარმოქმნელ — CO და — NH ჯგუფებს შეუძლიათ წარმოქმნან ორი წყალბადური ბმა სხვა ჯგუფებთან, რის შედეგადაც მიიღება ე. წ. α-სპირალი, რომელშიც თითოეული პეტიდური ბმა დაკავშირებულია წყალბადური ბმით მისგან მესამე, პეტიდურ ბმასთან.



უნდა აღინიშნოს, რომ გლობულარული ცილის კონფორმაცია განსხვავდება ჩვეულებრივი რეგულარული α -სპირალური სტრუქტურისაგან, რადგან ცილის მოლეკულაში გვხვდება დისულფიდური ბმები და პროლინის ნაშთები, რომლებიც აზღვევენ სპირალურ შენებას და ცვლიან ჯაჭვის ორიენტაციას.

ამგვარად, წყალბადური ბმების არსებობის გამო პოლიპეპტიდური ჯაჭვი იღებს სპირალურ სახეს. აქედან გამომდინარე ცილია მეორადი სტრუქტურის ქვეშ იგულისხმება ცილის მოლეკულის სპირალური სტრუქტურა, რომელსაც ხშირად α -სტრუქტურას უწოდებენ. ცილის მოლეკულაში α -სტრუქტურის არსებობა დამტკიცებული იყო ამერიკელი მეცნიერების ლ. პოლინგისა და მისი თანამშრომლის რ. კორის მიერ.

უნდა აღინიშნოს, რომ სხვადასხვა ცილის მოლეკულები ხასიათდებიან სპირალიზაციის სხვადასხვა ხარისხით. ასე მაგალითად, ლიზოციმის მოლეკულაში პოლიპეპტიდური ჯაჭვი სპირალიზებულია α -სტრუქტურის სახით 42%-ით. ზოგიერთში სპირალიზაციის ხარისხი ძალზე ნაკლებია 5—10%. არსებობს რამდენიმე მეთოდი, რომელთა საშუალებით ბდება სპირალიზაციის ხარისხის დადგენა. მათ შორის უპირატესობა ენიჭება ელექტრონული მიკროსკოპიისა და ოპტიკური ბრუნვის დისპერსიის მეთოდებს და, რა თქმა უნდა, რენტგენოსტრუქტურულ ანალიზს.

გარდა α -სტრუქტურისა ცნობილია β -სტრუქტურაც.

თუ α -სპირალი მიიღება შიდამოლეკულური წყალბადური ბმების საშუალებით, β -სტრუქტურა წარმოიქმნება მოლეკულებს შორის წყალბადური ბმებით, ე. ი. ორი მეზობელი პოლიპეპტიდური ჯაჭვი ქმნის β -სტრუქტურას. მას მეორენაირად ნაკეცფენოვან სტრუქტურას უწოდებენ.

მესამეული სტრუქტურა

ისმის კითხვა, გააჩნია თუ არა თვით პოლიპეპტიდურ სპირალს დახვევის, დაგრაგნის უნარი ანუ უფრო მაღალი რიგის სტრუქტურა. მრავალრიცხოვანი გამოკვლევებით დამტკიცებულია, რომ ნატივეური ცილის მოლეკულებს გააჩნიათ კომპაქტური სტრუქტურა.

რა, რომელსაც სივრცეში გარკვეული კონფიგურაცია შეესაბამება. ე. ი. ცილას გააჩნია ძალზე სპეციფიკური სამგანზომილებიანი სტრუქტურა. ცილის ასეთი სამგანზომილებიანი სტრუქტურა ცნობილია როგორც ცილის მოლეკულის მესამეული სტრუქტურა. ის სტაბილიზირებულია ისეთი ბმებით, როგორიცაა დისულფიდური და წყალბადური ბმები, ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედებანი, ჰიდროფობური ურთიერთქმედებანი, ვან-დერ-ვაალსის ძალები და სხვა. როგორც ჩანს მესამეული სტრუქტურის ჩამოყალიბებაში მონაწილეობას ღებულობენ პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ამინომჟავების გვერდითი რადიკალები და არა თვით პოლიპეპტიდური ჩონჩხი. მართალია ბმის ეს სახეები, დისულფიდური ბმის გარდა სუსტია, მაგრამ დიდი სიმრავლისა და ერთდროული მოქმედების გამო შენარჩუნებულია ცილის მოლეკულის საკმაოდ მაღალი მდგრადობა.

ამჟამად მრავალი მკვლევარის აზრით მესამეული სტრუქტურის შენარჩუნებაში ჰიდროფობურ ურთიერთქმედებებს მეტი უპირატესობა ენიჭებათ ვიდრე წყალბადურ ბმებს. გლობულის წარმოქმნას პოლიპეპტიდური ჯაჭვები ცდილობენ მიიღონ ისეთი კონფორმაცია, რომ ჰიდროფილური ამინომჟავები (სერინი, ტიროზინი, გლუტამინის მჟავა, ლიზინი და ა. შ). მიმართული იყოს წყლის გარემოცვისაკენ, ხოლო ჰიდროფობური-წყლის საწინააღმდეგოდ, ე. ი. მოლეკულის შიგნით. ამის გამო ცილის მოლეკულის ზედაპირზე ჩვეულებრივ ვხვდებით ჰიდროფილურ ჯგუფებს, ხოლო შიგნით — ჰიდროფობურს. ასეთი განლაგება ენერგეტიკულად ხელსაყრელია, რადგან შეესაბამება მოლეკულის თავისუფალი ენერგიის მინიმუმს.

უნდა აღინიშნოს, რომ ნებისმიერი ცილის მეორადი და მესამეული სტრუქტურა დეტერმინირებულია (განპირობებულია) ცილის პირველადი სტრუქტურით.

პირველი ცილები, რომელთა მესამეული სტრუქტურა გაშიფრულ იქნა, არის მيوგლობინი (გ. კენდრიუ, 1957) და ჰემოგლობინი (მ. პერუტცი, 1959).

მეოთხეული სტრუქტურა

მრავალი ცილისა და ფერმენტის მოლეკულა შედგება რამდენიმე ინდივიდუალური პოლიპეპტიდური ჯაჭვისაგან, რომლებიც არ არიან ერთმანეთთან კოვალენტურად დაკავშირებული. ასეთი ცილის კლასიკურ მაგალითს წარმოადგენს ჰემოგლობინი. მისი მოლეკულა შედგება ოთხი პოლიპეპტიდური ჯაჭვისაგან — 2 α — და

2ჟ. — ჯაჰვისაგან, რომელთა პირველადი სტრუქტურები განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. თითოეული პოლიპეპტიდური ჯაჰვი დაკავშირებულია რკინის ატომთან, რომელიც მოთავსებულია ჰემის ცენტრში.

ასეთი ცილების შესახებ ამბობენ, რომ მათ გააჩნიათ მეოთხეული სტრუქტურა. აღსანიშნავია, რომ თითოეულ პოლიპეპტიდურ ჯაჰვს, რომელსაც სუბერთეული ეწოდება, გააჩნია თავისი პირველადი, მეორადი და მესამეული სტრუქტურები. ორი პოლიპეპტიდური ჯაჰვისაგან შემდგარ ცილის მოლეკულას დიმერი ეწოდება, სამისაგან შემდგარს — ტრიმერი, ოთხისაგან — ტეტრამერი. ზოგადად მეოთხეული სტრუქტურის მქონე ცილის მოლეკულებს ოლიგომერი ეწოდებათ, ცალკეულ სუბერთეულს კი მონომერი. ოლიგომერებს აქვთ უნარი გარკვეული ზემოქმედებისას განიცადონ დისოციაცია სუბერთეულებად.

განვიხილოთ ფერმენტ გლუტამატდეჰიდროგენაზის მეოთხეული სტრუქტურა. მისი მოლეკულური მასა დაახლოებით 1 მილიონის ტოლია. მისი დისოციაციის შედეგად მიიღებიან სუბერთეულები მოლეკულური მასით 250000. ეს მეტყველებს იმაზე, რომ ფერმენტი წარმოადგენს ტეტრამერს.

წონასწორობა ტეტრამერი — მონომერი ადვილად მყარდება და მთლიანად შექცევადია. მაგრამ აქ მნიშვნელოვანია ის გარემოება, რომ ტეტრამერული ფორმა ხასიათდება გლუტამატდეჰიდროგენაზული აქტივობით, ხოლო მონომერული ფორმა ალანინდეჰიდროგენაზული აქტივობით. ამ მაგალითიდან ნათლად ჩანს თუ რა დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მეოთხეულ სტრუქტურას ფერმენტული აქტივობისა და სპეციფიკურობის საკითხში, ე. ი. ნათლად ძეღავნდება კავშირი სტრუქტურასა და ფუნქციას შორის.

მეოთხეული სტრუქტურის მქონე ფერმენტების სუბერთეულებად დისოციაცია ხდება ისეთი აგენტების საშუალებით, როგორიცაა 6 M გუანიდინქლორიდი, 8 M შარდოვანა, pH 2-ის მქონე ლიმონის მჟავა, Na-ის დოდეცილსულფატი და ა. შ. ამ აგენტების მოცილებისას ან განზავებისას ხშირ შემთხვევაში ადგილი აქვს რეასოციაციას ფერმენტული აქტივობის სრული (ან ნაწილობრივი) აღდგენით. ცხადია ამ დროს აღსდგება საწყისი სტრუქტურა. ხშირად ფერმენტულ აქტივობას ამჟღავნებს ოლიგომერი, ხოლო სუბერთეულები არააქტიურნი არიან. ზოგჯერ ხდება პირიქითაც — ფერმენტული აქტივობა ახასიათებთ მონომერებს. თუ თითოეული სუბერთეული ამჟღავნებს აქტივობას, ეს ნიშნავს, რომ თითოეული მათგანი უნდა შეიცავდეს ერთ აქტიურ ცენტრს მაინც. თუ სუბერ-

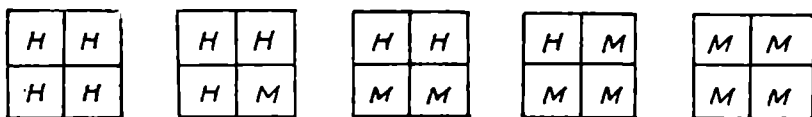
თელს არ გააჩნია აქტივობა, საფიქრებელია, რომ აქტიური ცენტრი შექმნილია ორი ან მეტი სუბერთეულისაგან და მათი დისოციაციისას ბუნებრივია აქტიური ცენტრი დაირღვევა.

ფერმენტების მოლეკულებში სუბერთეულების არსებობა საშუალებას იძლევა აიხსნას ის გარემოება, თუ რატომაა, რომ ზოგიერთ განსხვავებულ ცილებს გააჩნიათ ერთი სახის აქტივობა.

მაგალითად ცნობილია, რომ ლაქტატდეჰიდროგენაზა, რომელიც იწვევს რძის მჟავას დაქანგვას პიროუფორმის მჟავად, ელექტროფორების შედეგად იძლევა ცილის 5 ზოლს და ხუთივეს გააჩნია ლაქტატდეჰიდროგენაზული აქტივობა.

აღმოჩნდა, რომ ლაქტატდეჰიდროგენაზა მოლეკულური მასით 125000 შედგება ოთხი სუბერთეულისაგან (მოლეკულური მასაა 34000), რომელთაგან თითოეული არააქტიურია. ისინი ამინომჟავური შედგენილობით შეესაბამებიან ორ განსხვავებულ პოლიპეტიდურ ჯაჭვს. თითოეულ ამ სუბერთეულს გააჩნია სხვა სუბერთეულებთან ასოციაციის უნარი აქტიური ტეტრამერის წარმოქმნით.

ცხადია, ორი სხვადასხვა ტიპის სუბერთეულის კომბინირებით მიიღება ტეტრამერის 5 ვარიანტი (სურ. 1). ერთი ტიპის სუბერთეულები ჭარბობენ გულის ქსოვილში და აღინიშნებიან II-ით (Heart-გული); მეორე ტიპის სუბერთეულები კი ჭარბობენ კუნთის ქსოვილში და აღინიშნებიან M-ით (Muscle—კუნთი).

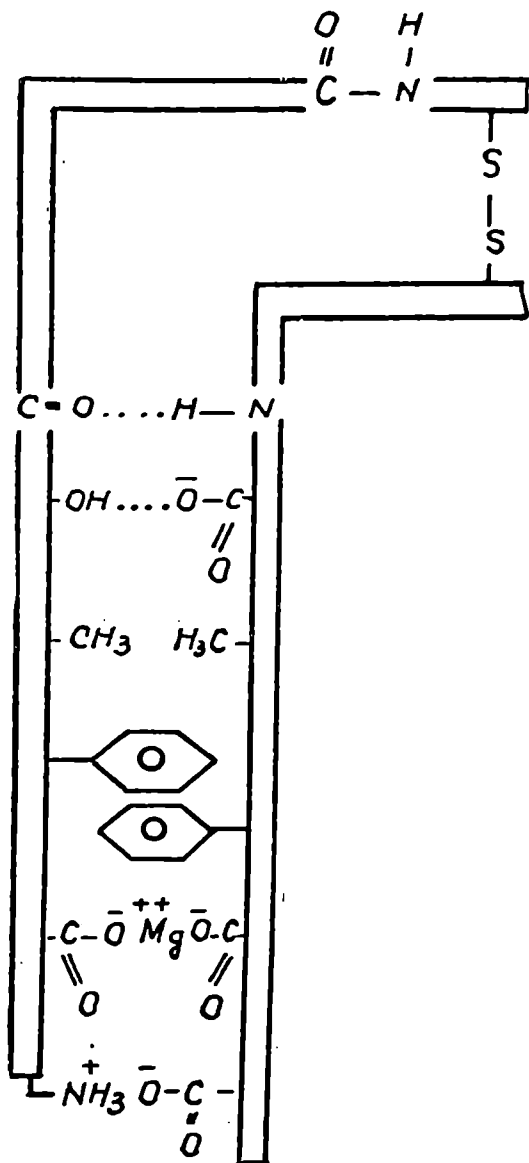


სურ. 1. ლაქტატდეჰიდროგენაზის იზოფერმენტების სქემატური გამოსახულება.

სხვადასხვა ქსოვილებში ამ 5 იზოფერმენტის რაოდენობრივი განაწილება არაერთნაირია.

აქედან გამომდინარე, ისეთ ფერმენტებს, რომლებიც განსხვავდებიან შედგენილობით (აგებულებით), მაგრამ ხასიათდებიან ერთი და იგივე აქტივობით, იზოფერმენტები (იზოენზიმები, იზოზიმები) ეწოდებათ.

ამგვარად, ცილის, ფერმენტის მოლეკულის სტრუქტურული ორგანიზაცია ხორციელდება მოლეკულებშიდა და მოლეკულებს შორისი ურთიერთქმედების სხვადასხვა ბმებისა და ძალების საშუალებით.



სურ. 2. ცილის სტრუქტურის შექმნაში
 მონაწილე ბმების სქემატური
 გამოსახულება.

პირველადი სტრუქტურა მთლიანად განპირობებულია კოვალენტური ბმებით, მეორადი—წყალბადური ბმებით, მესამეული—დისულფიდური ხიდაკებით, წყალბადური ბმებით და ჰიდროფობური ურთიერთქმედებებით, მეოთხეული — წყალბადური ბმებით, ჰიდროფობური ურთიერთქმედებებითა და ვან-დერ-ვაალსის ძალებით.

მე-2 სურათზე მოცემულია ბმების იმ სახეების სქემატურა, გამოსახულება, რომლებიც მონაწილეობენ ცილის სტრუქტურის შექმნაში.

ცილის-ფერმენტის ნატიური კონფორმაციის ისეთ დარღვევას, რომელსაც თან არ სდევს კოვალენტური ბმების დაწყვეტა, ეწოდება დენატურაცია. ფერმენტის დენატურაციის შედეგად ირღვევა მისი მეორადი, მესამეული და მეოთხეული სტრუქტურა, რასაც ხშირად თან სდევს ფერმენტული აქტივობის დაკარგვა. აქედან ცხადია, რომ ფერმენტული აქტივობის გამოვლენისათვის დიდი მნიშვნელობა აქვს მაღალი რიგის სტრუქტურებს.

აბიური ცენტრი

ფერმენტების კატალიზური თვისებები დამოკიდებულია მის ალნაგობაზე, მაგრამ მიუხედავად ამისა ფერმენტის მთლიანი მოლუკულა უმუშალო მონაწილეობას კატალიზში არ იღებს. კატალიზური უნარი დაკავშირებულია ფერმენტის რომელიმე უბანთან, რომელიც შეიძლება შედგებოდეს მხოლოდ ერთი გარკვეული ქიმიური დაჯგუფებისაგან, ანდა უბანთან, რომელიც წარმოადგენს შედარებით გრძელ ჯაჭვს. უკანასკნელის აქტივობა დამოკიდებულია პოლიპეტიდურ ჯაჭვში შემავალი ცალკეული ამინომჟავების შედგენილობასა და თანმიმდევრობაზე. ამგვარ ამინომჟავათა დაჯგუფებას აქტიური ცენტრი ეწოდება. დღეისათვის ცნობილია აქტიური ცენტრების სამი ტიპი: პირველს მიეკუთვნება ისეთი ტიპის აქტიური ცენტრები, რომლებიც შედგება ერთი ან რამდენიმე ამინომჟავათა ჯგუფისაგან, რომლებიც ურთიერთ დაკავშირებული არიან პეპტიდური ბმებით. მეორე ტიპის აქტიურ ცენტრებში მეტალის იონი დაკავშირებულია ცილის მოლეკულასთან, მეტალის მოშორების შემთხვევაში ამ ტიპის ფერმენტები კარგავენ მათთვის სპეციფიკური რეაქციის კატალიზის უნარს. და ბოლოს, მესამე ტიპის აქტიური ცენტრები შეიცავენ კოვალენტური ბმით დაკავშირებულ კოფაქტორს პროსთეტული ჯგუფის სახით.

როგორც წესი, ფერმენტები სუბსტრატს უკავშირდებიან აჟ-

ტიურ ცენტრში წარმოდგენილ სარეაქციო ჯგუფის, ანდა გარკვეული სტრუქტურის მქონე დაჯგუფების საშუალებით და შემდეგ ადგილი აქვს დამახასიათებელ ქიმიურ გარდაქმნას. მაგრამ აღმოჩნდა, რომ აქტიურ ცენტრს შესწევს უნარი დაუკავშირდეს არა მარტო სუბსტრატს, არამედ აქტივატორებს, ინჰიბიტორებსა და კოფერმენტებს. ყოველივე ეს ნათელი გახდება თუ წარმოვიდგენთ, რომ აქტიურ ცენტრს გააჩნია რამდენიმე უბანი, რომელთა საშუალებითაც იგი უკავშირდება ყველა ზემოთ ჩამოთვლილ ნაერთს.

ყველა დღემდე შესწავლილი ფერმენტის მაგალითზე დადგენილია, რომ აქტიური ცენტრი წარმოადგენს ფერმენტის გლობულის მცირეოდენ ნაწილს და რომ ფერმენტის დანარჩენი ნაწილი კატალიზში მონაწილეობას არ იღებს. რა თქმა უნდა აქედან იმ დასკვნის გამოტანა, რომ ფერმენტს ეს ნაწილი საერთოდ არ ჰქონდა და ის წარმოადგენს ბალასტს, არ შეიძლება. ფერმენტების სტაბილობის თვალსაზრისით ფერმენტის გლობულის ის ნაწილი, რომელიც აქტიურ ცენტრში არ შედის, დიდ როლს თამაშობს pII-ისა და ტემპერატურის კრიტიკული მნიშვნელობის, პროტეოლიზური ზემოქმედების, დეტერგენტების და სხვა სახის ზეგავლენის მიმართ.

მთელი რიგი ფერმენტებისათვის ექსპერიმენტულად და თეორიულად შესწავლილია აქტიური ცენტრის მიერ დაკავებული ფართობი. ასე ოდესტიენმა ტრიპსინის დასხივების შედეგად დაამტკიცა, რომ მისი აქტიური ცენტრი შეადგენს მხოლოდ ფერმენტის გლობულის ფართობის 2,5%-ს. საერთოდ უნდა ვივარაუდოთ, რომ თუ ფერმენტის მოლეკულური მასა 20000-ია, მისი საერთო ფართობი 4050 Å² შეადგენს, ხოლო აქტიურ ცენტრს 100 Å²-მდე ფართობი უკავია, რაც შეესაბამება 4 ამინომჟავას ნაშთს.

აქტიური ცენტრის ფუნქციონირებაზე დიდ გავლენას ახდენენ მასში უშუალოდ არშემავალი, მაგრამ მის გარემოცვაში მდებარე ფერმენტის ცალკეული ქიმიური ჯგუფები ელექტროსტატიკური და სივრცითი ეფექტებით. ცილის ქიმიაში არსებული სპეციალური მეთოდებით ზოგიერთი ფერმენტიდან (პეპსინი, რიბონუკლეაზა, ალდოლაზა, პაპაინი, ტრიპსინი და სხვა) გამოყოფილია მასში მდებარე აქტიური ფრაგმენტები, რომლებიც წარმოადგენენ მთლიანი მოლეკულის მცირეოდენ ნაწილს. მაგალითად, თუ რიბონუკლეაზის მოლეკულას მოშორდება პირველი ოცი ამინომჟავასაგან შემდგარი ფრაგმენტი ფერმენტის აქტივობა არ შეიცვლება. მეორეს მხრივ, ამ ფერმენტს გააჩნია ორი ჰისტიდინის ნაშთი: პირველი

მეთორმეტე მდგომარეობაში, მეორე კი 119-ე მდგომარეობაში და თუ ეს ნაშთები მონოიოდაცეტატით იქნებიან ბლოკირებული, ფერმენტ-მთლიანად კარგავს აქტივობას. ეს ფაქტი პირველ რიგში იმაზე მიუთითებს, რომ ჰისტიდინის ორივე ნაშთი შედის აქტიური ცენტრის შემადგენლობაში და იმაზეც, რომ მიუხედავად იმისა, რომ ეს ნაშთები განაწილებულია რიბონუკლეაზის საწინააღმდეგო ბოლოებში, ეს ბოლოები ორიენტირებულნი არიან ერთმანეთის მიმართულებით. ამიტომ ისინი დაახლოებული არიან და შედიან აქტიურ ცენტრში.

ზოგიერთ შემთხვევაში ფერმენტის კატალიზური თვისებები დაზოკიდებულია მთელი მოლეკულის ნატივობაზე. მაგალითად ლიზოციმში, რომელიც ახორციელებს მუკოპეპტიდებში ეთერის ბმის ჰიდროლიზს, თუ ბლოკირებული იქნება ტრიპტოფანი, ფერმენტი კარგავს აქტივობას. ასევე ინაქტივირდება ლიზოციმი დისულფიდური ბმების აღდგენის შემთხვევაშიც. თუკი ჰაერის ჟანგბადის წევავლენით ის კვლავ დაიჟანგება — S—S—ბმის წარმოშობამდე ფერმენტის აქტივობა მთლიანად აღდგება. იოდით არომატული ამინომჟავების ბლოკირების შემთხვევაში ლიზოციმს დამახასიათებელი აქტივობა ეკარგება. და ბოლოს, თუ ფერმენტი დამუშავდება შარდოვანით, რომელიც წყვეტს წყალბადურ ბმებს და იწვევს მოლეკულის დეზაგრეგაციას, ლიზოციმი მთლიანად კარგავს აქტივობას. მოყვანილი მაგალითები იმაზე მიუთითებს, რომ ლიზოციმის დამახასიათებელი აქტივობის გამოვლენაში გადამწყვეტი როლი მიუძღვის არა რომელიმე ერთ ქიმიურ ჯგუფს ან დაჯგუფებას, არამედ მთელი ფერმენტის ორგანიზაციას. რა თქმა უნდა, აქედან გამომდინარე, არ უნდა ვიფიქროთ, რომ ლიზოციმს არ გააჩნია აქტიური ცენტრი, ან მთელი მოლეკულა წარმოადგენს აქტიურ ცენტრს. საქმე იმაშია, რომ ლიზოციმი, როგორც ყველა სხვა ფერმენტი, უკავშირდება სუბსტრატის გარკვეულ სარეაქციო ჯგუფს აქტიური ცენტრის საშუალებით, მაგრამ სარეაქციო ჯგუფის გარემოცვაში მყოფი სხვა დაჯგუფებები გავლენას ახდენენ მის კატალიზურ თვისებებზე და მათი ქიმიური ან სტერიული მოდიფიკაცია იწვევს ამ ფერმენტის აქტივობის დაკარგვას.

ზოგი ფერმენტი თავის აქტიურ ცენტრში შეიცავს SH—სარეაქციო ჯგუფებს. ასეთებია თითქმის ყველა შესწავლილი დეჰიდროგენაზები, პროტეაზების უმეტესობა და მთელი რიგი სხვა ფერმენტები. ამ ჯგუფების მონაწილეობა კატალიზის აქტში ადვილი დასამტკიცებელია. ამისათვის ფერმენტის ხსნარს ემატება მხოლოდ SH—

ჯგუფებისათვის სპეციფიკური ქიმიური რეაგენტები, როგორცაა პ-ქლორმერკურიბენზოატი, 5,5-დითიობისნიტრობენზოის მჟავა, მონოიოდაცეტატი და სხვა. თუ ფერმენტის აქტივობა საგრძნობლად მცირდება ან საერთოდ იკარგება, შეიძლება ექვსგარეშე დადასტურდეს ამ ჯგუფის მონაწილეობა აქტიურ ცენტრში.

უკანასკნელ ხანებში მეტად საინტერესო მონაცემებია მიღებული ევრეთწოდებული სერინული ფერმენტების შესწავლისას. ფტორფოსფატების გამოყენებამ, კერძოდ კი დიიზოპროპილფტორფოსფატმა (დფფ) შესაძლებელი გახადა იმ ფაქტის დამტკიცება, რომ დფფ-ი სპეციფიკურად უკავშირდება სერინის ჰიდროქსილის ჯგუფს, რის გამოც მთელი რიგი ფერმენტები განიცდიან უკუქცევად დენატურაციას. ამ ფერმენტებს მიეკუთვნებიან ტრიპსინი, ქიმოტრიპსინი, ტრომბინი, პანკრეატოპეპტიდაზა, ტუტე ფოსფატაზა, ფოსფოგლუკომუტაზა და სხვა. როგორც მოყვანილი მაგალითებიდან ჩანს, მოქმედების მექანიზმით ერთმანეთისაგან სრულიად განსხვავებული ფერმენტები ინჰიბირდებიან სერინის ოქსი ჯგუფის ზოლიფიცირების გამო.

სხვადასხვა მეთოდებით დამტკიცებულია, რომ ფერმენტების აქტიურ ცენტრებში შედიან ცისტეინის SH, ლიზინის NH₂, სერინის ჰიდროქსილის, ჰისტიდინის იმიდაზოლური, ტიროზინის ფენოლური ჯგუფები და სხვა.

ამგვარად, ფერმენტების ფუნქციური ჯგუფების შესწავლა ქიმიური და ფიზიკური მეთოდებით და შემდეგ ამ მონაცემების დაკავშირება პირველად, მეორად და მესამეულ სტრუქტურებთან წარმოდგენას იძლევა აქტიური ცენტრის იმ უბანზე, რომლის საშუალებითაც ესა თუ ის ცილა-ფერმენტი აწარმოებს მისთვის დამახასიათებელ ძირითად ფუნქციურ აქტს — კატალიზს.

ლიტერატურა

1. Ашмарин И. П., Мюльберг А. А., Садикова Н. В., Сытинский И. А., Химия белка, часть I, Изд. Ленинградского Университета, 1968.
2. Бернхард С., Структура и функция ферментов, М., «Мир», 1971.
3. Гаурович Ф., Химия и функции белков, М., «Мир», 1965.
4. Кретович В. Л., Введение в энзимологию, М., «Мир», 1974.
5. Уэстли Дж., Ферментативный катализ, М., «Мир», 1972.

ფერმენტების კოფერმენტები და კოფაქტორები

ფერმენტები იყოფიან მარტივ და რთულ ფერმენტებად. მარტივი ფერმენტები შედგებიან მხოლოდ ცილოვანი კომპონენტისაგან, რთული კი ცილისა და მასთან დაკავშირებული არაცილოვანი ზუნების ორგანული ნაერთისაგან, რომლის მონაწილეობა აუცილებელია ფერმენტის აქტიური მოქმედებისათვის.

ფერმენტის ცილოვან ნაწილს აპოფერმენტი ეწოდება, არაცილოვან ნაწილს კი კოფერმენტი. თუ კოფერმენტი შედარებით მკიდროდაა დაკავშირებული აპოფერმენტთან მას სხვანაირად პროსთეტულ ჯგუფს უწოდებენ.

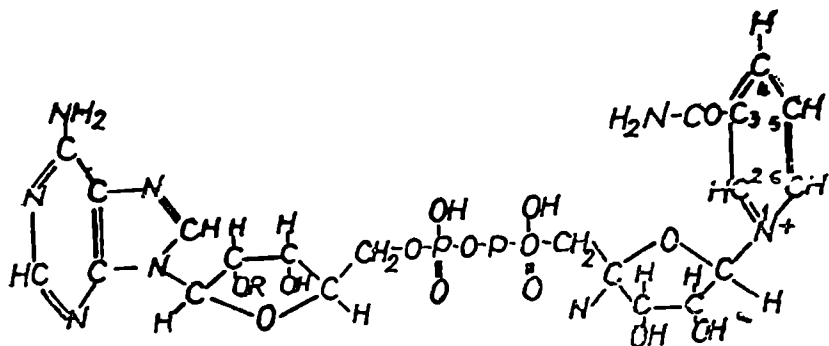
ფერმენტული რეაქციის შედეგად კოფერმენტები არ განიცდიან გარდაქმნებს, მაგრამ ზოგიერთ კონკრეტულ შემთხვევაში კოფერმენტი შეიძლება განვიხილოთ როგორც სუბსტრატი. მაგალითად. ცალკეული დეჰიდროგენაზების მოქმედების დროს კოფერმენტები ნად- H_2 , ნადფ- H_2 წარმოადგენენ წყალბადის წყაროებს. მაგრამ როცა თანმიმდევრობითი რეაქციებისაგან შემდგარ სისტემაში კოფერმენტი უბრუნდება თავის პირვანდელ მდგომარეობას და ამდენად იგი არ შეიძლება განვიხილოთ იქნეს როგორც სუბსტრატი.

კოფერმენტები — უმრავლეს შემთხვევაში ვიტამინები ან მათი ნაწარმებია. სწორედ ამის გამოა, რომ ვიტამინები უდიდეს როლს ასრულებენ ცოცხალი ორგანიზმის ნორმალურ ფუნქციონირებაში.

განვიხილოთ უმთავრესი კოფერმენტების ზოგიერთი წარმომადგენელი.

ნიკოტინამიდადენინინუკლეოტიდი (ნად-ი) და
ნიკოტინამიდადენინინუკლეოტიდფოსფატი (ნადფ-ი)

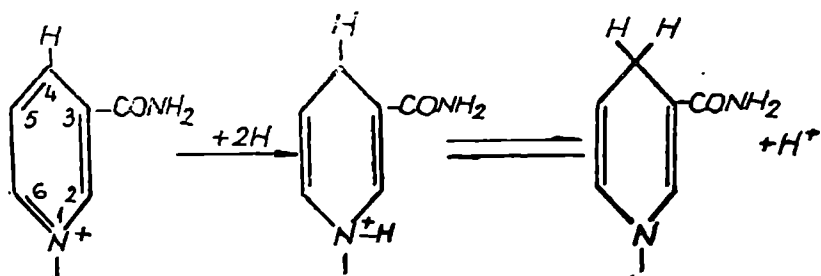
ნად-ი და ნადფ-ი მიეკუთვნებიან პირიდინის ჯგუფის კოფერმენტებს. მათი სტრუქტურული ფორმულები ასეთნაირად გამოიხატება.



R-აღნიშნავს H-ს ნაღ-ის და $PO(OH)_2$ -ს ნაღ-ის შემთხვევაში. ფორმულები მოცემულია დაქანვულ ფორმებისათვის.

ამ კოფერმენტებს აქტიურ ნაწილს წარმოადგენს ნიკოტინის მკეფას ამიდი — ნიკოტინამიდი. ნიკოტინამიდის საშუალებით ხდება მთლიანად ნაღ-ისა და ნაღ-ის დაქანვვა და აღდგენა. ნაღ-ი ნაღ-ისაგან მხოლოდ იმით განსხვავდება, რომ იგი დამატებით შეიცავს ერთ ფოსფატის ჯგუფს. კოფერმენტის მოლეკულის დანარჩენი ნაწილი, როგორც ჩანს, საკიროა იმისათვის, რომ ფერმენტმა იცნოს იგი. მართლაც ზოგიერთი ფერმენტი იჩენს მკაცრ სპეციფიკურობას ერთი ან მეორე კოფერმენტის მიმართ.

სქემატურად ნიკოტინამიდის (ე. ი. ნაღ-ისა და ნაღ-ის) აღდგენა შეიძლება ასე წარმოვიდგინოთ:



დამტკიცებულია, რომ აღდგენა ხდება 1,4 მდგომარეობაში, ამასთანავე უნდა აღინიშნოს, რომ C-4 მდგომარეობაში H^+ მიერთება წარმოებს აბსოლუტური სტერეოსპეციფიკურობით.

ნაღ-ი და ნაღ-ი ადვილად განიცდიან აღდგენას როგორც ფერმენტული გზით, ისე ქიმიური აღმდგენლებით, მაგალითად ჰიდ-

როსულფიტით. აღდგენისას ხდება მათი სპექტრის დამახასიათებელი შეცვლა (სურ. 36). 340 ნანომეტრზე შთანთქმას განაპირობებს აღდგენილი ნიკოტინამიდის ბირთვის ქინოიდური სტრუქტურა.

ნად-ისა და ნადფ-ის აღდგენილი ფორმები აღვილად იქანგებიან დეჰიდროგენაზებით, ციტოქრომებით შესაბამისი ციტოქრომრედუქტაზების თანაობისას, H_2O_2 -ით სპეციფიკური პეროქსიდაზების თანაობისას და ქინონებით, ფენაზინებითა და ა. შ. აღდგენილი ფორმა უკიდურესად არამდგრადია მჟავე და შედარებით მდგრადია ტუტე არეში, ხოლო დაჟანგული ფორმა პირიქით, მდგრადია მჟავე არეში და არამდგრადია ტუტე არეში. ნეიტრალურ არეში უფრო მდგრადია დაჟანგული ფორმა. უნდა გვახსოვდეს, რომ ექსპერიმენტებში, როგორც წესი, ნად-ისა და ნადფ-ის, როგორც დაჟანგული, ისე აღდგენილი ფორმა უნდა დამზადდეს უშუალოდ ცდის წინ. გარდა ამისა, აღდგენილი ფორმის ხსნარის გაყინვა-გაღოობის შედეგად წარმოიქმნება დაუდგენელი აღნაგობის ნაერთი, რომელიც მოქმედებს როგორც მძლავრი ინჰიბიტორი იმ რეაქციებში, რომლებშიც მონაწილეობს ნად. II₂.

ორივე ზემოხსენებული კოფერმენტი ფართოდაა გავრცელებული ცოცხალ ორგანიზმებში. არსებობს მონაცემები, რომელთა თანახმად ცხოველურ უჯრედებში ნად-ი უფრო მეტი რაოდენობითაა, ვიდრე ნადფ-ი, მაგრამ მათი აღდგენილი ფორმებისათვის დამოკიდებულება საწინააღმდეგოა. მცენარეთა ფოთლებში ნად-ი და ნადფ-ი თითქმის ერთნაირი რაოდენობითაა წარმოდგენილი.

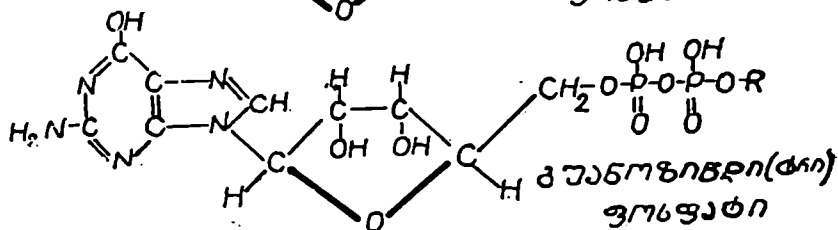
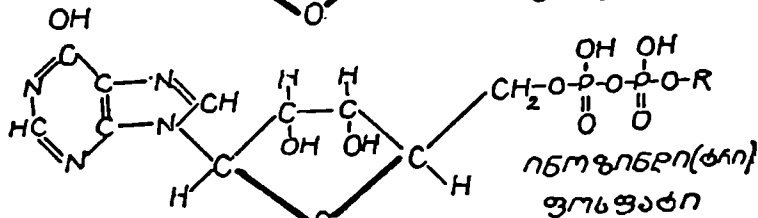
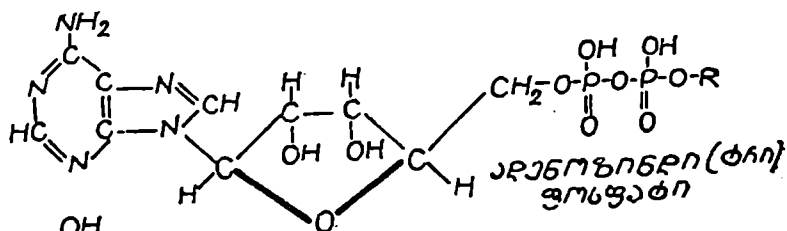
ნუკლეოზიდფოსფატები

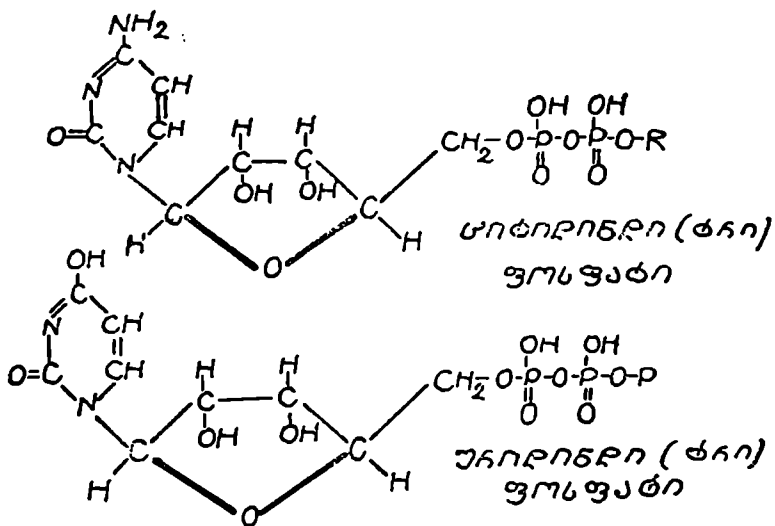
ნუკლეოზიდფოსფატების შედგენილობაში შედიან პურინის ფუძეები — ადენინი და გუანინი, და პირიმიდინის ფუძეები — ციტოზინი, ურაცილი და თიმინი. აზოტის ეს ფუძეები უერთდებიან რა რიბოზას ან დეზოქსირიბოზას, წარმოქმნიან შესაბამის ნუკლეოზიდებს, რომლებიც თავის მხრივ ფოსფორის მჟავასთან დაკავშირების შედეგად იძლევიან ნუკლეოზიდფოსფატებს.

ფერმენტულ სისტემებში უპირატესად მონაწილეობას ღებულობენ ისეთი ნუკლეოზიდფოსფატები, როგორიცაა ადენოზინდიფოსფატი (ადფ) და ადენოზინტრიფოსფატი (ატფ). ისინი მაკროერგული ნაერთებია და შედიან მრავალი ფერმენტისა და კოფერმენტის შემადგენლობაში.

რეაქციები, რომლებიც დამოკიდებული არიან ატფ-ზე შეიძლება დაყოფილ იქნას 2 დიდ კლასად: ერთი მოიცავს ისეთ რეაქციებს, რომლებიც დაკავშირებულია ატფ-ის მოლეკულის ნაწილის გადატანასთან შესაფერის სუბსტრატებზე, ხოლო მეორე აერთიანებს ისეთ რეაქციებს, რომლის დროსაც ატფ-ის გახლეჩის შედეგად განთავისუფლებული ენერგია ხმარდება სხვა, ენერგეტიკულად არახელსაყრელ რეაქციებს. ეს უკანასკნელნი კატალიზირდებიან სინთეტაზებით (ლიგაზებით).

პირველ კლასში შედიან ისეთი რეაქციები, რომელთა მიმდინარეობა დაკავშირებულია ატფ-ის მოლეკულიდან განაპირა ფოსფორის მეჯვას ნაშთის გადატანასთან. მაგალითად, ჰექსოკინაზების მოქმედების შედეგად ფოსფორმეჯვას ნაშთი გადაიტანება ჰექსოზის მოლეკულაზე. სპეციფიკურ ფერმენტებს გადააქვს პიროფოსფატის და ადენოზინმონოფოსფატის ნაშთები.

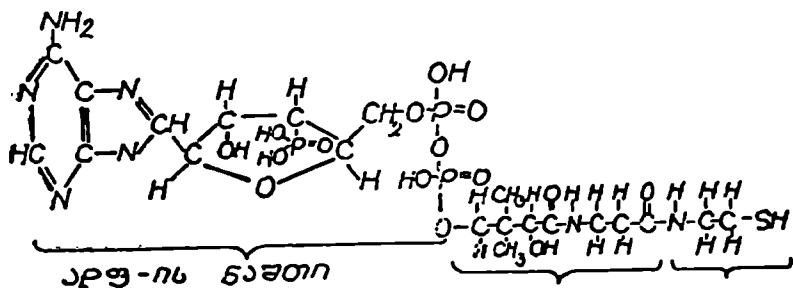




ამგვარად, ფერმენტები, რომლებიც შეიცავენ კოფერმენტად ატფ-ს, იწვევენ სხვადასხვა ნაერთების გააქტივებას მაკროერგული ბმების ხარჯზე. ნახშირწყლების ცვლაში მონაწილეობენ ისეთი ფერმენტები, რომლებიც კოფერმენტად შეიცავენ ურიდინდიფოსფატს (უდფ) და ურიდინტრიფოსფატს (უტფ), აგრეთვე ურიდინდიფოსფატგლუკოზას (უდფგ). ზოგიერთი ფერმენტის კოფერმენტებია აგრეთვე გუანოზინდიფოსფატმანოზა (გდფმ), გუანოზინდიფოსფატგლუკოზა (გდფგ) და ციტიდინტრიფოსფატი (ცტფ).

კოფერმენტი A

კოფერმენტი A უდიდეს როლს თამაშობს ნივთიერებათა ცვლაში. ეს კოფერმენტი მონაწილეობას ღებულობს აცეტილის — CH_3CO რადიკალის გადატანაში, აგრეთვე სხვა მკვებების ნაშთების (აცილების) გადატანაში. მაგალითად, სუქცინილის გადატანაში და ა. შ. მისი აღნაგობა ასეთია:



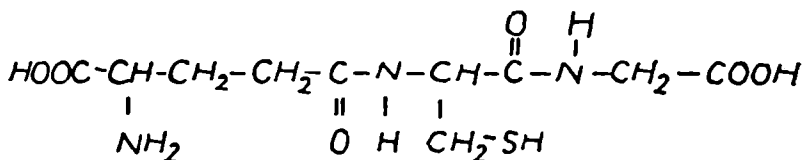
პანტოთენის მონაწილე მე. ნაშთი ეთერი კონი

როგორც ჩანს კოფერმენტი A-ს შედგენილობაში შედის ალფა-მერკაპტოეთილამინისა და პანტოთენის მჟავას ნაშთები. უკანასკნელი წარმოადგენს წყალში ხსნად ვიტამინს. აქედან ჩანს პანტოთენის მჟავას როლი, როგორც ნივთიერებისა, რომელიც მონაწილეობს კოფერმენტ A-ს სინთეზში. კოფერმენტი A-ს აქტიური ჯგუფია SH-ჯგუფი. წყალბადის მაგივრად აქ ჩაინაცვლება რომელიმე მჟავას აცილი. თუ ჩანაცვლებულია ძმარმჟავას აცილი — CH_3CO მაშინ მიიღება მაკროერგული თიოეთერული ბმა — $\text{S} \sim \text{OCCCH}_3$, რომელიც ცნობილია როგორც აცეტილკოფერმენტი A. ცნობილია აგრეთვე სუქცინილკოფერმენტი A, პალმიტილკოფერმენტი A და ა. შ.

ნახშირწყლებისა და გლიცერინის ნახშირბადების. ატომების 2/3 წარმოქმნის აცეტალკოფერმენტი A-ს. ცხიმოვანი მჟავების ყველა ნახშირბადატომები და ამინომჟავათა ნახშირბადების 50% ასევე გარდაიქმნება კოფერმენტი A-ს მონაწილეობით. აქედან ცხადია თუ რა დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ამ კოფერმენტს ნივთიერებათა ცვლაში.

გლუტათიონი

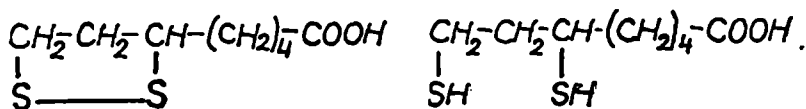
გლუტათიონი წარმოადგენს ცისტეინის, გლუტამინის მჟავასა და გლიცინის ტრიპეპტიდს. მისი აგებულებაა:



ფუნქციური ჯგუფია ცისტეინის SH-ჯგუფი. კოფერმენტის როლში გლუტათიონი გამოდის რეაქციების შედარებით მცირე რიცხვისათვის. ყველაზე კარგად შესწავლილია გლიოქსილაზური რეაქცია, რომლის დროსაც მეთილგლიოქსალი გარდაიქმნება რძის ზეავად. გლუტათიონის უმნიშვნელოვანესი მეტაბოლური ფუნქციაა სულფჰიდრილის ჯგუფების შენარჩუნება აღდგენილ მდგომარეობაში.

ლიზოს მჟავა

ლიზოს მჟავა ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი და ფრიად გავრცელებული კოფერმენტია. იგი გვხვდება როგორც დაჟანგულ ისე აღდგენილ მდგომარეობაში.



დაჟანგული

აღდგენილი

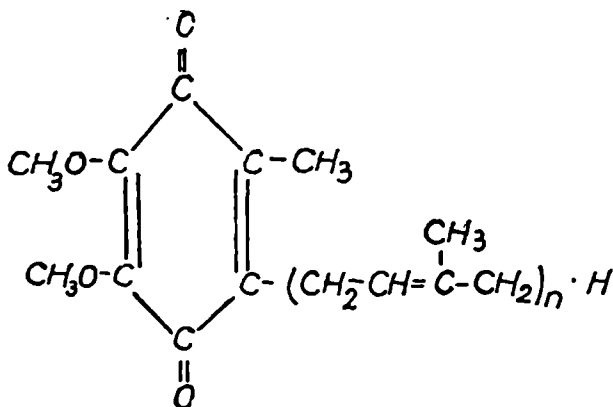
ეს ორი ფორმა ადვილად გადადის ერთმანეთში, რაზედაც დამყარებულია კიდევ ლიზოს მჟავას კოფერმენტული ფუნქცია.

უჯრედში ლიზოს მჟავას დიდი ნაწილი გვხვდება ცილასთან დაკავშირებულ მდგომარეობაში. ლიზოს მჟავა თავისი თავისუფალი COOH-ჯგუფით უკავშირდება ცილის ლიზინის ε-ამინოჯგუფს და წარმოქმნის პეპტიდურ ბმას. ლიზოს მჟავა დაჟანგულ მდგომარეობაში ყვითელი ფერისაა.

ლიზოს მჟავა იმ დამჟანგველ-აღმდგენელი ფერმენტების კოფერმენტია, რომლებიც მონაწილეობენ კეტომჟავების ჟანგვით დეკარბოქსილირებაში.

უბიჟინონები

უბიჟინონები ცხიმში ხსნადი კოფერმენტებია. მათ შემდეგი აღნაგობა აქვთ:



„უბი“ ნიშნავს „უცელგან“ და ამ კოფერმენტებს ასე უწოდებენ ზადგან ისინი ფართოდ არიან გავრცელებულნი ცოცხალ ორგანიზმებში. ისინი შეიცავენ ერთმანეთის მიმართ პარა მდგომარეობაში

მყოფ ქინოიდურ ჯგუფებს. ნაშთი $(-\text{CH}_2-\text{CH}=\overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{CH}_2-)$ მეორდება n-ჯერ. n ლეზულობს მნიშვნელობას 4-დან 12-მდე. ამიტომ ხშირად ვხვდებით ასეთ აღნიშვნებს კოფერმენტი Q₁₀ და იგავება რაც უბიქინონი 10 ან კოფერმენტი Q₆ ანუ უბიქინონი 6.

უბიქინონები, ისევე როგორც საერთოდ ქინონები, აღდგენისას წარმოქმნიან შესაბამის ჰიდროქინონებს. სწორედ ამაში მდგომარეობს უბიქინონების ძირითადი ბიოქიმიური მნიშვნელობა.

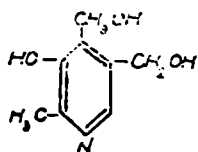
პირიდოქსალფოსფატი

პირიდოქსალფოსფატი ძირითადად წარმოადგენს იმ ფერმენტების პროსთეტულ ჯგუფს, რომლებიც აკატალიზებენ ამინომჟავების გარდაქმნებს. ასეთი რეაქციებია გადაამინირების, დეკარბოქსილირების, რაცემიზაციისა და სხვა. ბოლო ხანებში ნაჩვენები იქნა, რომ პირიდოქსალფოსფატი წარმოადგენს აგრეთვე ფერმენტ ფოსფორილაზის კოფერმენტს. უკანასკნელ შემთხვევაში მისი ფუნქცია ისაზღვრება ფერმენტის მესამეული სტრუქტურის შენარჩუნებით და ხორციელდება პირიდოქსალფოსფატის ალდეჰიდის ჯგუფისა და ფერმენტის ამინოჯგუფის ურთიერთქმედების შედეგად.

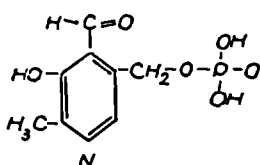
პირიდოქსალფოსფატი პირიდოქსინის, ვიტამინ B₆-ის ნაწარ-

მა. ვიტამინ B₆-ის უკმარობა იწვევს ცილისა და ამინომჟავების ცვლის დარღვევას.

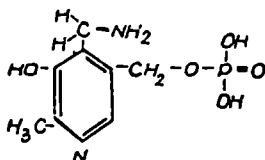
ქვევით მოყვანილია პირიდოქსინის, პირიდოქსალფოსფატისა და პირიდოქსამინფოსფატის (რომელიც აგრეთვე კოფერმენტი) სტრუქტურული ფორმულები:



პირიდოქსალი



პირიდოქსალფოსფატი

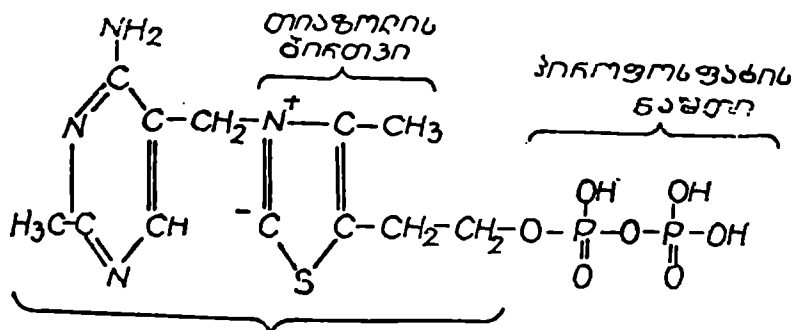


პირიდოქსამინფოსფატი

მნიშვნელოვანია ის გარემოება, რომ პირიდოქსალფოსფატის შემცველი ფერმენტები მკაცრ სპეციფიკურობას იჩენენ სუბსტრატის მიმართ. ეს სპეციფიკურობა განპირობებულია ფერმენტის ცილოვანი ნაწილით. სხვა სიტყვებით, ამინოტრანსფერაზები და ეთქვათ დეკარბოქსილაზები პროსთეტული ჯგუფის სახით შეიცავენ ერთი და იგივე პირიდოქსალფოსფატს, მაგრამ განსხვავდებიან ცალის აგებულებით, რაც განაპირობებს კიდევ რეაქციის ხასიათს.

თიამინპიროფოსფატი

თიამინპიროფოსფატი წარმოადგენს თიამინის — ვიტამინ B₁-ის ნაწარმს. ვიტამინ B₁-ის უკმარობა იწვევს ისეთ სერიოზულ დაავადებას როგორცაა პოლინევრიტი. თიამინპიროფოსფატის სტრუქტურა ასეთია:

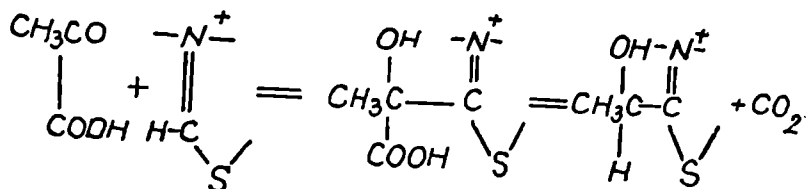


თიამინის ნაწილი

თიამინპიროფოსფატს კოკარბოქსილასაც უწოდებენ.

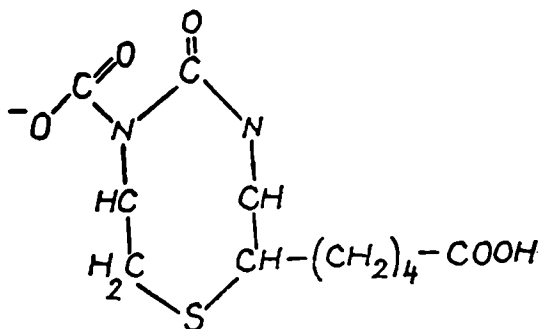
თიამინპიროფოსფატი ფერმენტ პირუვატდეკარბოქსილაზის, α -კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზის და სხვა ფერმენტული სისტემების კოფერმენტი. თიამინპიროფოსფატის მოქმედების მექანიზმი დაკავშირებულია თიაზოლის ბირთვთან.

პირუვატდეკარბოქსილაზის შემთხვევაში ეს ასე გამოისახება:

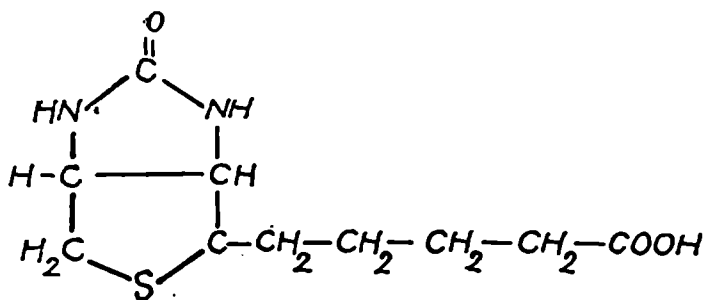


ბიოტინი

ბიოტინი, როგორც კოფერმენტი შედის იმ ფერმენტების შედგენილობაში, რომლებიც აკატალიზირებენ კარბოქსილირებისა და დეკარბოქსილირების რეაქციებს, უფრო სწორად, CO_2 -ის გადატანისა და ჩართვის რეაქციებს. ბიოტინის სტრუქტურა შემდეგია:



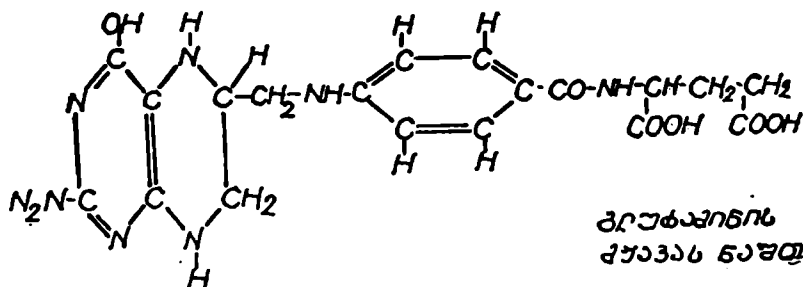
ბიოტინი წარმოადგენს ფერმენტების პირუვატკარბოქსილაზის, აცეტილკოფერმენტ A-კარბოქსილაზის და სხვათა პროსთეტულ ჯგუფს. იგი უკავშირდება თავისი თავისუფალი COOH ჯგუფით ცილის ლიზინის ϵ -ამინოჯგუფს და წარმოქმნის პეპტიდურ ბმას. რაც შეეხება CO_2 -ს ბიოტინი მას მიიერთებს აზოტის ერთ-ერთ ატომთან.



ბიოტინის შემცველი ფერმენტების მძლავრი და სპეციფიკური ანტიბიოტიკია ავიდინი, რომელიც დიდი რაოდენობითაა ქათმის კვერცხის ცილაში. ცხადია ქათმის კვერცხის დიდი რაოდენობით მიღება გამოიწვევს ბიოტინშემცველი ფერმენტების მოქმედების შეკავებას, რაც ძალზე არასასურველია.

ტეტრაჰიდროფოლიუმის მჟავა

ტეტრაჰიდროფოლიუმის მჟავა (ტჰფ) მონაწილეობს ერთნახშირბადიანი ფრაგმენტების მაგალითად, მეთილის, ოქსიმეთილის, ფორმილის და ა. შ. გადატანაში. მისი აღნაგობა შემდეგნაირია:



გლუტამინის
ჰუპას ნაშთი

ამინოჰსიკოტიდ-
ფაჰინის ნაშთი

პ-ამინობენზოის
ჰუპას ნაშთი

როგორც ტჰფ-ს სტრუქტურული ფორმულიდან ჩანს, მის შედგენილობაში შედის ამინოჰსიკიმეთილფტერინის, პ-ამინობენზოის და გლუტამინის მჟავების ნაშთები.

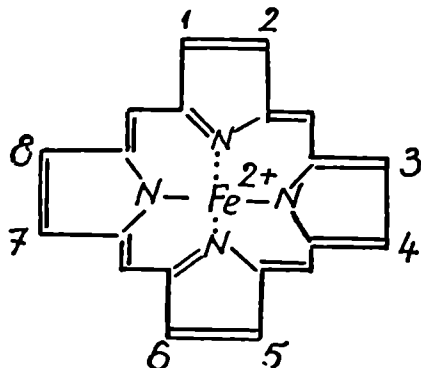
ციტოკრომები

ციტოკრომები აღმოაჩინა დ. კეილინმა 1925 წელს. მან ციტოკრომები უწოდა ჰემის შემცველ შიდაუჯრედულ პროტეიდებს, რომლებსაც გააჩნდათ შთანთქმის დამახასიათებელი სპექტრები. განსა-

კუთრებით მკვეთრ, კარგად გამოხატულ სპექტრებს იძლევიან ციტოქრომების აღდგენილი ფორმები. ციტოქრომები მონაწილეობენ უჯრედის სუნთქვით პროცესებში. ამეამად, ციტოქრომებს მიეკუთვნება ყველა ჰემოპროტეინი ჰემოგლობინის, მიოგლობინის, პეროქსიდაზისა და კატალაზის გარდა. ცნობილი ციტოქრომებიდან ზოგი წარმოადგენს ფერმენტს, მაგალითად ლაქტატდეჰიდროგენაზა (1.1.2.3) — ციტოქრომი ხ₂, ზოგიერთი კი უბრალოდ გადამტანებს ელექტონ-აღდგენით პროცესებში.

ციტოქრომების საშუალებით, კერძოდ, ხდება ელექტრონებისა და პროტონების გადატანა, რასაც თან სდევს ჰემის შემადგენლობაში მყოფი რკინის ატომის ვალენტობის ცვლილება.

ჰემი — ეს არის რკინის ტეტრაპიროლური (პორფირინის) მარწყვისებური კომპლექსი (ხელატი).



ჰემები განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან იმისდა მიხედვით თუ რა რადიკალებია წყალბადებით ჩანაცვლებული 1—8 მდგომარეობაში.

როგორც ცნობილია, ორვალენტიანი რკინის ატომი იწოდება ფეროატომად, ხოლო სამვალენტიანი — ფერიატომად. ანალოგიურად, ციტოქრომებს რომლებშიც რკინის ატომი იმყოფება ორვალენტოვან მდგომარეობაში, ე. ი. სამვალენტოვანთან შედარებით აღდგენილ მდგომარეობაში, უწოდებენ ფეროციტოქრომებს, ხოლო სამვალენტიანი (ე. ი. დაქანებული) რკინის ატომების შემცველ ციტოქრომებს — ფერიციტოქრომებს.

ციტოქრომებიდან შედარებით კარგადაა შესწავლილი ციტოქრომი c. ცნობილია მისი ცილოვანი ნაწილის პირველადი სტრუქტურა და გარკვეულია მრავალი ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრები.

აღდგენილი ციტოქრომი c ნეიტრალურ არეში არ იქანება მო-

ლეკულორი ჟანგბადით, მაგრამ იჟანგება წყალბადის ზეჟანგით, ფერიცინიდიტ და სპილენძის მარილებით. აღდგენილი ციტოქრომი ადვილად იჟანგება მოლეკულური ჟანგბადით ფერმენტ ციტოქრომ-ც-ოქსიდაზის მოქმედების შედეგად. როგორც ცხობილია ეს რეაქცია ჟანგვის (სუნთქვის) ტერმინალური რეაქციაა.

დაჟანგული ციტოქრომი C აღდგება ისეთი ქიმიური აღმდგენლებით, როგორიცაა ჰიდროსულფიტი, ცისტეინი, ასკორბინის მჟავა. პოლიფენოლები, აგრეთვე ფერმენტებით ციტოქრომ-ც-რედუქტაზებით (1.6.2.1, 1.6.2.3), ლაქტატდეჰიდროგენაზით (1.1.2.3) და სხვ. ციტოქრომ C-ს დაჟანგვა და აღდგენა უჯრედში ძალზე სწრაფად მიადინარეობს, რის გამოც იგი აქტიურ გადამტანად ითვლება. მოქმედების მექანიზმის მიხედვით იგი ძალზე წააგავს კოფერმენტებს და ზემოთმოყვანილი ფერმენტებისათვის ასრულებს ქეშმარიტ კოფერმენტის როლს.

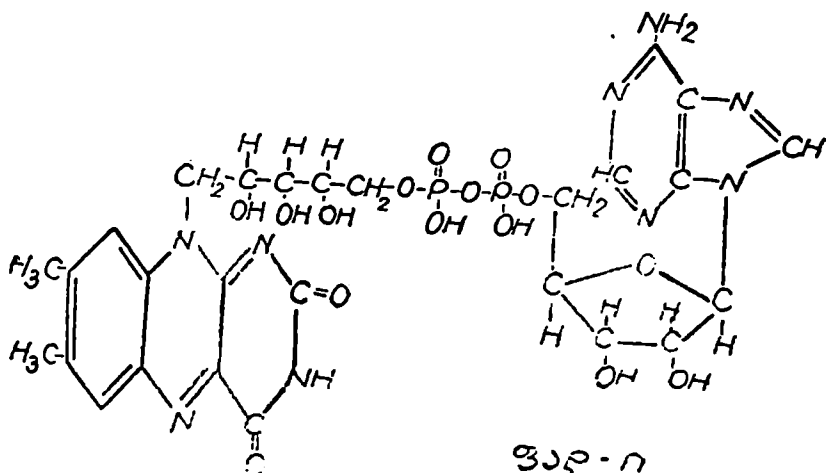
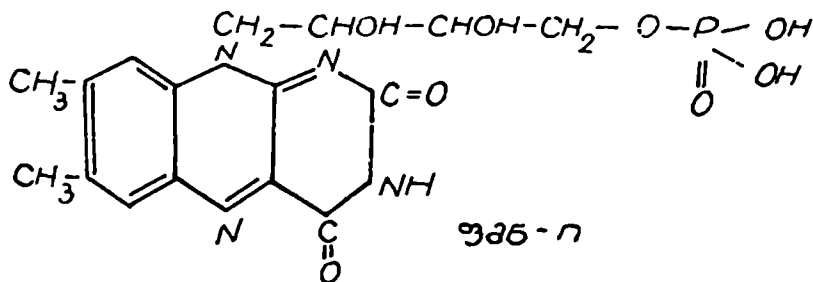
როგორც აღვნიშნეთ ციტოქრომი C, ისევე როგორც ყველა დანარჩენი ციტოქრომი, ცილაა. სწორედ ცილის ბუნებაზეა დამოკიდებული რეაქციის სპეციფიკურობა. მაგრამ ციტოქრომი C არ ითვლება ფერმენტად, რადგან მას დამოუკიდებლად არ გააჩნია კატალიზური მოქმედება. იგი მოქმედებს მხოლოდ ფერმენტების თანამყოფობისას. მაგალითად, მხოლოდ ციტოქრომი C-ს თანამყოფობისას ხდება ფერმენტ ციტოქრომ-ც-ოქსიდაზის მიერ ისეთი ნაერთების დაჟანგვა როგორიცაა ცისტეინი, ასკორბინის მჟავა, პ—ფენილენდიამინი და სხვა.

როგორც ცნობილია, ჰემი შედის აგრეთვე ჰემოგლობინისა და მيوგლობინის შემადგენლობაშიც, რომელთა ფუნქციაც მდგომარეობს ჟანგბადის გადატანაში, მაგრამ ციტოქრომებისაგან განსხვავებით ჟანგბადის გადატანის პროცესი არ არის დაკავშირებული რკინის ვალენტობის ცვლილებასთან. რკინა ჰემოგლობინისა და მيوგლობინში ყოველთვის ორვალენტიანია. ფერმენტების — კატალაზისა და პეროქსიდაზის კოფერმენტია აგრეთვე ჰემი, მაგრამ ციტოქრომებისაგან, ჰემოგლობინისა და მيوგლობინისაგან განსხვავებით მათში რკინა იქცევა განსხვავებულად. კატალიზური პროცესების დროს ადგილი აქვს სამვალენტიანი რკინის დაჟანგვას უფრო მაღალ ვალენტობამდე.

ფლავინური კოფერმენტები

ფლავინური კოფერმენტები წარმოადგენენ ვიტამინ B₂-ის ე. ი. რიბოფლავინის ნაწარმებს. ცოცხალ უჯრედში რიბოფლავინი ძირითადად წარმოდგენილია ფლავინადენინდინუკლეოტიდის (ფად-ი)

და ფლავინმონონუკლეოტიდის (ფმნ-ი) სახით. მისი სტრუქტურული ფორმულები შემდეგია:



ფმნ-ის შედგენილობაში შედის რიბიტოლის ნაშთი, რომელიც ერთი მხრივ, დაკავშირებულია ფოსფორის მექავას ნაშთთან, ხოლო მეორეს მხრივ, ფლავინთან (აზოტოვან ფუძესთან). ფმნ-ი მკაცრი გაგებით არ წარმოადგენს ნუკლეოტიდს, რადგან შაქლის—რიბოზის ნაცვლად შეიცავს სპირტს — რიბიტოლს.

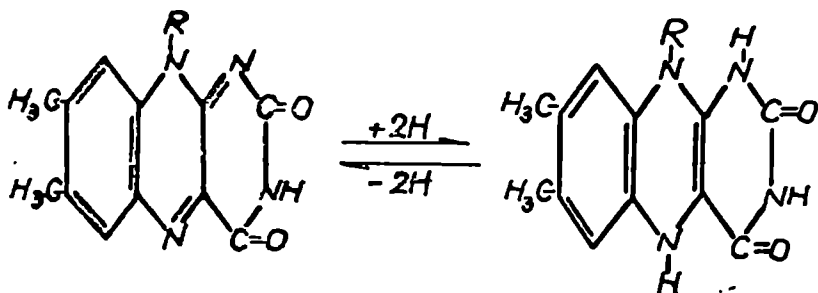
ფად-ი შედგება ორი ნუკლეოტიდის ნაშთისაგან, რომელთაგან ერთი შეიცავს ფლავინის, რიბიტოლისა და ფოსფორმექავას ნაშთებს, მეორე კი ადენინის, რიბოზისა და ფოსფორმექავას ნაშთებს.

ფლავინური კოფერმენტები ნად-ისა და ალდფ-ისაგან განსხვავებით მჭიდროდ არიან დაკავშირებული ფერმენტის მოლეკულასთან.

ფლავინი შეიცავს სამ ექვსწევრიან ციკლს, რომელთაგან ორი ჰეტეროციკლია. იგი ადვილად იჟანგება და აღდგება. დაჟანგულ

ფორმაში გააჩნია ყვითელი ფერი, საიდანაც წარმოდგება კიდევ მისი სახელწოდება (ლათინურად flavus ნიშნავს ყვითელს). აღდგენილ მდგომარეობაში იგი უფეროა.

ამჟამად ცნობილია 40-ზე მეტი ფერმენტი, რომლებიც კოფერმენტად იყენებენ ფმნ-ს და ფად-ს. ესენი არიან ამინომჟავათა ოქსიდაზები (1.4.3.2; 1.4.3.3), სუქცინატდეჰიდროგენაზა (1.3.99.1), გლიკოლაქტოსიდაზა (1.1.3.1) და მრავალი სხვა. როგორც ჩანს, ფლავოპროტეიდები აკატალიზირებენ დეჰიდრირების რეაქციებს. ჟანგვა-აღდგენა ხდება იზოალოქსაზინის ციკლში როგორც ეს ქვემოთაა ნაჩვენები.



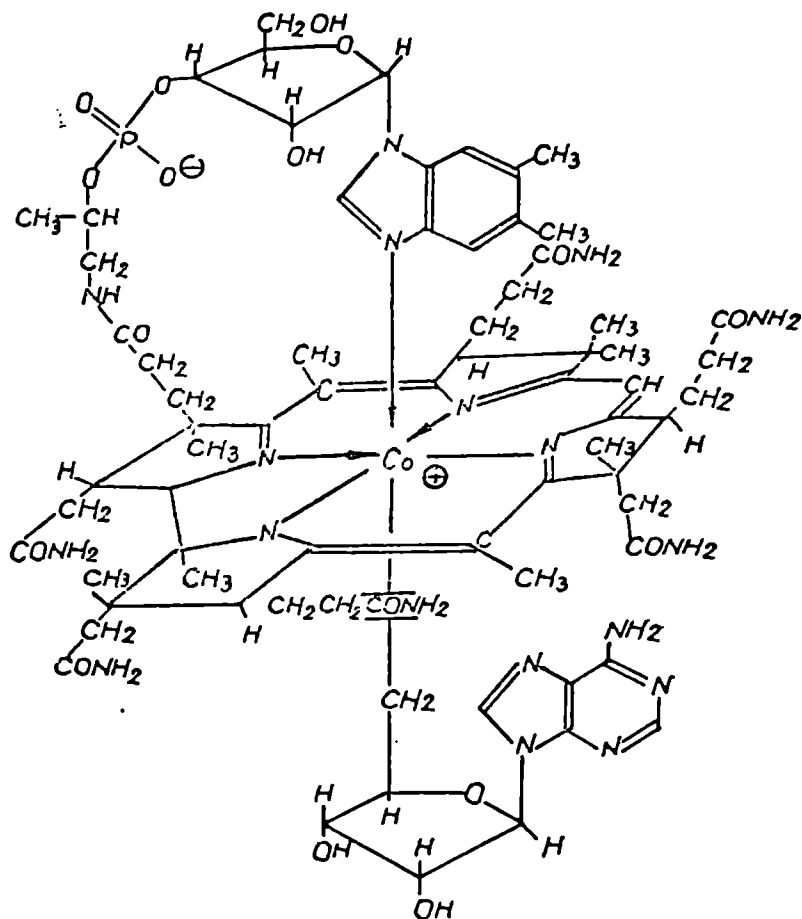
ექსპერიმენტებში ხშირად, როდესაც არ ხერხდება ბუნებრივი კოფერმენტების გამოყენება, ხმარობენ ელექტრონების ისეთ სინთეზურ აქცეპტორებს, როგორიცაა მეთილენის ლურჯი, ფენაზინი, ტეტრაზოლის საღებავები და ა. შ.

კობამიდური კოფერმენტები

ფერმენტები, რომლებიც კოფერმენტის სახით შეიცავენ ვიტამინ B_{12} —ციანოკობალამინის ნაწარმებს, ეწოდებათ კობამიდური ფერმენტები. ვიტამინ B_{12} -ის უკმარობა იწვევს ანემიას. კოფერმენტი B_{12} -ის სტრუქტურა. (გვ. 37).

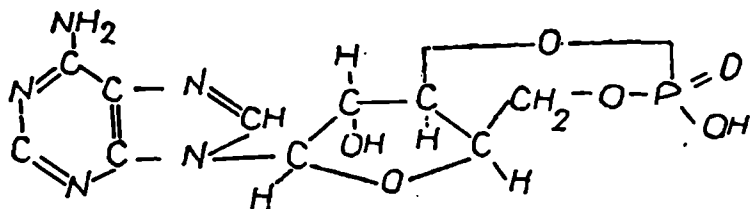
კოფერმენტი B_{12} -ის მოლეკულას საფუძვლად უდევს ე. წ. კორინის ციკლი, რომელიც შედგება ერთმანეთთან დაკავშირებული ოთხი პიროლის ნაშთის ნაწარმისაგან. ამ ციკლის ცენტრში მოთავსებულია კობალტის ატომი. კობალტის ატომი იმყოფება სამეალენტო მდგომარეობაში.

ვიტამინი B₁₂ შეიცავს ციანის ჯაშის (CN), მაგრამ კოფერმენტი მის მაგივრად შეიცავს აღენინუკლოზიდს. კოფერმენტი B₁₂ საჭიროა ფერმენტების მეთილმალონილ—კოფერმენტი A-მუტაზის



(5.4.99.2) და მეთილასპარტატმუტაზის (5.4.99.1) ფუნქციონირებისათვის. მისი მონაწილეობით ხდება აგრეთვე დიოლის გარდაქმნა დეზოქსილდეჰიდად.

ციკლური ადენილის მექავას აღნაგობა ასეთია:



უკანასკნელ ხანებში ინტერესი ციკლური ადენილის მექავას მიმართ საგრძნობლად გაიზარდა, და განსაკუთრებით მას შემდეგ როდესაც აღმოჩენილი იქნა კავშირი ამ ნაერთის გარდაქმნებსა და მემბრანულ პროცესებს შორის, კერძოდ, კალციუმის საქაჩავის მუშაობის რეგულაციასა და მემბრანული ფერმენტების პროტეინკინაზების აქტივირებას შორის.

31, 51—ამფ-ის მონაწილეობა უჯრედის მეტაბოლიზმში ხორციელდება ორი გზით:

1. პროტეინ-ფოსფორილაციის აქტივირებით, რის შედეგადაც წარმოებს ცილებისა და ფერმენტების ფოსფორილება, რაც თავის მხრივ უზრუნველყოფს ისეთი მნიშვნელოვანი პროცესების მიმდინარეობას, როგორიცაა მაკროერგული ნაერთების ბიოსინთეზი, აქტიური ტრანსპორტი, გენეტიკური მეხსიერება და ა. შ.

2. შიდაუჯრედული კალციუმის ცვლის რეგულაციით, რომელიც ასტიმულირებს ჰორმონების გამოყოფას და განაპირობებს ისეთი პროცესების ნორმალურ მიმდინარეობას, როგორიცაა კუნთოვანი ფიბრილების შეკუმშვა-მოდუნება და ნერვული უჯრედების აგზნება-შეკავება. მნიშვნელოვანია ის გარემოება, რომ ეს ორივე გზა ხორციელდება მემბრანების დონეზე.

ჩვენ არ შევუდგებით ზემოთ ნახსენებ პროცესებში 31, 51—ამფ-ის როლისა და მისი მოქმედების მექანიზმების განხილვას, იგი მწვენიერადაა აღწერილი აკადემიკოს პ. ქომეთიანის 1974 წელს გამოცემულ მონოგრაფიაში „О механизмах действия циклической аденинсинцифосфатной кислоты“. აღვნიშნავთ მხოლოდ, რომ უახლესი მონაცემების თანახმად 31, 51—ამფ-ი წარმოადგენს პროტეინ-ფოსფორილაციის კოფაქტორს.

სავარაუდოა, რომ 31, 51—ამფ-ი აადვილებს ატფ-ის ტერმინალური ფოსფატის გადატანას ცილის მოლეკულაზე, რის შედეგა-

დაც ფოსფორილებული ცილები იძენენ ფოსფოკინაზებისათვის და-
მახასიათებელ კატალიზურ აქტივობას. ასეთივე გზით უნდა ხორ-
ციელდებოდეს აგრეთვე იმ ფერმენტების აქტივირებაც რომლებიც
მონაწილეობენ ტრანსპორტის პროცესებში.

შენიშნულია, რომ 3', 5'-ამფ-ი იწვევს ჰისტონების ფოსფო-
რილების სტიმულირებას. გლუკაგონის, ეპინეფრინის და ინსულინის
ზოგიერთ ფოსფოკინაზებზე (ტიროზინ-კეტოგლუტარატ-ტრან-
სამინაზა, ფოსფოენოლ-პირუვატ-კარბოქსილაზა, სერინ-დეჰიდრა-
ტაზა, გლუკოზო-ფოსფატაზები და ა. შ.) მასტიმულირებელი გავლე-
ნის შესწავლის საფუძველზე გამოტანილ იქნა დასკვნა, რომ ეს რე-
აქციები თავიანთი მიმდინარეობისათვის საჭიროებენ 3', 5'-ამფ-ს.

მეტალები—ფერმენტთა კოფაქტორები

მეტალები მიეკუთვნებიან ფერმენტთა იმ კოფაქტორების
რიცხვს, რომელთაც ფერმენტები გადაჰყავს კატალიზურად აქტიურ
მდგომარეობაში. მაგრამ თვითონ არ მონაწილეობენ რეაქციაში.
ასეთ მეტალთა რიცხვს მიეკუთვნებიან: რკინა, სპილენძი, ცინკი,
კალციუმი, მაგნიუმი, მოლიბდენი, ნატრიუმი, კალიუმი, აგრეთვე
ამონიუმი და სხვა.

ფერმენტების ნაწილი არ საჭიროებს მეტალებს ფუნქციონი-
რებისათვის და არც აქტივირდებიან მეტალებით. მაგრამ ფერმენ-
ტების დიდი ნაწილი მეტალების გავლენით განიცდის აქტივირე-
ბას. უფრო მეტიც, ზოგიერთი ფერმენტი ვერც კი მოქმედებს მე-
ტალის გარეშე. ასეთი ფერმენტები თვითონ შეიცავენ მეტალის
იონებს. ასე მაგალითად, კატალაზა და პეროქსიდაზა, როგორც უკ-
ვე ვთქვით, შეიცავენ რკინის ატომებს, კარბონაჰიდრაზა, ალკო-
ჰოლდეჰიდროგენაზა, გლუტამატდეჰიდროგენაზა და კარბოქსიპე-
ტიდაზა — ცინკის ატომებს, ნიტრატრედუქტაზა — მოლიბდენს,
α-ამილაზა — კალციუმს, ქსანთინოქსიდაზა — რკინისა და მო-
ლიბდენის ატომებს და ა. შ.

ზოგიერთი მეტალ-ფერმენტი განიცდის დისოციაციას მეტა-
ლის გამოყოფით, ზოგიერთი კი არა.

როგორც ცნობილია არსებობს ისეთი რეაგენტები, რომლებიც
სპეციფიკურად უკავშირდებიან ამა თუ იმ მეტალს და აკავებენ
ფერმენტთა აქტივობას. ასეთი ინჰიბიტორებია: დიეთილდითიოკარ-
ბამატი, HCN და მისი მარილები (უპირატესად აინჰიბირებენ სპი-
ლენძისა და რკინის შემცველ ფერმენტებს), ედტა (უპირატესად
უკავშირდება კალციუმსა და მაგნიუმს და სხვა ხელატწარმოქმნე-

ლი ნაერთები, როგორცაა მაგალითად, 1,10—ფენანტროლინი, 8—ოქსიკინოლინი და ა. შ.

მეტალის ატომი დიდ გავლენას ახდენს არა მარტო ფერმენტის აქტივობაზე, არამედ მისი მოქმედების სპეციფიკურობაზეც.

როგორც ცნობილია, კარბოქსიპეპტიდაზა A-ს გააჩნია ორი კატალიზური ფუნქცია. იგი იწვევს ცილის პეპტიდური ბმის ჰიდროლიზს (პეპტიდური მოქმედება) და, როგორც სხვა ჰიდროლიზურ ფერმენტებს, გააჩნია აგრეთვე ესთერაზული აქტივობა, ე. ი. იწვევს რთული ეთერის ბმების ჰიდროლიზს.

თუ კარბოქსიპეპტიდაზის მოლეკულაში ცინკს შევცვლით კობალტით ან კადმიუმით, მკვეთრად შეიცვლება ფერმენტის სპეციფიკურობაც. კერძოდ, ცინკის შეცვლისას Co^{2+} -ით მკვეთრად იზრდება პეპტიდაზური და საგრძნობლად მცირდება ესთერაზული აქტივობები. თუ ცინკი Cd^{2+} -ით შეიცვლება, მაშინ პირიქით, მკვეთრად გაიზრდება ესთერაზული და სრულიად მოისპობა პეპტიდაზური აქტივობები.

მეტალსა და ფერმენტს შორის ბმის სიმტკიცე დამოკიდებულია მეტალის ბუნებაზე და იმ ფუნქციურ ჯგუფებზე, რომლებსაც უკავშირდება მეტალი. მეტალები წარმოქმნიან კომპლექსებს ფერმენტისა და კოფერმენტის იმ ფუნქციურ ჯგუფებთან, რომლებიც წეიცავენ თავისუფალ, გაუწყვილებელი ელექტრონების მქონე S, N და O ატომებს. ასე მაგალითად, ჰემის რკინის ატომი კოვალენტურად და კოორდინაციულად უკავშირდება ჰემის შემადგენლობაში მყოფ აზოტის ატომებს და მხოლოდ კოორდინაციულად ჰისტიდინის იმიდაზოლის ბირთვს და აპოფერმენტის ϵ -ამინოჯგუფს.

კარბოქსიპეპტიდაზის ცინკის ატომი დაკავშირებულია კოორდინაციული ბმით N-ბოლო ასპარაგინის თავისუფალ ამინოჯგუფთან და აპოფერმენტის სულფჰიდრილურ ჯგუფებთან.

რაში მდგომარეობს მეტალების როლი ფერმენტების მოქმედების მექანიზმში? მიჩნეულია, რომ მეტალს შეუძლია წარმოქმნას შუალედი ნაერთი ფერმენტსა და სუბსტრატს შორის. მაგალითად, ფერმენტ ლეიციამინოპეპტიდაზის დაკავშირება სუბსტრატთან ხორციელდება მანგანუმის (ან მაგნიუმის) ატომის კოორდინაციული ბმის საშუალებით.

მეტალი აუცილებელი კომპონენტია ზოგიერთი ფერმენტისათვის და რიგ შემთხვევაში იგი უშუალოდ მონაწილეობს რეაქციებში, მაგალითად ელექტრონების გადატანაში. ო-დიფენოლოქსიდაზები (1. 10. 3. 1, 1. 10. 3. 2) შეიცავენ აქტიურ ცენტრში ორვალენტიან სპილენძის იონებს. სპილენძის მოცილებისას ფერმენტი კარ-

გავს აქტივობას. ფერმენტი რეაქტივირდება Cu^{2+} -ით. მსგავსად ზოქმედებს მოლიბდენი, რომელიც შედის ნიტრატრედუქტაზის შემადგენლობაში. იგი უშუალოდ ურთიერთქმედებს ნიტრატთან და აღადგენს მას ნიტრიტამდე.

ცნობილია შემთხვევები, როდესაც მეტალები მონაწილეობას ღებულობენ ფერმენტების მეორადი, მესამეული და მეოთხეული სტრუქტურების სტაბილიზაციასა და შენარჩუნებაში. ამის კლასიკური მაგალითია α -ამილაზა. ყველა სახის α -ამილაზა შეიცავს კალციუმს, რომლის ფუნქციაც ფერმენტის მეორადი და მესამეული სტრუქტურების შენარჩუნებაა.

ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა შეიცავს ცინკის ოთხ ატომს და ნად⁺-ის ოთხ მოლეკულას. ცინკის მოცილება იწვევს არა მარტო ფერმენტის აქტივობის დაკარგვას, არამედ მის დისოციაციას 4 არა-აქტიურ სუბერთეულად. ამ მაგალითიდან ჩანს, რომ მეტალი მონაწილეობს მეოთხეული სტრუქტურის შენარჩუნებაშიც.

ხშირად მეტალის როლი მდგომარეობს აპოფერმენტისა და კო-ფერმენტის დაკავშირების გაადვილებაში. ასეა მაგალითად, ფერმენტ გლიცერალდეჰიდფოსფატდეჰიდროგენაზის შემთხვევაში.

შესაძლებელია სხვა მექანიზმების არსებობაც. მაგალითად არაა გამორიცხული, რომ რეაქციის მიმდინარეობაზე გავლენა მოახდინოს ფერმენტის ცილური ნაწილის ზედაპირული მუხტის ცვლილებამ, რაც შეიძლება გამოწვეული იყოს კატიონებით და განსაკუთრებით პოლივალენტური კატიონებით (მაგალითად Al^{3+}). შესაძლებელია მეტალის გამააქტივირებელი გავლენა გამოწვეული იყოს იმითაც, რომ ის უკავშირდება ფერმენტულ პრეპარატში მყოფ ინჰიბიტორს, ბოჭავს მას ან იწვევს მის ნალექში გადასვლას.

და ბოლოს უნდა აღვნიშნოთ, რომ მეტალების გამააქტივირებელი გავლენა დამოკიდებულია მათ კონცენტრაციებზე, სუბსტრატის კონცენტრაციაზე, ბუფერის იონურ შემადგენლობაზე, სარეაქციო არის pH-ზე და ა. შ. ხშირად ერთი და იგივე მეტალის იონი ერთი და იმავე ფერმენტისათვის გამოდის როგორც აქტივატორის, ისე ინჰიბიტორის როლში. აქტივირებას უპირატესად იწვევენ მეტალის დაბალი, ხოლო ინჰიბირებას მაღალი კონცენტრაციები.

არ უნდა ვიფიქროთ, რომ ნებისმიერი მეტალი შეიძლება გამოვიდეს აქტივატორის როლში. მაგალითად, ისეთი მეტალის იონები, როგორიცაა Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} და სხვა ე. წ. მძიმე მეტალები, როგორც წესი, გვევლინებიან ფერმენტების — ცილების არასპეციფიკურ ინჰიბიტორებად. ცნობილია აგრეთვე ისეთი მეტალის იონები, რომლებიც იწვევენ ზოგიერთი ფერმენტების აქტივირებას

და ზოგიერთების ინჰიბირებას. კარგად უნდა გვახსოვდეს, რომ პეტალების იონების გავლენის შესწავლის დროს დიდი ყურადღება უნდა მიექცეს ანიონების გავლენის შესწავლასაც. თუმცა არაორგანული და ორგანული მეალების ანიონებს, როგორც წესი, ახასიათებთ შედარებით ნაკლები სპეციფიკურობა, მათი მოქმედების ხასიათი ყოველთვის უნდა იყოს მხედველობაში მიღებული.

ლიტერატურა

1. Диксон М., Уэбб Э., Ферменты М., «Мир», 1968.
2. Ленинджер А. Л., Биохимия пер. с англ., М., «Мир», 1974.
3. Коментарии П. А., О механизмах действия циклической аденозин-монофосфорной кислоты, Тбилиси, «Мецნიერება», 1974.
4. Коферменты под ред. В. Я. Яковлева М., «Медицина», 1973.
5. Кротович В. Л., Введение в энзимологию М., «Наука», 1974.
6. Малер Г., Кордес Ю., Основы биологической химии, пер. с англ. М., «Мир», 1970.
7. Methods in Enzymology Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan N. Y., Academic Press vol. 18, 1970. Vitamines and coenzymes part A. vol. 18, 1971. Vitamines and coenzymes part B.

ფერმენტთა სპეციფიკურობა და მოქმედების მექანიზმები

მოქმედების სპეციფიკურობა

არაორგანული კატალიზატორებისაგან განსხვავებით ფერმენტებს აქვთ მოქმედების მეტად დიდი სპეციფიკურობა. ფერმენტების მაღალი სპეციფიკურობა წარმოადგენს ცოცხალ მატერიაში მიმდინარე გარდაქმნების ერთ-ერთ თავისებურებას.

არჩევენ ფერმენტთა სპეციფიკურობის შემდეგ ძირითად ტიპებს:

1. აბსოლუტური სპეციფიკურობა. ეს ის შემთხვევაა, როდესაც ფერმენტი ააქტივებს მხოლოდ ერთი სუბსტრატის გარდაქმნას (მაგალითად, სუქცინატდეჰიდროგენაზა (ფკ 1. 3. 99. 1)).

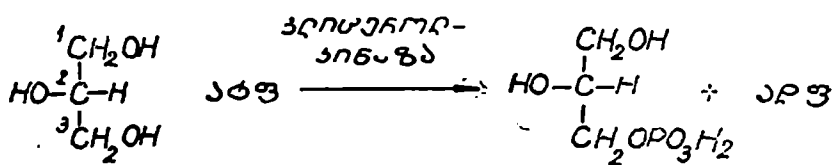
2. ჯგუფური სპეციფიკურობა. ფერმენტი მოქმედებს სუბსტრატების მთელ რიგზე. ის აყენებს გარკვეულ „მოთხოვნას“ ატომთა იმ დაჯგუფებების მიმართ, რომელსაც უნდა შეიცავდეს სხვადასხვა სუბსტრატის ყოველი მოლეკულა. მაგალითად, ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა (ფკ 1. 1. 1. 1) ააქტივებს ისეთი ნივთიერებების დაყენებას, რომლებიც შეიცავენ პირველად სპირტულ დაჯგუფებას $R-OH$.

3. სპეციფიკურობა ბმების გარკვეული ტიპების მიმართ. ამ სახის სპეციფიკურობას აქვდაწინებენ ფერმენტები, რომლებიც ააქტივებენ რეაქციის გარკვეულ ტიპს, მიუხედავად იმისა, თუ რა დაჯგუფებებია სუბსტრატის მოლეკულის იმ ბმების მახლობლად, რომელზედაც მოქმედებს ფერმენტი. ასე მაგალითად, ლიპაზა (ფკ 3. 1. 1. 3) ააქტივებს ნებისმიერი რთული ეთერის (აგრეთვე ლიპიდების) ჰიდროლიზს.

4. სტერეოქიმიური სპეციფიკურობა. ამ დროს ფერმენტი ააქტივებს სუბსტრატის მხოლოდ ერთი სტერეოქიმიური ფორმის გარდაქმნას. ასე მაგალითად, პროტეოლიზური ფერმენტები ჩვეულებ-

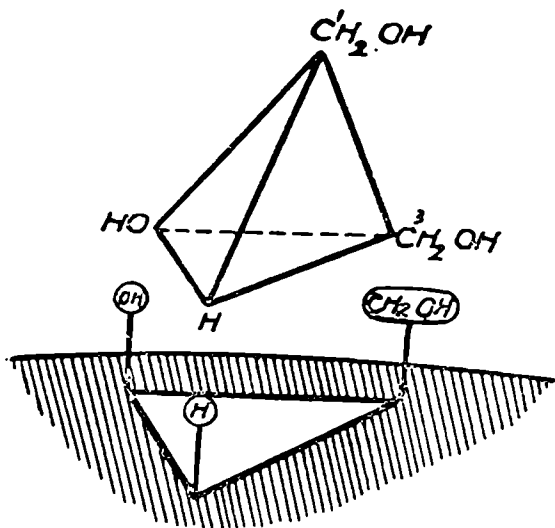
რივ მოქმედებენ ამინომჟავების მხოლოდ L-ფორმებისაგან შექმნილ პეპტიდებზე, ასევე L-ლაქტატდეჰიდროგენაზა (ფკ 1. 1. 2. 3) ააქტივებს მხოლოდ L-რქემჟავას დაქანგვას. მოქმედების ასეთი შერჩევითი უნარი შეიმჩნევა ჩვეულებრივ გეომეტრიულ იზომერებშიც (ცის-და ტრანს-ფორმებში). ასე მაგალითად, ფუმარაზა (ფკ 4. 2. 1.2) ააქტივებს წყლის მოლეკულის მიერთებას ფუმარის მჟავას ორმაგ ბმებთან (ტრანს-იზომერი), მაგრამ არა მალეინის მჟავას ორმაგ ბმებთან (ცის-იზომერი).

ცნობილია ფერმენტების განსაკუთრებული სტერეოსპეციფიკურობა, როდესაც სუბსტრატის სავსებით სიმეტრიულ მოლეკულაში ფერმენტი ანსხვავებს ერთნაირ ჯგუფებს. ფერმენტის ამგვარი სტერეოსპეციფიკურობის მაგალითია გლიცეროლკინაზის (ფკ. 2. 7. 1. 30) მოქმედება გლიცერინის ფოსფორილების შემთხვევაში — როცა წარმოიქმნება მხოლოდ L-გლიცერო-3-ფოსფატი.



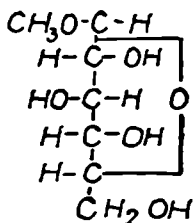
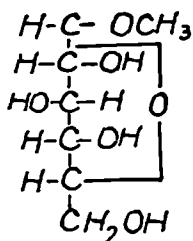
ფერმენტის ამგვარი სტერეოსპეციფიკურობა შეიძლება თვალნათლივ აიხსნას სქემატურად ა. ოგსტონის თეორიით, რომლის თანახმად სუბსტრატი უკავშირდება ფერმენტს სამ წერტილში. წარმოვიდგინოთ გლიცერინის მოლეკულა ტეტრაედრის სახით, რომლის კუთხეებშიც მოთავსებულია H, OH, და ორი CH₂OH ფუნქციური ჯგუფები. დავუშვათ, რომ ფერმენტის მოლეკულის აქტიური ცენტრში მოთავსებულია (OH), (H) და (CH₂OH) სპეციფიკური უბნები, სადაც კავშირდება სუბსტრატი თავისი ფუნქციური ჯგუფებით (სურ. 3). დავუშვათ, რომ უბანი (CH₂OH), ანუ ფერმენტის მოლეკულის დაჯგუფება, რომელსაც უერთდება სუბსტრატი თავისი CH₂OH ფუნქციური ჯგუფით, ააქტივებს ამ ჯგუფს სუბსტრატის მოლეკულაში. სავსებით ნათელია, რომ ფოსფორილება მოხდება მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როდესაც სუბსტრატი კომპლემენტარულად დაუკავშირდება აქტიურ ცენტრს. (CH₂OH) მონაკვეთს არ შეუძლია გაააქტივოს

C^1H_2OH დაჯგუფება, ვინაიდან ამ შემთხვევაში გაძნელდება სუბსტრატის დაჯდომა ფერმენტის ზედაპირზე, სუბსტრატის ფუნქციურ ჯგუფებსა და აქტიური ცენტრის დაჯგუფებებს შორის კომპლემენტარულობის დარღვევის გამო. სტერეოსპეციფიკურობის კარგ მაგალითს წარმოადგენს α -გლუკოზიდაზისა (ფკ 3. 2. 1. 20) და



სურ. 3. ოგსტონის თეორიის სქემატური გამოსახულება.

β -გლუკოზიდაზის (ფკ. 3. 2. 1. 21) მოქმედება. ფერმენტი α -გლუკოზიდაზა მოქმედებს α -გლუკოზიდებზე, შლის მათ გლუკოზად და სპირტად და ვერ მოქმედებს β -გლუკოზიდების მოლეკულებზე, მაშინ როცა β -ლუკოზიდაზა მოქმედებს მხოლოდ β -გლუკოზიდებზე და ვერ მოქმედებს α -გლუკოზიდებზე.



α -კეთილბეჯიანი

β -კეთილბეჯიანი

აღნიშნული ფერმენტების თავისებურებაა ის გარმოება, რომ მათი მოქმედების სტერეოსპეციფიკურობა განპირობებულია არა გლუკოზიდურ ჰიდროქსილში ჩანაცვლებული სპირტული ნაშთების ქიმიური ბუნებით, არამედ მათი სივრცითი ორიენტაციით (α და β მდგომარეობა). უნდა აღვნიშნოთ, რომ სპეციფიკურ ფერმენტულ კატალიზს საფუძვლად უდევს ფერმენტისა და სუბსტრატის აღნაგობათა შესაბამისობა. ე. ფიშერი თავის შრომაში, რომელიც მიუძღვნა ფერმენტებით სხვადასხვა გლუკოზიდების ჰიდროლიზს, წერდა: „თუ გამოვიყენებთ ხატოვან გამოთქმას, მე ვიტყვოდი, რომ ფერმენტისა და გლუკოზიდის ქიმიური ურთიერთქმედების განხორციელებისათვის საჭიროა, რომ ისინი უდგებოდნენ ერთმანეთს ისევე, როგორც გასაღები კლიტეს“. ფერმენტისა და სუბსტრატის სტრუქტურული შესაბამისობის ეს იდეა უდევს საფუძვლად ყველა თანამედროვე წარმოდგენას ფერმენტთა მოქმედების სპეციფიკურობის შესახებ.

ენზიმოლოგიის მიერ დაგროვებული უდიდესი ექსპერიმენტული მასალა მოწმობს, რომ ფერმენტების მოქმედების სპეციფიკურობა განისაზღვრება ფერმენტისა და სუბსტრატის აგებულების კომპლემენტარულობით, ანუ ფერმენტისა და სუბსტრატის მოლეკულების სტრუქტურული (გეომეტრიული) და ელექტრონული (ქიმიური) ურთიერთშეთავსებით.

მოკმედეების მექანიზმი

ფერმენტების მოქმედების მექანიზმს საფუძვლად უდევს ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნის შესაძლებლობა. ამ დებულების ექსპერიმენტული დასაბუთება მოგვცეს ინგლისელმა ბიოქიმიკოსებმა დ. კელინმა და მისმა თანამშრომელმა ტ. მანმა პეროქსიდაზითა (ფკ. 1. 11. 1. 7) და წყალბადის ზეჟანგით ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნის მაგალითზე. ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოშობა დამტკიცდა იმით, რომ მკვეთრად განსხვავდებოდა სუფთა პეროქსიდაზის შთანთქმის სპექტრი იმ პეროქსიდაზის შთანთქმის სპექტრისაგან, რომელსაც დამატებული ჰქონდა წყალბადის ზეჟანგი.

ამჟამად ბ. ჩანსის შრომების საფუძველზე შემუშავებულია ფერმენტული რეაქციების კინეტიკისა და ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნის სპექტროფოტომეტრული შესწავლის საკმაოდ მგრძნობიარე მეთოდები.

3. თეორელმა, გამოიყენა რა ბ. ჩანსის მეთოდთა, შეისწავლა

ალკოჰოლდეჰიდროგენაზისათვის ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნა. არსებობს ამ კომპლექსის წარმოქმნის დადგენის სხვა მეთოდებიც. მათ პირველ რიგში მიეკუთვნება წონასწორული დიალიზისა და ულტრაცენტრიფუგაში სედიმენტაციის მეთოდი. ამ მეთოდების არსი მდგომარეობს იმაში, რომ გარკვეული კონცენტრაციის ფერმენტისა და სუბსტრატის წინასწარი ინკუბირების, დიალიზისა და ულტრაცენტრიფუგირების შემდეგ იანზღვრება სუბსტრატის კონცენტრაცია. და ბოლოს, იაპონელებმა კ. იაგიმ და ტ. ოზამ შეძლეს D—ამინომჟავების ოქსიდაზისთვის ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის კრისტალური სახით მიღება.

საჭიროა გარკვევს, თუ რომელი ბმების საშუალებით იქმნება ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსი. უწინარეს ყოვლისა ესენი ჩვეულებრივი კოვალენტური ბმებია. ადგილი აქვს აგრეთვე სუბსტრატის დადებითად დამუხტულ ჯგუფებსა და ფერმენტის უაპოფითად დამუხტულ ჯგუფებს შორის (და პირიქით) იონური (პოლარული) ბმების წარმოქმნასაც. სუბსტრატის ფერმენტთან დაკავშირება შეიძლება მოხდეს აგრეთვე წყალბადური ბმებისა და ჰიდროფობური ურთიერთქმედების საშუალებით.

ფერმენტების მოქმედების მექანიზმის ამხსნელ ყელა თეორიას საფუძვლად უდევს წარმოდგენა იმაზე, რომ ფერმენტი ამცირებს მოცემული რეაქციის აქტივაციის ენერგიას. მოწოდებულია მრავალი თეორია ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნის ასახსნელად, რომელთა შორის განსაკუთრებით საინტერესოა სუბსტრატის დეფორმაციის თეორია. ეს თეორია დამუშავდა ჰანს ეილერის იდეებიდან გამომდინარე. ჰიდროლაზების შემთხვევაში თეორიის არსი შემდეგში მდგომარეობს: სუბსტრატის მოლეკულა ფერმენტის მოლეკულას უერთდება ორ წერტილში, ამ დროს ხდება ელექტრონების გადაადგილება, ბმა იჭიმება და საბოლოოდ წყდება, რასაც თან ახლავს სუბსტრატის მოლეკულის ერთ ნაწილში წყლის წყალბადის, ხოლო მეორე ნაწილში ჰიდროქსილის მიერთება. ეს თეორია კარგად ხსნის მრავალი ფერმენტის მოქმედებას მექანიზმს და პირველ რიგში ჰიდროლაზების, ლიაზებისა და მრავალი ტრანსფერაზის შემთხვევაში.

მნიშვნელოვანია საკითხი იმას შესახებ. თუ როგორ შეგვიძლია გამოვავლინოთ ფერმენტის ესა თუ ის ფუნქციური ჯგუფი, რომლითაც ის კავშირდება სუბსტრატთან და რომელიც პასუხისმგებელია ფერმენტული აქტივობის გამოძეგლავებაში. ამ მიზნის მიღწევისათვის შემუშავებულია მრავალი მეთოდი. ჯერ ერთი ეს შეიძლება გაკეთდეს სხვადასხვა ინჰიბიტორების გამოყენებით, რომ-

ლებიც სპეციფიკურად ანჰიბირებენ მეტალის შემცველ ფერმენტებს. მაგალითად, დიეთილდითიოკარბამატი სპეციფიკურად აკავებს სპილენძისა და რკინის შემცველ ფერმენტებს (პოლიფენოლოქსიდაზას, ციტოქრომ-C-ოქსიდაზას).

აქტიური ჯგუფის გამოვლინების მეორე ხერხი იმაში მდგომარეობს, რომ შეიძლება ფერმენტის მოლეკულიდან ფრთხილი ფრაქციული ჰიდროლიზით, შესაბამისი ფერმენტის მოქმედებით მოცილდეს ამინომჟავების ნაშთების ისეთი რიგი, რომელიც აქტიური ცენტრის შენებაში მონაწილეობას ღებულობს. ერთდროულად უნდა ხდებოდეს აქტივობის შემოწმებაც. ამგვარად შესაძლებელი ხდება იმ ამინომჟავების ნაშთების აღმოჩენა რომლებიც პასუხისმგებელნი არიან ფერმენტის კატალიზურ ფუნქციაში. ასე მაგალითად, პაპაინის (ფკ 3. 4. 4. 10) მოლეკულიდან ამინომჟავების ნაშთების 2/3 მოცილებისას მისი აქტივობა პრაქტიკულად არ იცვლება.

ფერმენტების აქტიური ჯგუფების შესწავლის შემდეგი მეთოდი დაკავშირებულია მათ ქიმიურ მოდიფიცირებასთან: დაჟანგვასთან, ბლოკირებასთან, ჩანაცვლებასთან და ა. შ. განსაკუთრებით ფართოდ გამოიყენება აქტიური ჯგუფების ბლოკირება სპეციფიკური რეაქტივებით. მაგალითად, ფერმენტების SH-ჯგუფის ბლოკირებისათვის ხმარობენ სპეციფიკურ რეაქტივს პ-ქლორმერკურიბენზოატს, სერინის OH-ჯგუფი სპეციფიკურად ბლოკირდება დიიზოპროპილფტორფოსფატით.

ფერმენტთა კატალიზური მოქმედების გამოვლინებისათვის აუცილებელი ფუნქციური ჯგუფების შესწავლამ და მიღებული მონაცემების დაპირისპირებამ ფერმენტული ცილის პირველად, მეორად და მესამეულ სტრუქტურასთან მიგვიყვანა ფერმენტის აქტიური ცენტრის ცნებამდე, ანუ ფერმენტის მოლეკულაში სხვადასხვა დეჯგუფებების იმ კომბინაციამდე, რომლის წყალობითაც ხორციელდება მისი კატალიზური მოქმედება.

მაშასადამე, ფერმენტის მოქმედება მდგომარეობს აქტიურ ცენტრში ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნაში. შემდეგ ეტაპზე ხდება კომპლექსში ელექტრონების გადანაწილება და გარდაქმნის პროდუქტის განთავისუფლება. თუ ფერმენტი ცილის (აპოფერმენტის) გარდა კოფერმენტსაც შეიცავს, მაშინ ეს უკანასკნელი თამაშობს მნიშვნელოვან როლს ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნაში და მთელი ფერმენტული პროცესის მონდინარეობაში. ამგვარი რეაქციის კარგ მაგალითს წარმოადგენს გადაამინირების რეაქციები, რომლებიც აქტივდებიან ამინოტრანს-

ფერაზებით. ამინოტრანსფერაზებისა და სხვა ფერმენტების, რომლებიც შეიცავენ კოფერმენტად პირიდოქსალფოსფატს, მოქმედების მექანიზმის საერთო თეორია დაამუშავეს საბჭოთა მეცნიერებმა ა. ბრაუნშტეინმა, მ. შემიაკინმა და ამერიკელმა ბიოქიმიკოსმა ე. სნელმა.

როდესაც ე. ფიშერი აღარებდა ფერმენტს და სუბსტრატს, ის თვლიდა, რომ ფერმენტს აქვს მაგარი, ხისტი სტრუქტურა, და, რომ გასაღები — სუბსტრატი ისე უნდა უდგებოდეს ფერმენტს — კლიტეს, რომ არ ხდებოდეს არც ერთის მოლეკულის ფორმის შეცვლა და დარღვევა. მაგრამ, თუ ეს დაშვება მივიღეთ, ძნელი ხდება ზოგიერთი მოვლენის ახსნა. მაგალითად, მოსალოდნელია, რომ ზოგიერთი ნივთიერება, რომელსაც გააჩნია სუბსტრატთან სტრუქტურული მსგავსება შეიძლება დაუკავშირდეს შესაბამის ფერმენტს, მაგრამ სინამდვილეში ეს ასე არ ხდება.

სუბსტრატის დეფორმაციის თეორიიდან გამომდინარე და სხვა დაკვირვებების გათვალისწინებით, ამერიკელმა ენზიმოლოგმა დ. კოშლენდმა ჩამოაყალიბა ფერმენტის ინდუცირებადი სტრუქტურული შესაბამისობის ჰიპოთეზა სამი პოსტულატის სახით.

1. სუბსტრატი იწვევს არსებით ცვლილებას ფერმენტის გეომეტრიაში, რამდენადაც ის იჭრება მის აქტიურ ცენტრში;

2. ფერმენტის მოქმედებისათვის აუცილებელია კატალიზური ჯგუფების ზუსტი ორიენტაცია;

3. სუბსტრატი, ცვლის რა ფერმენტის გეომეტრიას, იწვევს აქტიური ცენტრის საჭირო ორიენტაციის ინდუცირებას.

ჰიპოთეზის თანახმად, სუბსტრატი უერთდება რა აქტიურ ცენტრს, ცვლის მის ფორმას, იცვლება თვითონაც და ამგვარად, უზრუნველყოფს მათ იდეალურ შეთავსებას. ჰიპოთეზა ვარაუდობს, რომ აქტიურ ცენტრში ფუნქციური ჯგუფები ლებულობენ სპეციფიკურ სივრცით კონფიგურაციას მხოლოდ მაშინ, როცა მათთან ურთიერთქმედებს სუბსტრატის მოლეკულა. არსებობს პირდაპირი საბუთი იმისა, რომ ზოგიერთი ფერმენტის მოლეკულა განიცდის გარკვეულ ცვლილებას, როდესაც ხდება მცირე ზომის მოლეკულებთან ურთიერთქმედება.

როცა ქანგბადი უერთდება ჰემოგლობინს, უკანასკნელში ხდება კონფორმაციის უმნიშვნელო, მაგრამ რეალური ცვლილებები, რაც შეიძლება აღმოჩნდეს რენტგენოსტრუქტურული ანალიზით. ჰემოგლობინი არ წარმოადგენს ფერმენტს ამ ცნების სრული გაგებით, მაგრამ ის იერთებს ქანგბადს იმ მექანიზმით, რომელიც თავისი მრავალი თავისებურებით მსგავსდება ფერმენტის სუბს-

ტრატთან მიერთების მექანიზმს. უფრო მეტიც, როცა ლიზოციმის (ფკ. 3. 2. 1. 17) „ჯიბეში“ მოთავსდება სუბსტრატი („ჯიბეში“ მოთავსებულია ლიზოციმის აქტიური ცენტრი), ეს „ჯიბე“ რამდენადმე იკუმშება.

პრინციპში, ფერმენტისა და სუბსტრატის ინდუცირებადი სტრუქტურული შესაბამისობა შეიძლება მიღწეული იქნეს ერთ შემთხვევაში ფერმენტის, მეორეში სუბსტრატის კონფორმაციული გარდაქმნის გზით, ან კიდევ ცვლილებებით როგორც ფერმენტში ისე სუბსტრატში.

მიუხედავად იმისა, რომ მრავალი ფერმენტისათვის დადგენილია ფუნქციური ჯგუფებისა და აქტიური ცენტრების აღნაგობა, უნდა აღინიშნოს, რომ ფერმენტული კატალიზის ეფექტურობისა და სპეციფიკურობის გადამწყვეტ ფაქტორს წარმოადგენს ცილის მთლიანი მოლეკულის სტრუქტურა.

ფერმენტის მოლეკულის აქტიური ცენტრის ფუნქციური ჯგუფებისა და დანარჩენი ნაწილის სხვადასხვა სარეაქციო ჯგუფების ურთიერთქმედების წყალობით იქმნება ფერმენტის ის უნიკალური სივრცითი სტრუქტურა, რომელიც უზრუნველყოფს ფერმენტ-სუბსტრატის ნაერთის წარმოქმნას და სუბსტრატის კოოპერატიული, მკაცრად შეთანხმებული და სივრცით ორიენტირებული შეტევის შესაძლებლობას ფერმენტის განსაზღვრული ფუნქციური ჯგუფების მიმართ.

კარგად უნდა გვახსოვდეს, რომ *in vitro* დადგენილი ფერმენტების თვისებები შესაძლებელია ძალიან განსხვავდებოდნენ ფერმენტების იმ თვისებებისაგან, რომლებსაც ისინი ამჟღავნებენ უჯრედში. ეს იმით აიხსნება, რომ ჩვენ ფერმენტებს ესწავლობთ ჰომოგენურ სისტემაში, მაშინ როცა ისინი უჯრედში მოქმედებენ ჰეტეროგენულ სისტემაში, თანაც უჯრედის განსაზღვრულ ორგანულ გარემოში. ამჟამად მიღებულია უდიდესი ექსპერიმენტული მასალა, რომელიც მოწმობს ცალკეული ფერმენტის მოქმედების რეგულაციაში სუბუჯრედული სტრუქტურების, კერძოდ მემბრანების გადამწყვეტ როლზე.

აქვე უნდა აღვნიშნოთ, რომ ცოცხალი სამყაროს განვითარების, დიფერენციაციისა და ბუნებრივი შერჩევის პროცესში გამოჩენილია რეგულაციის უნიკალური მექანიზმი, რომელიც დაკავშირებულია გენეტიკური აპარატის მუშაობასთან. გენომში ჩაწერილი ინფორმაციის რეალიზაცია ხორციელდება გარკვეული სისტემების ზემოქმედებით.

ლიტერატურა

1. ქოშეთიანი პ., ზოგადი ბიოქიმიის კურსი, თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის გამომცემლობა, 1971.
 2. Бернхард С., Структура и функция ферментов. «Мир», М., 1971.
 3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. «Мир», М., 1966.
 4. Кретович В. Л., Введение в энзимологию. «Наука», М., 1974.
 5. Мосс. Д., Ферменты пер. с англ. «Мир», М., 1970.
-

ფერმენტთა კლასიფიკაცია და ნომენკლატურა

ამჟამად ცნობილია 2000-ზე მეტი ფერმენტი. მათი უმრავლესობა ახალი კლასიფიკაციის მიხედვით, რომელიც შემუშავებულია საერთაშორისო ბიოქიმიური კავშირის სპეციალური კომისიის მიერ, განაწილებულია ექვს კლასში. ეს კლასებია:

1. ოქსიდორედუქტაზები,
2. ტრანსფერაზები,
3. ჰიდროლაზები,
4. ლიაზები
5. იზომერაზები,
6. ლიგაზები (სინთეტაზები).

თანამედროვე კლასიფიკაციას საფუძვლად უდევს კატალიზებული რეაქციების ტიპი. კომისიამ დაადგინა, რომ რეაქციის ტიპებს საფუძვლად დაედოს რეაქციის ჯამური, ფორმალური ტოლობა. ცხადია, ასეთ შემთხვევაში რეაქციის ინტიმური მექანიზმი და შუალედური კომპლექსის წარმოქმნა არ არის მხედველობაში მიღებული.

რამდენადაც კლასიფიკაციას საფუძვლად დაედო ქიმიური რეაქციები, ცხადია ვერც ერთი ფერმენტი ვერ მიიღებს რაციონალურ სახელწოდებას, თუ ცნობილი არ არის მისი ქიმიური ბუნება და არაა დადგენილი მის მიერ კატალიზებული ქიმიური რეაქციის ხასიათი. ამიტომ ჭერჯირობით ზოგიერთ ფერმენტს შერჩა ტრივიალური სახელწოდება.

ოქსიდორედუქტაზების კლასში გაერთიანებულია ის ფერმენტები, რომლებიც მონაწილეობენ უანგვა-აღდგენით რეაქციებში. ტრანსფერაზების კლასი შეიცავს ფერმენტებს, რომლებსაც გადააქვთ სხვადასხვა ჯგუფი სუბსტრატის ერთი მოლეკულიდან მეორეზე. ჰიდროლაზები, ეს ისეთი ფერმენტებია, რომლებიც ააქტი-

ვებენ ჰიდროლიზურ რეაქციებს. ლიაზები კი შლიან სუბსტრატის მოლეკულებს არაჰიდროლიზური გზით და წარმოქმნიან ორმაგ ბმებს ან პირიქით, მიუერთებენ ამა თუ იმ ჯგუფებს ორმაგი ბმის შემცველ სუბსტრატებს. იზომერაზები ააქტივებენ ორგანული ნაერთების იზომერიზაციის რეაქციებს. ლიგაზების ანუ სინთეტაზების კლასში კი გაერთიანებულია ისეთი ფერმენტები, რომლებიც ააქტივებენ სინთეზის რეაქციებს, რომლებსაც თან ახლავს ატფ-ის ან ახალგაიური ტრიფოსფატის დაშლა და ენერგიის განთავისუფლება.

კლასიფიკაციის ცხრილებში თითოეულ ფერმენტს მიწერილი აქვს ოთხი ციფრისაგან შემდგარი შიფრი. შიფრში ციფრები ერთმანეთისაგან წერტილებითაა განცალკევებული.

შიფრის პირველი ციფრი გვიჩვენებს, თუ ზემოთ ჩამოთვლილი 6 კლასიდან რომელ კლასს მიეკუთვნება მოცემული ფერმენტი.

შიფრის მეორე ციფრი გამოსახავს ქვეკლასს. პირველ კლასში 14 ქვეკლასია. ოქსიდორედუქტაზების კლასში ქვეკლასი მიუთითებს დონორის იმ ჯგუფის არსებობაზე, რომელიც განიცდის დაჟანგვას.

მეორე კლასში, ე. ი. ტრანსფერაზების კლასში შიფრის მეორე ციფრი უჩვენებს იმ ჯგუფის ბუნებას, რომლის გადატანაც ხდება. მეორე კლასში 8 ქვეკლასია.

მესამე კლასში, ე. ი. ჰიდროლაზების კლასში შიფრის მეორე ციფრი გამოსახავს იმ ბმის ხასიათს, რომელიც განიცდის ჰიდროლიზს. მესამე კლასში 9 ქვეკლასია.

მეოთხე კლასში, ე. ი. ლიაზების კლასში შიფრის მეორე ციფრი გამოსახავს იმ ბმის ხასიათს, რომელიც განიცდის დაშლას. მეოთხე კლასში 5 ქვეკლასია.

მეხუთე კლასში, ე. ი. იზომერაზების კლასში. შიფრის მეორე ციფრი გამოსახავს იზომერიზაციის რეაქციის ტიპს. ამ კლასშიც 5 ქვეკლასია.

მეექვსე კლასში, ე. ი. ლიგაზების კლასში, შიფრის მეორე ციფრი გამოსახავს ახლადწარმოქმნილი ბმის ხასიათს (ტიპს). მეექვსე კლასში 4 ქვეკლასია.

შიფრის მესამე ციფრი გამოსახავს ქვექვეკლასს. ოქსიდორედუქტაზების კლასში მესამე ციფრით აღინიშნება რეაქციაში მონაწილე აქცეპტორი.

ტრანსფერაზების კლასში შიფრის მესამე ციფრი აკონკრეტებს იმ ჯგუფების ტიპს, რომლებიც განიცდიან გადატანას. მხოლოდ ფოს-

ფოტრანსფერაზების შემთხვევაში მესამე ციფრი გამოსახავს აქცეპტორის ტიპს (ოქსიდორედუქტაზების მსგავსად).

ჰიდროლაზების კლასში შიფრის მესამე ციფრი აზუსტებს იმ ბმის ტიპს, რომელიც განიცდის ჰიდროლიზს, ხოლო ლიაზების კლასში იგი აზუსტებს მოსახლეჩი ჯგუფის ბუნებას. იზომერაზების კლასში შიფრის მესამე ციფრი აკონკრეტებს გარდაქმნილი სუბსტრატების, ხოლო ლიგაზების კლასში — წარმოქმნილი ნაერთების ბუნებას.

შიფრის მეოთხე ციფრი წარმოადგენს ფერმენტის რიგით ნომერს მოცემულ ქვექვეყლასში. შიფრი 1. 1. 1. 1. მიკუთვნებული აქვს ალკოჰოლდეჰიდროგენაზას და ნიშნავს, რომ იგი მოთავსებულია 1 კლასში, შეიცავს დასაყენებ CH—OH ჯგუფებს და, რომ წყალბადების აქცეპტორია ნაღ-ი და რომ იგი ამ ქვექვეყლასის პირველი ფერმენტია.

ქვეყლასები და ქვექვეყლასები ზოგიერთ შემთხვევაში აღინიშნებიან ციფრით 99. იგი ტოლფასია სიტყვისა „და სხვა“. ეს გაკეთდა იმიტომ, რომ ქვეყლასებში და ქვექვეყლასებში დატოვებული ყოფილიყო ადგილი იმ ფერმენტებისათვის, რომლებიც აღმოჩენილი იქნება მომავალში.

ფერმენტების ზემოთ მოხსენებული კლასიფიკაცია და ნუმერაცია არ ქმნის დაბრკოლებას იმ ფერმენტებისათვის, რომლებიც მომავალში იქნება აღმოჩენილი. ყოველი ახლადაღმოჩენილი ფერმენტი მოთავსდება შესაბამისი ქვექვეყლასის ბოლოში და არ დაარღვევს ფერმენტების ადრინდელ ნუმერაციას. მოსალოდნელი უხერხულობა მხოლოდ ისაა, რომ ფერმენტი შეიძლება არ მოთავსდეს უშუალოდ იმ ფერმენტის გვერდზე რომელიც თვისებებით მასთან ახლოს დგას. საჭიროების შემთხვევაში შეიძლება დამატებული იქნას კლასები, ქვეყლასები და ქვექვეყლასები.

განხილულ კლასიფიკაციაში ფერმენტები წარმოდგენილი არიან ორნაირი სახელწოდებებით. ერთია სისტემატიკური (რაციონალური), მეორე კი ტრივიალური (სამუშაო). სისტემატიკური სახელწოდება ზუსტად გამოსახავს ფერმენტს და შეძლებისდაგვარად სრულად ასახავს მის მიერ კატალიზებული რეაქციის ტიპს. ტრივიალური სახელწოდება — ეს შედარებით მოკლე და ამდენად არაზუსტი, მაგრამ მიღებული და გავრცელებული, ასე ვთქვათ, ყოველდღიური სახმარი სახელწოდებაა.

ფერმენტებისადმი მიძღვნილ სტატიებსა და რეფერატებში, ე. ი. მეცნიერულ შრომებში, ფერმენტის პირველად ხსენების დროს

აუცილებლად უნდა იქნას მითითებული ფერმენტის შიფრი და სისტემატიკური სახელწოდება. შემდეგ დასაშვებია ტრივიალური სახელწოდების ხმარება. ამავე დროს სასურველია ამ ფერმენტის ბიოლოგიური წყაროს აღნიშვნაც.

საერთაშორისო ბიოქიმიური კავშირის სპეციალური კომისიის მიერ შემუშავებული ფერმენტების კლასიფიკაცია და ნომენკლატურა წარმოადგენს დიდ ცხრილს. ფერმენტთა სია არ არის სრული. ზოგიერთი ფერმენტი უბრალოდ გამოჩენილია, ზოგიერთი სპეციალურად არ არის შეტანილი. ეს უმეტეს შემთხვევაში ისეთ ფერმენტებს შეეხებათ, რომელთა მიერ კატალიზებული რეაქციების ხასიათი არ არის ზუსტად დადგენილი. ამ სიის შედგენის, ე. ი. 1964 წლის შემდეგ მრავალი ფერმენტი იქნა აღმოჩენილი და მრავალი ფერმენტის მოქმედების ხასიათიც იქნა დადგენილი და დაზუსტებული.

თუ 1964 წელს შემუშავებული კლასიფიკაციის მიხედვით ფერმენტების რაოდენობა შეადგენდა 874, 1972 წელს კლასიფიცირებული ფერმენტების რიცხვმა მიაღწია 1770.

განვიხილოთ ფერმენტების სისტემატიკური და ტრივიალური სახელწოდებების წარმოებისა და ხმარების ზოგიერთი ზოგადი წესი. კომისიის მიერ სულ რეკომენდირებულია 31 წესი. ჩვენ შევეხებით მხოლოდ ძირითადს.

როდესაც სუბსტრატის როლში გამოდის რომელიმე მჟავა, მაშინ ფერმენტის სახელწოდება წარმოდგება ამ მჟავას ანიონის სახელწოდებიდან (დაბოლოებით „ატ“), მაგალითად, ლაქტატდეჰიდროგენაზა და არა რძის მჟავას დეჰიდროგენაზა ან ლაქტიკოდეჰიდროგენაზა. ამ წესიდან არის გამონაკლისიც, მაგალითად, 2-ოქსომჟავების კარბოქსი-ლიაზები (ფკ. 4- 1. 1. 1).

ფერმენტის სახელწოდება, როგორც წესი, შედგება ორი ნაწილისაგან. პირველი აღნიშნავს სუბსტრატის სახელწოდებას (ბიმოლეკულური რეაქციებისათვის სუბსტრატების სახელწოდებას), რომლებიც გამოყოფილი არიან ორი წერტილით ინტერვალის გარეშე. მეორე ნაწილი, რომელიც მთავრდება „აზა“-თი უჩვენებს რეაქციის ხასიათს. პირველი და მეორე ნაწილი ერთმანეთს უკავშირდება გრძელი შემაერთებელი ხაზით (ბმის ხაზით). მაგალითად, ფერმენტის, შიფრით 1. 1. 1. 1, სისტემატიკური სახელწოდებაა ალკოჰოლ: ნად—ოქსიდოროდუქტაზა, ხოლო ტრივიალური—ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა.

სისტემატიკურ სახელწოდებაში, იმისათვის, რათა წარმოდგენა ვიქონიოთ რეაქციის ხასიათზე, ჩართულია ისეთი სპეციალუ-

რი სიტყვები როგორცაა: ოქსიდორედუქტაზა, რაცემაზა, იზომერაზა, ეპიმერაზა, ლიაზა, ლიგაზა, ჰიდროლაზა, ტრანსფერაზა, მუტაზა.

სუფიქსი „აზა“ არ უნდა ემატებოდეს უშუალოდ სუბსტრატის სახელწოდებას. ტრივიალური სახელწოდებების წარმოება შეიძლება კიდევ უფრო მრავალფეროვანი ტერმინებით, მაგალითად, ტაუტომერაზა, კინაზა, ფოსფორილაზა, რედუქტაზა, ოქსიდაზა, დეჰიდროგენაზა, პეროქსიდაზა და ა. შ. სუბსტრატზე დაბოლოება „აზა“-ს დამატება აღნიშნავს ჰიდროლიზურ ფერმენტს. არის გამოწვევის, მაგალითად რიბონუკლეაზა (ფკ 2. 7. 7. 16).

თუ ჯამური რეაქცია მოიცავს 2 სხვადასხვა გარდაქმნას, მაგალითად დეჰიდრირებასა და დეკარბოქსილირებას, მაშინ მეორე ფუნქცია უნდა მიეთითოს სისტემატიკური სახელწოდების ბოლოს და ჩაისვას ფრჩხილებში. მაგალითად, ფერმენტის, შიფრით 1. 1. 1. 40, სისტემატიკური სახელწოდება იქნება:

L-მალატ: ნადფ—ოქსიდორედუქტაზა (მადეკარბოქსილირებელი).

თუ ფერმენტთა ჯგუფი ამჟღავნებს ძალზე მსგავს სპეციფიკურობას, როგორც წესი, ისინი სიაში შეიტანებიან ერთი შიფრით და ერთი სახელწოდებით. ხოლო თუ სპეციფიკურობის მხრივ ისინი საგრძნობლად განსხვავდებიან, მაშინ შეიძლება შეტანილ იქნას სიაში სხვადასხვა შიფრით (ასეა მაგალითად, ფერმენტებისათვის შიფრი 1. 2. 1. 4 და 1. 2. 1. 7).

ცალკეული კლასებისათვის მოწოდებულია შემდეგი წესები:
კლასი 1. ოქსიდორედუქტაზები. ყველა ფერმენტი, რომელიც აკატალიზებს ქანგვა-აღდგენით რეაქციებს, სისტემატიკურ სახელწოდებაში ერთიანდება ერთი ტერმინით — „ოქსიდორედუქტაზები“. მათი წარმოების ფორმა ასეთია:

„დონორი: აქცეპტორი—ოქსიდორედუქტაზა“.

ოქსიდორედუქტაზებში ნად-ი და ნადფ-ი აღინიშნებიან როგორც აქცეპტორები (გარდა 1. 5 ჯგუფისა, რომელიც განსაკუთრებულ შემთხვევას წარმოადგენს). იმ შემთხვევაში, როდესაც ფერმენტი მოქმედებს ორივე კოფერმენტთან სისტემატიკურ სახელწოდებაში ეს აღინიშნება ასე „ნად(ფ)“.

თუ ჰემარიტი აქცეპტორი დაუდგენელია და ცნობილია რეაქციები მხოლოდ ხელოვნურ აქცეპტორებთან, სახელწოდებაში შედის სიტყვა „აქცეპტორი“, რომელიც ფრჩხილებშია ჩასმული. მაგალითად ფერმენტის, შიფრით 1. 3. 99. 1, სახელწოდებაა: სუქცინატ: (აქცეპტორი) — ოქსიდორედუქტაზა.

როდესაც ოქსიდორედუქტაზები აწარმოებენ 2 დონორის ერთდროულ (შეუღლებულ) დაქანგვას, რომელსაც თან სდევს ჟანგბადის ჩართვა ერთ-ერთი დონორის მოლეკულაში, სახელწოდება ასე იწარმოება: დონორი, დონორი: ჟანგბადი—ოქსიდორედუქტაზა (მაჰიდროქსილირებელი) (ჯგუფი 1. 14.).

კლასი 2. ტრანსფერაზები. ამ კლასში ფერმენტების სახელწოდების წარმოების ფორმა ასეთია: დონორი: აქცეპტორი—ტრანსპორტირებადი ჯგუფი-ტრანსფერაზა“. მაგალითად, ატფ: აცეტატ—ფოსფოტრანსფერაზა (2. 7. 2. 1).

ტრივიალური სახელწოდება „ამინოტრანსფერაზა“ შეიძლება შეცვლილ იქნას „ტრანსამინაზით“. ამ კლასში „კინაზა“ (და არა „ფოსფოკინაზა“) გამოსაჩვენებს ატფ-დან ფოსფორის მქონის ნაშთის გადატანას.

ატფ-ი კინაზების სახელწოდებაში ყოველთვის მითითებულია როგორც დონორი, ხოლო 2—ოქსოგლუტარის მქონე ამინოტრანსფერაზების შემთხვევაში, როგორც აქცეპტორი.

კლასი 3. ჰიდროლაზები. სახელწოდება იწარმოება ასე: სუბსტრატი — ჰიდროლაზა. როდესაც ზდება სპეციფიკური ფერმენტების მიერ განსაზღვრული ჯგუფების მოხლეჩა, ჯგუფის სახელწოდება აისახება სისტემატიკურ სახელწოდებაში პრეფიქსის სახით, მაგალითად, „აღენოზინ—ამინოჰიდროლაზა“ (3. 5. 4. 4). როგორც აღენიშნეთ, სუბსტრატის სახელწოდებანზე „აზა“-ს პირდაპირი მიერთება გამოხატავს ჰიდროლაზას. ცალკეული ჰიდროლაზებისათვის არსებობს სპეციალური ტერმინები, მაგალითად, ფოსფატაზები, დეჰამინაზები.

კლასი 4. ლიაზები. რათა აისახოს რეაქციათა ტიპი ამ კლასში გამოყენებულია ისეთი პრეფიქსები, როგორიცაა „ჰიდრო“, „ამინო“ და სხვა. მაგალითად, „L-მალატ—ჰიდრო-ლიაზა“ (4. 2. 1. 2). დეკარბოქსილაზები განიხილებიან როგორც კარბოქსი-ლიაზები. ლიაზას წინ ყოველთვის ესმის დეფისი, რათა არ ავუზრიოთ ტერმინებში ჰიდროლაზა, კარბოქსილაზა.

შენარჩუნებულია ტრივიალური სახელწოდება „დეკარბოქსილაზა“, „ალდოლაზა“ და ა. შ. ჰიდრო-ლიაზებისათვის იხმარება „დეჰიდრატაზები“ და არა „დეჰიდრაზები“. ამ კლასში სიტყვა სინთეტაზა არ უნდა ვიხმაროთ (გარდა მე-6 კლასისა), და თუ იხმარებოდა უნდა შეიცვალოს სიტყვებით „სინთაზა“, რათა ხაზი გაესვას სინთეზის ელემენტს კატალიზებულ რეაქციაში (4. 2. 1. 22 და 4. 2. 1. 23).

კლასი 5. იზომერაზები. ფერმენტთა უმრავლესობის

ტრივიალური სახელწოდებები ამ კლასში სისტემატიკურის მსგავსია.

იზომერიზაციის ტიპის მინიშნება ხდება პრეფიქსების საშუალებით, მაგალითად, „ფენილპირუვატ—კეტონოლ-იზომერაზა“ (5. 3. 2. 1), მალეინატ — ცის-ტრანს-იზომერაზა“ (5. 2. 1. 1);

იზომერაზებს, რომლებიც აკატალიზებენ ასიმეტრიული ჯგუფების ინვერსიას. ეწოდებათ „რაცემაზები“ ან „ეპიმერაზები“ იმისდამიხედვით ერთი თუ მეტი ასიმეტრიული ცენტრია სუბსტრატის მოლეკულაში. მაგალითად, ფერმენტი 5. 1. 1. 5 და 5. 1. 1. 7, პირველს ეწოდება ლიზინრაცემაზა, მეორეს კი 2,6-L,L-დიამინოპიმელატეპიმერაზა.

კლასი 6. ლიგაზები (სინთეტაზები). ტერმინი ლიგაზები იხმარება იმ ფერმენტებისათვის, რომლებიც მოქმედებენ როგორც ნუკლეოზიდფოსფატების გარეშე, ისე მათი მონაწილეობისას. სინთეტაზები კი ისეთი ფერმენტებისათვის, რომლებიც არ საჭიროებენ ნუკლეოზიდფოსფატებს. ამ კლასის ფერმენტების საერთო სახელწოდებაა ლიგაზები (ცხადია მოიცავს სინთეტაზებსაც).

გარდა ამისა, ახალი ნომენკლატურა დაფუძნებულია სუბსტრატის სახელწოდებაზე და არა პროდუქტის, როგორც ამას სინთეტაზების სახელწოდებანი გამოხატავენ, მაგალითად გლუტამინსინთეტაზის (6. 3. 1. 2) ტრივიალურ სახელწოდებაში შენარჩუნებულია სახელწოდება სინთეტაზა, მისი ფართოდ გავრცელებისა და დამკვიდრების გამო.

სისტემატიკური სახელწოდებანი იწარმოება შემდეგნაირად:

„X:Y—ლიგაზა (აღფ)“, სადაც X და Y აღნიშნავენ შესაერთებელ მოლეკულებს. ფრჩხილებში აღნიშნულია ნივთიერება, რომელიც წარმოიქმნება ტრიფოსფატიდან. ჩვეულებრივ იგი აღფ-ი ან ამფ-ია. მაგალითად გლუტამინსინთეტაზის სისტემატიკური სახელწოდებაა: L-გლუტამატ: ამონიაკ—ლიგაზა (აღფ-ი)“. ხოლო ასპარაგინ-სინთეტაზას (6. 3. 1. 1) — L-ასპარტატ: ამონიაკ-ლიგაზა (ამფ-ი)“. იმ სპეციალურ შემთხვევაში, როდესაც გლუტამინი გამოდის ამონიაკის დონორის როლში, შეიძლება ვიხმაროთ ტერმინი „ამიდოლიგაზა“ (6. 3. 5 ჯგუფი).

და ბოლოს უნდა აღვნიშნოთ, რომ ინგლისურად და ზოგიერთ სხვა ენებზე სუბსტრატის და რეაქტივის ტიპის აღმნიშვნელი სიტყვები, ე. ი. ფერმენტების სახელწოდება იწერება ცალ-ცალკე, მაგალითად, Malate dehydrogenase, მაშინ როცა რუსულად და ქარ-

თულად მიღებულია დაიწეროს ერთად Малатдегидрогеназа, მა-
ლატდეჰიდროგენაზა

ლიტერატურა

1. Номенклатура ферментов. Итоги науки. Серия биологическая химия.
Перевод с англ. под ред. А. Е. Браунштейна, М., Изд. ВИНТИ,
1966.

თ ა ვ ი

ფერმენტების მოქმედების კინეტიკა

რეაქციის სიჩქარე, მოლავლურობა და რიგი

კინეტიკა არის მოძღვრება ქიმიურ და ფერმენტულ რეაქციათა სიჩქარეზე და მასზე სხვადასხვა ფაქტორების გავლენის შესახებ.

ქიმიური თერმოდინამიკის საშუალებით შეიძლება გავიანგარიშოთ სისტემის თავისუფალი ენერგიის ცვლილება, რეაქციის წონასწორული მუდმივა და სხვა, ე. ი. შეიძლება წინასწარ გავიანგარიშოთ აღძვრება თუ არა რეაქცია, რა მიმართულებით წავა იგი და რამდენად ღრმად ჩატარდება ქიმიური გარდაქმნა. მაგრამ როდის დაიწყება ქიმიური რეაქცია, რა სიჩქარით წარიმართება და რა დრო დაჭირდება წონასწორული მდგომარეობის მიღწევას, ამაზე პასუხს უკვე ქიმიური კინეტიკა იძლევა, რადგან დრო არ არის თერმოდინამიკური სიდიდე.

იმისათვის, რომ შევძლოთ რეაქციის რეგულირება, პირველ რიგში, საჭიროა ქიმიური პროცესების მიმდინარეობის კანონების შესწავლა და რეაქციის მექანიზმის გარკვევა.

ქიმიური რეაქციის სიჩქარე წარმოადგენს მორეაგირე ნივთიერებათა კონცენტრაციის ცვლილებას დროის გარკვეულ ერთეულში. ცხადია, რეაქციის კეშმარიტი სიჩქარე v წარმოადგენს კონცენტრაციის უსასრულოდ მცირე dc ცვლილებას დროის უსასრულოდ მცირე dt მონაკვეთში

$$v = - \frac{dc}{dt} \quad (1)$$

რადგან ეს თანაფარდობა გამოისახავს აღებული ნივთიერების კონცენტრაციის შემცირებას, მას უარყოფითი ნიშანი აქვს. როდესაც რეაქციის სიჩქარე გამოისახება წარმოქმნილი პროდუქტის მძებდვით, მინუსი ნიშანი ისპობა.

მოქმედ მასათა კანონის საფუძველზე რეაქციის სიჩქარე v აქტიური C მასის პროპორციულია

$$v = kc \quad (2)$$

სადაც k — პროპორციულობის კოეფიციენტია. აქტიურ მასად იგულისხმება არა მორეაგირე ნივთიერებათა სრული რაოდენობა, არამედ მათი მოლური კონცენტრაცია. როდესაც რეაქციაში ორი ან მეტი ნივთიერება მონაწილეობს, მაშინ რეაქციის სიჩქარე, მოქმედ მასათა კანონის თანახმად, მორეაგირე ნივთიერებათა აქტიური მასების ნამრავლის პროპორციულია

$$v = kc_1 c_2 \quad (3)$$

(1) და (2) ფორმულების შედარებით, მივიღებთ

$$-\frac{dc}{dt} = kc \quad (4)$$

რეაქციის დროს მორეაგირე ნივთიერებათა კონცენტრაციები მცირდება, ამიტომ მცირდება რეაქციის სიჩქარეც და ბოლოს, იგი ნულს უახლოვდება, ხოლო პროპორციულობის კოეფიციენტი რეაქციის მთელი მსვლელობისას უცვლელი რჩება; ამიტომ მას რეაქციის სიჩქარის მუდმივა ეწოდება. რეაქციის სიჩქარის k — მუდმივა წარმოადგენს დინამიკურ კონსტანტას. რომლის დახმარებითაც შეიძლება რეაქციის დახასიათება. როცა მორეაგირე ნივთიერებათა კონცენტრაციები ერთის ტოლია ($c=1$), მაშინ სიჩქარის მუდმივა რიცხობრივად რეაქციის სიჩქარის ტოლია.

პირდაპირი რეაქციებისათვის სიჩქარის მუდმივა აღინიშნება k_{+1} , ხოლო შებრუნებული რეაქციებისათვის k_{-1} , მაგალითად რეაქციისათვის

$$A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} B$$

პირდაპირი რეაქციის სიჩქარე ტოლი იქნება

$$v_{+1} = -\frac{d[A]}{dt} = k_{+1}[A] - k_{-1}[B] \quad (5)$$

ვინაიდან წონასწორობისას პირდაპირი და შებრუნებული რეაქციების სიჩქარეები ერთნაირია, ამიტომ კონცენტრაციის ცვლილება ნულის ტოლია, ე. ი.

$$\frac{d[A]}{dt} = 0 \quad (6)$$

ლა

$$k_{+1}[A] = k_{-1}[B]$$

საიდანაც

$$\frac{[B]}{[A]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = K_{\text{წ}} \quad (6)$$

სადაც $k_{\text{წ}}$ — წონასწორობის მუდმივას წარმოადგენს.

ქიმიური გარდაქმნის მიმდინარეობა დამოკიდებულია მოლეკულების იმ რიცხვზე, რომელთა ურთიერთქმედების დროსაც რეაქცია ხდება. ვანტ-ჰოფმა (1884 წ.) ამ გარდაქმნაში მონაწილე მოლეკულების რიცხვი საფუძვლად დაუდო რეაქციების „ბუნებრივ“ კლასიფიკაციას. მან შემოიტანა კინეტიკაში ცნება მონო-, ბი- და ტრიმოლეკულური რეაქციების შესახებ.

ყოველი რთული რეაქცია შეიძლება განვიხილოთ როგორც მარტივი რეაქციების ერთობლიობა, სადაც ყოველ მარტივ რეაქციაში შედის ერთი, ორი ან სამი მოლეკულა. ამ ელემენტარულ რეაქციებში მონაწილე მოლეკულების რიცხვის მიხედვით შეიძლება ჩამოვყალიბოთ რეაქციის მარტივი ტიპები, როგორიცაა მონო-, ბი- და ტრიმოლეკულური რეაქციები.

როდესაც ქიმიურ გარდაქმნას განიცდის ერთი მოლეკულა, რეაქცია მონომოლეკულურია.

მონომოლეკულური რეაქციების სიჩქარე, მოქმედ მასათა კანონის თანახმად, მოცულობის ერთეულში მყოფი მოლეკულების რიცხვის პირველი ხარისხის პირდაპირპროპორციულია

$$-\frac{dc}{dt} = kc \quad (7)$$

როცა ქიმიური რეაქციის ელემენტარული აქტი ორი მოლეკულის ერთდროულ გარდაქმნასთან არის დაკავშირებული, რეაქცია ბიმოლეკულურია.

ბიმოლეკულური რეაქციების სიჩქარე მოცულობის ერთეულში მყოფი ორივე სახის მოლეკულების რიცხვის წამრავლის პროპორციულია

$$-\frac{dc}{dt} = kc_1c_2 \quad (8)$$

როცა რეაქციაში ერთი სახის მოლეკულები შედიან, ე. ი. როდესაც $A=B$, მაშინ ბიმოლეკულური რეაქციის სიჩქარე მოცუ-

ლობის ერთეულში მყოფი მოლეკულების რიცხვის კვადრატის პროპორციულია

$$-\frac{dc}{dt} = kc^2 \quad (9)$$

მარტივი ტიპის რეაქციებიდან ბიმოლეკულური რეაქციები ყველაზე ხშირია.

როცა ქიმიური გარდაქმნის აქტი სამი მოლეკულის მონაწილეობასთან არის დაკავშირებული, ასეთი რეაქციები ტრიმოლეკულურია.

ცხადია, ტრიმოლეკულური რეაქციის სიჩქარე მოცულობის ერთეულში მყოფი სამივე მოლეკულების რიცხვის ნამრავლას პროპორციული იქნება

$$-\frac{dc}{dt} = kc_1c_2c_3 \quad (10)$$

გაზების კინეტიკური თეორიის თანახმად ატმოსფერულ წნევასა და ოთახის ტემპერატურაზე სამი მოლეკულის ერთდროული დაჯახების ალბათობა ათასჯერ უფრო ნაკლებია, ვიდრე ორი მოლეკულისა. ამიტომაც ტრიმოლეკულური რეაქციები შედარებით იშვიათად გვხვდება. ტეტრამოლეკულური და, მით უმეტეს პოლიმომოლეკულური რეაქციები, არაა ცნობილი.

ზოგადად, მრავალი რეაქციის სიჩქარე შეიძლება გამოვსახოთ განტოლებით

$$-\frac{dc}{dt} = kc^p c_q^2 \quad (11)$$

სადაც ხარისხის მაჩვენებელთა ჯამი $p+q$ გამოსახავს რეაქციის რიგს. რეაქციის რიგი არის რეაქციაში შემავალი ნივთიერებების კონცენტრაციათა ხარისხის მაჩვენებლების ჯამი სიჩქარის ექსპერიმენტულ განტოლებაში. რეაქციის რიგი შეიძლება განისაზღვროს წილადი რიცხვითაც.

ამრიგად, ელემენტარულ რეაქციაში შემავალი მოლეკულების რიცხვის მიხედვით არჩევენ მონო-, ბი- და ტრიმოლეკულურ რეაქციებს, ხოლო კომპონენტების კონცენტრაციების ხარისხის მაჩვენებლების მიხედვით კი ნულოვან, პირველი, მეორე, მესამე და წილადი რიგის რეაქციებს.

პირველი რიგის რეაქციების სიჩქარე ყოველ მომენტში ჯერ კიდევ დაუშლელი, გარდაუქმნელი ნივთიერების კონცენტრაციის

პროპორციულია. პირველი რიგის რეაქციის სიჩქარის მუდმივა გამოიხატება განტოლებით:

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} = \frac{2,303}{t} \lg \frac{a}{a-x} \quad (12)$$

მისი განზომილებაა $[\text{წთ}^{-1}]$.

თუ მორეაგირე ნივთიერება აღებულია ისეთი რაოდენობით, რომ მისი კონცენტრაცია რეაქციის მსვლელობისას პრაქტიკულად არ იცვლება, მაშინ რეაქციის სიჩქარე მუდმივი იქნება და წარმოქმნილი პროდუქტის რაოდენობა დამოკიდებული იქნება მხოლოდ რეაქციის ხანგრძლივობაზე. ასეთ რეაქციებს ნულოვანი რიგის რეაქციები ეწოდებათ. ნულოვანი რიგის რეაქციების სიჩქარის მუდმივა გამოიხატება განტოლებით:

$$k_0 = \frac{x}{t} \quad (13)$$

განზომილება $[\text{მოლი. წთ}^{-1}]$.

მეორე რიგის რეაქციების სიჩქარის მუდმივა გამოიხატება განტოლებით:

$$k_2 = \frac{1}{t(a-b)} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} = \frac{2,303}{t(a-b)} \lg \frac{b(a-x)}{a(b-x)} \quad (14)$$

განზომილებაა $[\text{მოლი}^{-1}. \text{წთ}^{-1}]$.

როცა $a=b$ განტოლება (14) ასეთ სახეს ღებულობს:

$$k_2 = \frac{1}{t} \frac{x}{a(a-x)} \quad (15)$$

მოცემულ განტოლებებში t დროა, a და b საწყისი ნივთიერებების რაოდენობა, x — t დროისათვის გარდაქმნილი ნივთიერების რაოდენობა, $(a-x)$ და $(b-x)$ დარჩენილი, გარდაუქმნელი ნივთიერების რაოდენობაა t მომენტისათვის. (12), (13) და (14) განტოლებებიდან შეიძლება გაანგარიშებულ იქნას x , ე. ი. t მომენტისათვის საწყისი ნივთიერებების გარდაქმნილი რაოდენობა, აგრეთვე გამოითვალოს ნივთიერების გარდაქმნის ხარისხი

$$\left(\frac{x}{a} \right).$$

ნახევრად გარდაქმნის პერიოდი (τ) არის ის დროს, რომლის განმავლობაშიც მორეაგირე ნივთიერების რაოდენობა განახევრდება, ე. ი. როდესაც $x = \frac{a}{2}$. მაგალითად, პირველი რიგის რეაქციის განტოლებაში:

$$\tau = \frac{1}{k} \ln \frac{a}{a-a/2} = \frac{1}{k} \ln \frac{a}{a/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{2,303}{k} \lg 2 = \frac{0,693}{k} \quad (16)$$

ზემოთ მოყვანილი განტოლებიდან ჩანს, რომ პირველი რიგის რეაქციის შემთხვევაში ნივთიერების ნახევრად გარდაქმნის პერიოდი დამოკიდებულია მხოლოდ რეაქციის სიჩქარის მუდმივას მნიშვნელობაზე და არ არის დამოკიდებული საწყისი კონცენტრაციაზე.

მეორე რიგის რეაქციებისათვის, მაგალითად განტოლება (15)-ის შემთხვევაში ნახევრად გარდაქმნის პერიოდი

$$\tau = \frac{1}{k} \frac{a/2}{a(a-a/2)} = \frac{1}{ka} \quad (17)$$

როგორც ჩანს, მეორე რიგის რეაქციის მიმდინარეობისას მორეაგირე ნივთიერებათა ნახევრად გარდაქმნის პერიოდი საწყისი კონცენტრაციის უკუპროპორციულია.

რეაქციის რიგის დადგენის ექსპერიმენტული გზები

ხშირად რეაქციის რიგი არ შეესაბამება რეაქციის სტექიომეტრულ განტოლებას; იგი უნეტეს შემთხვევაში უფრო დაბალია, ვიდრე ეს რეაქციების განტოლებებიდან გამომდინარეობს.

განვიხილოთ რეაქციის რიგის დადგენის ძირითადი მეთოდები:

1. რეაქციის სიჩქარის განსაზღვრის შედეგად მიღებული ექსპერიმენტული მონაცემები ჩაისმება ნულოვანი, პირველი, მეორე რიგის განტოლებებში და გაირკვევა თუ რომელი რიგის განტოლებაში ღებულობს სიჩქარის მუდმივა უცვლელ მნიშვნელობებს. თუ ამ გზით გაანგარიშებული k —მუდმივობას იჩენს ცდომილების ფარგლებში, რეაქციის რიგის დასადგენი განტოლება სწორედ ყოფილა შერჩეული. ეს მეთოდი ყველაზე მარტივია და სავსებით დამაჯერებელ შედეგებს იძლევა.

2. საზღვრავენ საწყისი a კონცენტრაციის ნახევრად გარდაქმნის ან მეათედ გარდაქმნის პერიოდს. პირველი რიგის რეაქციის შემ-
5. გ. ტყემალაძე, გ. კვესიტაძე

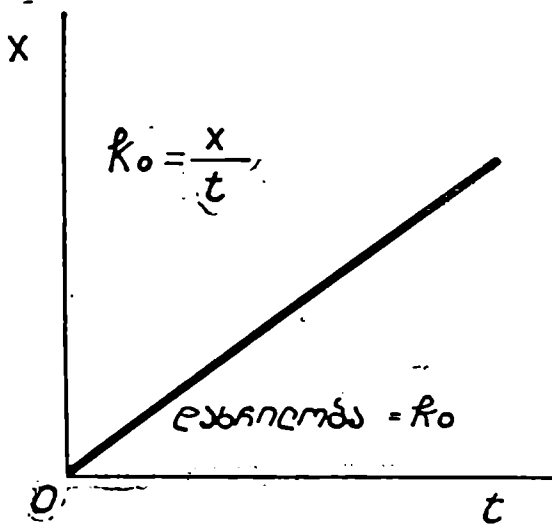
თხვევაში საწყისი a კონცენტრაციის 2-ჯერ ან 10-ჯერ გადიდებისას ნახევრად გარდაქმნის და მეათედ გარდაქმნის პერიოდი τ არ იცვლება, რადგან, როგორც აღვნიშნეთ ამ დროს გარდაქმნის პერიოდი არ არის დამოკიდებული საწყისი ნივთიერების კონცენტრაციაზე

$$\left(\tau = \frac{\ln 2}{k} \right).$$

მაგრამ მეორე რიგის რეაქციების შემთხვევაში საწყისი კონცენტრაციების 2-ჯერ ან 10-ჯერ გაზრდა გამოიწვევდა τ -ს 2-ჯერ და 10-ჯერ შემცირებას, შესაბამისად

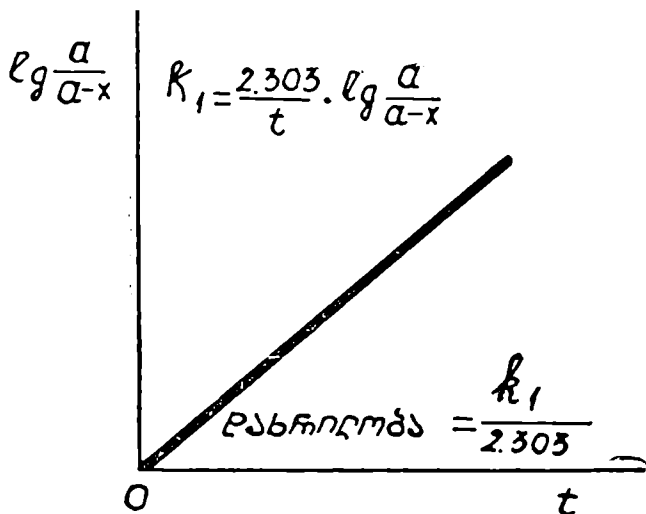
$$\left(\tau = \frac{1}{ka} \right).$$

კინეტიკური კანონზომიერებების გრაფიკული გამოსახვა ნულოვანი, პირველი და მეორე რიგის რეაქციებისათვის მოცემულია სურათებზე 4—6.

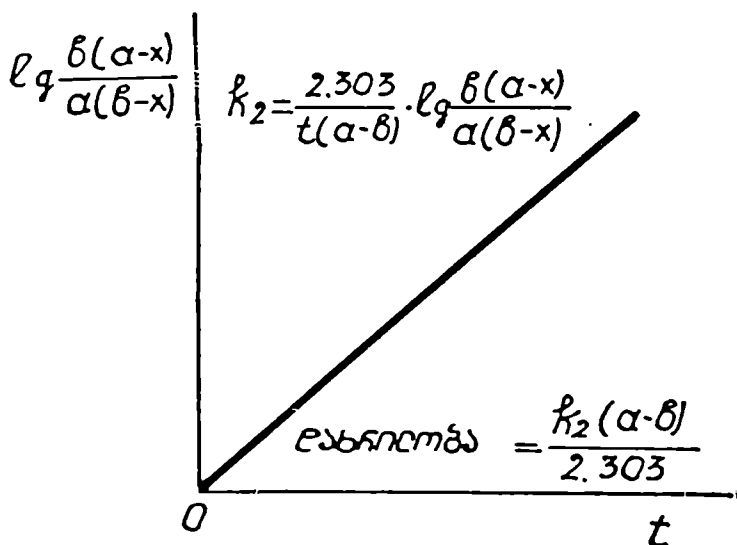


სურ. 4. კინეტიკური კანონზომიერების გრაფიკული გამოსახვა ნულოვანი რიგის რეაქციებისათვის.

ცნობილია, რომ წრფის განტოლებაა $y = ax + b$, სადაც a წრფის დახრის კუთხის ტანგენსია, ე. ი. $a = \text{tg} \alpha$. ნულოვანი, პირველი და მეორე რიგის რეაქციების განტოლებებიც წრფის განტოლებებს წარმოადგენენ და ამიტომ შესაძლებელია ამ წრფეების დახრილობის გაანგარიშებაც.



სურ. 5. კინეტიკური კანონზომიერების გრაფიკული გამოსახვა პირველი რიგის რეაქციებისათვის.

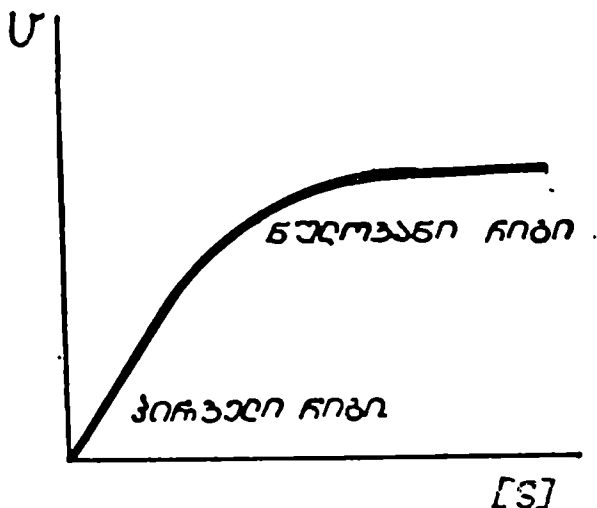


სურ. 6. კინეტიკური კანონზომიერების გრაფიკული გამოსახვა მეორე რიგის რეაქციებისათვის.

ცხადია, რომ დახრილობის მნიშვნელობის გრაფიკულად გაანგარიშების შემდეგ შესაძლებელი გახდება რეაქციათა სიჩქარის მუდმივების მნიშვნელობის გაანგარიშებაც.

ფერმენტული რეაქცია კოორდინატებში v — $[S]$, როგორც ცნობილია, გამოისახება ჰიპერბოლური მრუდით.

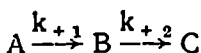
ფერმენტული რეაქცია სუბსტრატის დაბალ კონცენტრაციებზე მიმდინარეობს როგორც პირველი რიგის რეაქცია (სიჩქარე დამოკიდებულია სუბსტრატის კონცენტრაციაზე), მაგრამ სუბსტრატის საკმაოდ მაღალ კონცენტრაციებზე რეაქცია გადადის ნულოვანი რიგის რეაქციაში (სიჩქარე აღარ არის დამოკიდებული სუბსტრატის კონცენტრაციაზე (სურ. 7).



სურ. 7. ფერმენტული რეაქციის მიმდინარეობის გრაფიკული გამოსახვა.

ფერმენტულ რეაქციებში, როგორც წესი, მონაწილეობს ორზე მეტი ნივთიერება, მაგალითად ორი სუბსტრატი და ფერმენტი, ან ფერმენტი, კოფერმენტი და სუბსტრატი.

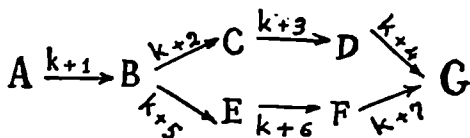
ქიმიურ კინეტიკაში განიხილება თანმიმდევრულად მიმდინარე რთული რეაქციები



ანდა პარალელურად მიმდინარე რეაქციები



ასევე თანმიმდევრულ-პარალელური რეაქციები, მაგალითად ასეთი ტიპის



ასეთ შემთხვევაში რეაქციის თითოეული საფეხური ან სტადია ხასიათდება სიჩქარის საკუთარი მუდმივით, ხოლო მთელი რეაქციის ჯამური სიჩქარე ისაზღვრება ამ მუდმივების შეფარდებით. ფერმენტული რეაქციები თავისი მექანიზმებით მიეკუთვნებიან სწორედ რთული პროცესების ასეთ რიგს.

ჩვენს მიერ განხილული რეაქციები იყო ცალმხრივი და კინეტიკური კანონზომიერებებიც მიღებული იყო ცალმხრივი რეაქციებისათვის, ე. ი. ისეთი რეაქციებისათვის, რომლებიც ბოლომდე მიდიან. მაგრამ პრაქტიკულად არც ერთი რეაქცია არ მიდის ბოლომდე და საბოლოოდ მყარდება წონასწორობა პირდაპირ და უკუ რეაქციებს შორის. უნდა აღინიშნოს, რომ კინეტიკური კანონზომიერებანი შექცევადი რეაქციებისათვის იგივე რჩება.

აქტივაციის ენერგია

ქიმიური კინეტიკის ერთ-ერთ ძირითად საკითხს წარმოადგენს ტემპერატურის გავლენა რეაქციის სიჩქარეზე. მდიდარი ექსპერიმენტული მასალის საფუძველზე ვანტ-ჰოფმა აღმოაჩინა ზოგადი ხასიათის კანონზომიერება, რომლის თანახმად, ტემპერატურის ყოველი 10 გრადუსით გადიდებისას რეაქციის სიჩქარე იზრდება 2—3-ჯერ.

რიცხვს, რომელიც გამოსახავს თუ რამდენჯერ იზრდება რეაქციის სიჩქარე სისტემის 10 გრადუსით გადიდებისას, რეაქციის სი-

ჩქარის ტემპერატურული (სითბური) კოეფიციენტი ეწოდება და ასე გამოისახება

$$Q_{10} = \frac{k_{T+10^\circ}}{k_T} \quad (18)$$

სადაც k_T რეაქციის სიჩქარის მუდმივაა. ე. ი. ტემპერატურის არითმეტიკული პროგრესიით მატებისას რეაქციის სიჩქარე გეომეტრიული პროგრესიით იზრდება. უნდა აღინიშნოს, რომ Q_{10} ფერმენტული რეაქციებისათვის არის 1—2-ის ტოლი.

1889 წელს ს. არენიუსმა გამოთქვა მოსაზრება, რომ რეაქციაში შედის არა ყველა მოლეკულა, არამედ მხოლოდ ის მოლეკულები რომლებიც მოცემულ მომენტში აქტიურ მდგომარეობაში იმყოფებიან. აქტიური მოლეკულები ჩვეულებრივად ენერგიის მეტი მარაგით ხასიათდებიან. თუ აქტივაციის ენერგია არის E , მაშინ აქტიური იქნება ის მოლეკულები, რომელთა ენერგია $\geq E$.

ს. არენიუსის შეხედულებით ჩვეულებრივი და აქტიური მოლეკულები ერთმანეთთან წონასწორობაში იმყოფებიან

$$K = \frac{[\text{აქტიური მოლეკულები}]}{[\text{ჩვეულებრივი მოლეკულები}]} \quad (19)$$

ს. არენიუსის განტოლების ინტეგრალური ფორმა შემდეგია:

$$k = s \cdot e^{-\frac{E}{RT}} \quad (20)$$

სადაც k რეაქციის სიჩქარის მუდმივაა, s —წინაექსპონენციალური მუდმივა, რომელიც უდრის მოლეკულათა დაჯახების სიხშირის (z) და ეფექტურ დაჯახებათა ალბათობის — სივრცითი ფაქტორის (p) ნამრავლს ($s = pz$), e — ნეპერის რიცხვი, რომელიც უდრის 2,718, R —გაზების უნივერსალური მუდმივა (უდრის 1,987 კალ/მოლი. გრადუსი), T —აბსოლუტური ტემპერატურა, E —აქტივაციის ენერგია, ე. ი. ის ენერგია, რომელიც უნდა მიენიჭოს მოლეკულას, რომ ის არააქტიური მდგომარეობიდან გადავიდეს აქტიურში, რათა განხორციელდეს რეაქცია.

ავიღოთ მე-(20) განტოლების ორივე მხარის ნატურალური ლოგარითმი

$$\ln k = \ln s - \frac{E}{RT} \ln e \quad (21)$$

მაგრამ, რადგან

$$\ln e = 1$$

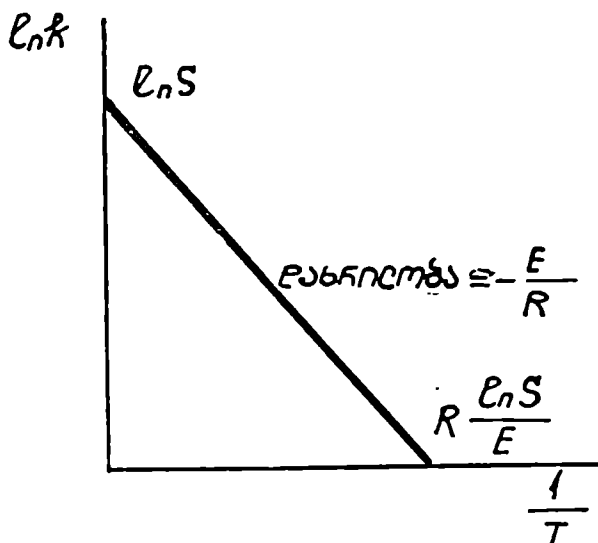
$$\ln k = -\frac{E}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln s \quad (22)$$

და

$$\lg k = -\frac{E}{4,575} \cdot \frac{1}{T} + \lg s \quad (23)$$

სადაც $4,575 = 1,987 \times 2,303$.

ამ განტოლებიდან ჩანს, რომ რეაქციის სიჩქარის მუდმივას ლოგარითმსა და აბსოლუტური ტემპერატურის შებრუნებულ სიდიდეს შორის უნდა იყოს წრფივი დამოკიდებულება, სადაც წრფის ღახრის ტანგენსი უდრის $-\frac{E}{R}$ (სურ. 8).



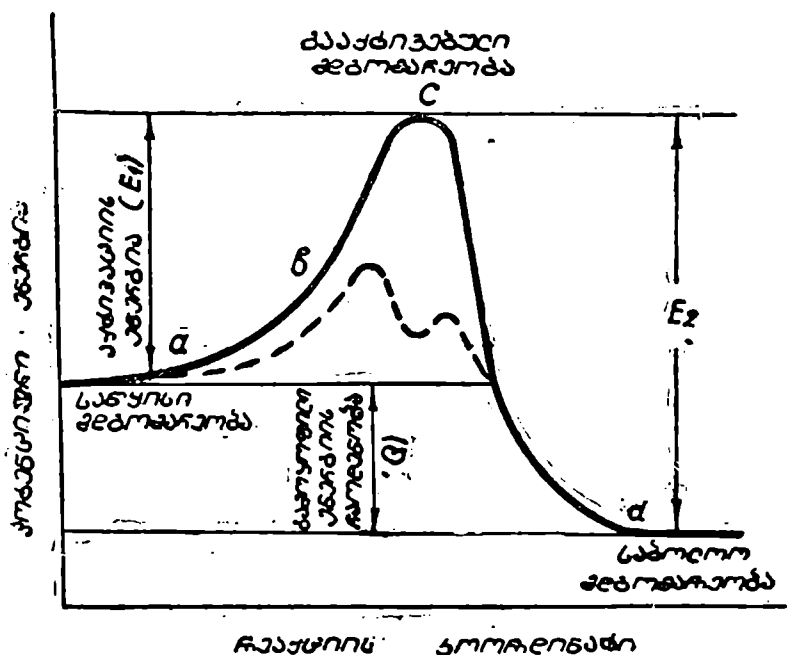
სურ. 8. დამოკიდებულება რეაქციის სიჩქარის მუდმივას ლოგარითმსა და აბსოლუტური ტემპერატურის შებრუნებულ სიდიდეს შორის.

ამგვარად, ინდივიდუალური რეაქციის სიჩქარის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების შესწავლის დროს შესაძლებელი ხდება აქტივაციის ენერგიის სიდიდის გამოთვლა, რომელიც უმნიშვნელოვანე-

სი კინეტიკური პარამეტრია და წარმოადგენს ერთ-ერთ კრიტერიუმს სხვადასხვა ბიოლოგიური ობიექტებიდან იდენტური ფერმენტების შედარებისათვის.

როგორც აღვნიშნეთ, აქტივაციის ენერგია არის ის მინიმალური ენერგია, რომელიც უნდა ჰქონდეს მორეაგირე სისტემას, რომ წარიმართოს მოცემული რეაქცია.

მორეაგირე სისტემის მდგომარეობა რომ გამოვსახოთ გრაფიკულად. ამისათვის აბსცისთა ღერძზე უნდა გადავზომოთ „რეაქციის გზა“. რომელსაც რეაქციის კოორდინატი ეწოდება, ხოლო ორდინატის ღერძზე — მორეაგირე სისტემის პოტენციური ენერგია (სურ. 9).



სურ. 9. აქტივაციის ენერგიის სქემატური გამოსახულება.

ამ კოორდინატებში აქტივაციის ენერგია გამოისახება ენერგეტიკული ბარიერის სიმაღლით, რომელიც უნდა გადალახოს მორეაგირე სისტემამ თავის გზაზე. გავეყვით რეაქციის გზას და ვნახოთ რა ხდება ამ დროს. მრუდის მარცხენა, პორიზონტალურ უბანზე წარმო-

ებს მორეაგირე ნივთიერებების დაახლოება. ამ უბანზე მოლეკულებს გააჩნიათ კინეტიკური ენერგია და მათი საერთო პოტენციური ენერგია არ იცვლება. მრუდზე აღმართის დასაწყისი (ah) ნიშნავს, რომ ორი მოლეკულა ერთმანეთს დაუახლოვდა ისეთ მანძილზე, რომ შესაძლებელი ხდება მათი ურთიერთმოქმედება. ურთიერთმიახლოვებისას მოლეკულები მოძრაობენ ნელა, რადგან ამ დროს მათი კინეტიკური ენერგია გადადის პოტენციურ ენერგიაში (მრუდი hc). თუ მოლეკულების კინეტიკური ენერგია საკმაოდ მაღალია, მაშინ მათ აქვთ უნარი მაღალწიონ ენერგეტიკული ბარიერის მწვერვალს. ენერგეტიკული ბარიერის მწვერვალზე მიღებული მოლეკულური დაჯგუფება არამდგრადია, რის გამოც ხდება ახალი დაჯგუფების წარმოქმნა, ე. ი. მიიღება რეაქციის პროდუქტები (მრუდი cd). სწორედ ამ შუალედი დაჯგუფების პოტენციური ენერგია განსაზღვრავს აქტივაციის ენერგიას. როდესაც მორეაგირე მოლეკულებს არ გააჩნიათ საკმარისი კინეტიკური ენერგია, რომ მიადწიონ ბარიერის მწვერვალს, ისინი ჩერდებიან აღმართის გარკვეულ წერტილზე, ურთიერთგანზიდვის საფუძველზე ცილდებიან ერთმანეთს და საწყის მდგომარეობას უბრუნდებიან.

ეგზოთერმული რეაქციების დროს მორეაგირე ნივთიერებებს საწყის მდგომარეობაში მეტი ენერგია აქვთ, ვიდრე საბოლოო მდგომარეობაში, ე. ი. რეაქციის შედეგად სისტემა გადადის უფრო დაბალ ენერგეტიკულ დონეზე. საწყის და საბოლოო მდგომარეობების ენერგეტიკულ დონეთა სხვაობა შეესაბამება რეაქციის სითბურ ეფექტს (Q). საწყის და გააქტივებულ მდგომარეობების ენერგეტიკულ დონეთა სხვაობა გამოსახავს პირდაპირი მიმართულების რეაქციის აქტივაციის ენერგიას (E_1). აქედან ჩანს, რომ E_2 გამოსახავს შებრუნებული რეაქციის, ე. ი. ენდოთერმული რეაქციის აქტივაციის ენერგიას. უნდა აღინიშნოს, რომ ენერგიის გაზოყოფა ან შთანთქმა სრულებითაც არ არის აუცილებელი ხდებოდეს სითბოს სახით. ამიტომ, როდესაც ენერგია გამოიყოფა ჩვენ ვამბობთ, რომ რეაქცია ექზერგონულია, ხოლო თუ ენერგია შთაინთქმება — რეაქცია ენდერგონულია. წყვეტილი ხაზით ნაჩვენებია რეაქციის მიმდინარეობა ფერმენტის თანაობისას.

ცხადია, რაც უფრო მცირეა აქტივაციის ენერგია, მით უფრო სწრაფად მიმდინარეობს რეაქცია.

(22)-ე განტოლების T-ს მიმართ დიფერენცირებისა და გარდაქმნის შედეგად მიიღება არენიუსის განტოლების დიფერენციალური ფორმა:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E}{RT^2} \quad (24)$$

ამ განტოლების მარცხენა მხარის k_1 -დან k_2 -მდე, ხოლო მარჯვენა მხარის T_1 -დან T_2 -მდე ინტეგრირებისა და შესაბამისი გარდაქმნების შედეგად მიიღება შემდეგი სახის განტოლება

$$E = 4,575 \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \lg \frac{k_2}{k_1} \quad (25)$$

მიღებული განტოლებიდან ჩანს, რომ აქტივაციის ენერგიის განზომილებაა [კალ. მოლი⁻¹].

გავითვალთ, მაგალითად გლუტამინის მეჟავს. დეკარბოქსილირების რეაქციის აქტივაციის ენერგია. ამ რეაქციას იწვევს ფერმენტი გლუტამატდეკარბოქსილაზა. დავუშვათ, რომ გლუტამინის მეჟავა ინკუბირდება გლუტამატდეკარბოქსილაზასთან 30 წთ-ის განმავლობაში 10°C და 20°C და იძლევა შესაბამისად ხვედრით აქტივობებს $V_1 = 10$ და $V_2 = 20$. ხვედრითი აქტივობა გამოისახება ნებისმიერ ერთეულში რადგან ერთეულები იკვეცებიან. ის შეიძლება გამოსახული იქნეს წარმოქმნილი პროდუქტების, მაგალითად γ -ამინო- ϵ -რობოს მეჟავს ან CO_2 -ის მიხედვით.

რამდენადაც რეაქციები ტარდება ერთნაირ პირობებში, რეაქციათა სიჩქარეები პროპორციული არიან სიჩქარეთა მუდმივების, ამიტომ V_1 -ს და V_2 -ს შეუძლიათ შეცვალონ k_1 და k_2 . ჩავსვათ V_1 და V_2 -ის მნიშვნელობები განტოლება (25)-ში, მივიღებთ:

$$E = \frac{4,575 \cdot 283 \cdot 293}{10} \lg \frac{20}{10} = 11420 \text{ კალ/მოლი}$$

დაახლოებისა და ორიენტაციის ეფექტი

კატალიზური პროცესის სიჩქარე, უპირველეს ყოვლისა, დამოკიდებულია მორეაგირე ნივთიერებათა შეფარდებით კონცენტრაციაზე. განვიხილოთ ქიმიური რეაქცია, რომელიც მიმდინარეობს ორი სუბსტრატის მონაწილეობით, რომელთა ურთიერთქმედებაც გვაძლევს განსაზღვრულ პროდუქტებს. არაფერმენტულ რეაქციებში ჩვეულებრივად გამოყენებული რეაგენტების კონცენტრაცია არ აღემატება 1 M. ფერმენტულ რეაქციებში კი ნივთიერებათა კონცენტრაციები ბევრად ნაკლებია 1 M-ზე. ცხადია, შესაბამისად შემცირდება ფერმენტულ რეაქციებში ორი სუბსტრატის მოლეკულების შეჯახების ალბათობაც. რამდენადაც სუბსტრატების კონცენტ-

რაცია უმრავლეს შემთხვევაში 10^{-3} M-ის საზღვრებშია, ხოლო ფერმენტის კონცენტრაცია არ ჰქარბობს 10^{-5} M, ალბათობა სამმოლეკულური შეჯახებისა (სუბსტრატის ორის და ფერმენტის ერთი მოლეკულებისა) მთლად უმნიშვნელოა.

არაფერმენტულ რეაქციებში გააქტივებული კომპლექსის მაქსიმალური კონცენტრაცია თეორიულად შეზღუდულია მხოლოდ იმ სუბსტრატის მოლური კონცენტრაციით, რომელიც რეაქციაში მონაწილეობს ნაკლები რაოდენობით; თუმცა გააქტივებული კომპლექსის კონცენტრაცია სინამდვილეში არასდროს არ აღწევს ამ მაქსიმალურ მნიშვნელობას. ფერმენტულ რეაქციებში კი გააქტივებული კომპლექსის კონცენტრაცია შეზღუდულია ფერმენტის მოლური კონცენტრაციით.

ისმის კითხვა: როგორ ავსნათ ის ფაქტი, რომ ფერმენტებს შეუძლიათ რეაქციის სიჩქარის გაზრდა, მიუხედავად იმისა, რომ ისინი მოქმედებენ სისტემებში, სადაც ურთიერთქმედების აპრიორული ალბათობა ძლიერ დაქვეითებულია.

ფერმენტულ რეაქციებში ურთიერთქმედება მნიშვნელოვნად უფრო ეფექტურია, ვიდრე არაფერმენტულ რეაქციებში (კატალიზურსა თუ არაკატალიზურში). სხვა სიტყვებით, თუმცა ერთი სუბსტრატის მოლეკულის მეორე სუბსტრატის მოლეკულასთან შეჯახების აპრიორული ალბათობა (1 M კონცენტრაციების შემთხვევაში) ნამდვილად მეთია ვადრე იმავე მოლეკულების ფერმენტის მოლეკულასთან შეჯახების ალბათობა (სუბსტრატის 10^{-3} M და ფერმენტის 10^{-5} M შემთხვევაში), მაინც ალბათობა იმისა, რომ შეჯახება ფერმენტის გარეშე მიგვიყვანს პროდუქტების წარმოქმნამდე გაცილებით ნაკლებია შესაბამის ალბათობაზე ფერმენტული რეაქციების შემთხვევაში.

დ. კოშლენდის აზრით სუბსტრატის მოლეკულების შეჯახების ეფექტურობა ფერმენტულ რეაქციებში, არაფერმენტულთან შედარებით განპირობებულია შემდეგი ორი მიზეზით: პირველია ე. წ. დაასლოების ეფექტი. რომელსაც ადგილი აქვს არაფერმენტულ რეაქციებშიც, მეორეა — ორიენტაციის ეფექტი, რომელიც როგორც ჩანს, დამახასიათებელია მხოლოდ ფერმენტული რეაქციებისათვის.

რამდენადაც ფერმენტის სუბსტრატთან ურთიერთქმედების დროს წარმოიქმნება ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსი, ბუნებრივია დაშვება, რომ ფერმენტს უნდა გააჩნდეს სუბსტრატების მიმართ გარკვეული მიდრეკილება, როგორც იტყვიან სწრაფვა. სწორედ ამის გამო ერთი სუბსტრატი ან ყოველთვის უფრო სწრაფად დაუკავშირ-

დება თავისუფალი ფერმენტის მოლეკულას ვიდრე მეორე, ან ორივე სუბსტრატი დაუკავშირდება ფერმენტის მოლეკულას ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად. ნებისმიერ შემთხვევაში ფერმენტის მოლეკულასთან დაკავშირებისას ისინი აღმოჩნდებიან ერთმანეთის ახლოს, რის შედეგადაც გაიზრდება მათი ურთიერთქმედების ალბათობა. ამგვარად, დაახლოების ეფექტი შეესაბამება სუბსტრატების ლოკალური კონცენტრაციების გაზრდას.

ფერმენტის მოლეკულის ზედაპირზე სუბსტრატების დაკავშირებისას ისინი არა მარტო ახლოვდებიან, არამედ ერთმანეთის მიმართ გარკვეული წესით ორიენტირდებიან კიდევ. ორიენტაციის ამ ეფექტიანაა განპირობებული სუბსტრატის მოლეკულების გარკვეული სივრცითი განლაგება, რომელიც აუცილებელია მათი ურთიერთქმედებისათვის.

თუ გამოვალთ იმ დაშვებიდან, რომ სუბსტრატის მოლეკულები ფერმენტის მოლეკულებს უკავშირდებიან მხოლოდ ერთ წერტილში, მაშინ მარტო დაახლოების ან ორიენტაციის ეფექტების საფუძველზე მივიღებთ რეაქციის სიჩქარის გაზრდას $500-600$ -ჯერ შესაბამის არაფერმენტულ რეაქციასთან შედარებით. მაგრამ ფერმენტული რეაქციების სიჩქარე ჩვეულებრივ $10^{11}-10^{13}$ -ჯერ აღემატება არაკატალიზური რეაქციების სიჩქარეს.

ამჟამად მიღებულია დამაჯერებელი მონაცემები იმის შესახებ, რომ ფერმენტის კონტაქტი სუბსტრატთან ხორციელდება არა ერთ, არამედ სამ წერტილში. ასეთ შემთხვევაში იმავე დაახლოებისა და ორიენტაციის ეფექტების საფუძველზე შეგვიძლია ავსხნათ სიჩქარის გაზრდა 10^{18} -ჯერაც კი.

სტაციონარული და არასტაციონარული კინეტიკა

ფერმენტულ რეაქციებში წარმოიქმნება ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის მუდმივი კონცენტრაციები, რომლებიც ყოველთვის დინამიკურ წონასწორობაშია დაშლილი ფერმენტისა და სუბსტრატის კონცენტრაციებთან, დინამიკური თვალსაზრისით ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის ასეთი მუდმივი კონცენტრაციები ატარებენ სტაციონარული კონცენტრაციების სახელწოდებას. ქიმიური რეაქციის სიჩქარეს სტაციონარული კონცენტრაციების პირობებში ხშირად რეაქციის სტაციონარულ სიჩქარეს უწოდებენ.

კინეტიკის იმ ნაწილს, რომელიც შეისწავლის პროცესების სტაციონარული სტადიის მიმდინარეობის კანონზომიერებებს ეწოდება სტაციონარული კინეტიკა. მაგრამ რამდენადაც ფერმენტ-სუბ-

სტრატის კომპლექსები წარმოიქმნებიან ჩვეულებრივ დიდი სიჩქარით (სიჩქარის მუდმივების სიდიდე ხშირად უდრის 10^6 — 10^8 მოლი⁻¹. წმ⁻¹), ამიტომ სტაციონარული კინეტიკის გამოკვლევები ხშირ შემთხვევაში ვერ იძლევიან საწყისი მონაცემების მიღების საშუალებას, რათა გაანგარიშებული იქნას ფერმენტული რეაქციების ცალკეული სტადიების სიჩქარის მუდმივები და განსაკუთრებით ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნის სიჩქარის მუდმივა.

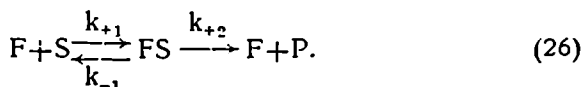
ამის გამო უკანასკნელ ხანებში ფერმენტულ კინეტიკაში დიდი განვითარება პოვეს პროცესის წინასტაციონარული სტადიის არასტაციონარული კინეტიკის შესწავლის მეთოდებმა.

მიხაელის-მენტენის განზოგადება

ფერმენტული კინეტიკის შესწავლას საფუძველი XX საუკუნის დასაწყისში ჩაეყარა. 1902 წელს ინგლისელმა ქიმიკოსმა ა. ბრაუნმა, სწავლობდა და საქაროზის ჰიდროლიზის ფერმენტულ კინეტიკას, პირველმა გამოთქვა მოსაზრება, რომ ფერმენტის სუბსტრატზე მოქმედებისას წარმოიქმნება შუალედური ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსი. 1903 წელს ა. ბრაუნისაგან დამოუკიდებლად ფრანგმა მეცნიერმა ვ. ანრიმ გამოაქვეყნა შრომა, რომელშიც მოგვცა ფერმენტული რეაქციების მიმდინარეობის მათემატიკური გამოსახვა. მის ფორმულებში გათვალისწინებული იყო ისეთი მნიშვნელოვანი ფაქტორები, როგორიცაა სუბსტრატის კონცენტრაციის შემცირება და პროდუქტის კონცენტრაციის გაზრდა.

1913 წელს ლ. მიხაელისმა და მ. მენტენმა განავითარეს ვ. ანრის შეხედულებანი და ამგვარად საფუძველი ჩაუყარეს ფერმენტული კატალიზის თანამედროვე კინეტიკას.

განვიხილოთ უმარტავესი ფერმენტული რეაქცია, რომელშიც მონაწილეობს ფერმენტი (F), სუბსტრატი (S) და წარმოიქმნება რეაქციის ერთი პროდუქტი (P). დავუშვათ, რომ რეაქცია მიმდინარეობს ორ სტადიად — ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის (FS) წარმოქმნა და მისი დაშლა. კინეტიკა სტაციონარულია



პირველი სტადიისათვის წონასწორობის შემთხვევაში გვექნება

$$k_{+1} [F] [S] = k_{-1} [FS] \quad (27)$$

$$\frac{[F][S]}{[FS]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s, \quad (28)$$

სადაც K_s არის FS-ის F და S-ად დისოციაციის წონასწორობის კონსტანტა. ეს წონასწორობა სამართლიანია იმ შემთხვევაში, როდესაც გამორიცხულია მეორე სტადიის გავლენა პირველ სტადიაზე.

თუ $[F]$ თავისუფალი ფერმენტის კონცენტრაციაა, $[FS]$ — ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის კონცენტრაცია და $[F]_0$ — ფერმენტის საერთო რაოდენობა, მაშინ

$$[F] = [F]_0 - [FS] \quad (29)$$

შევიტანოთ $[F]$ -ს მნიშვნელობა (28)-ში, მივიღებთ:

$$[FS] = \frac{[F]_0[S]}{K_s + [S]} \quad (30)$$

მაგრამ რეაქციის სიჩქარე განისაზღვრება ფერმენტ-სუბსტრატის პროდუქტად დაშლის სიჩქარით, ე. ი.

$$v_{+2} = k_{+2}[FS] \quad (31)$$

და განტოლება (30) მიიღებს სახეს

$$v_2 = \frac{k_{+2}[F]_0[S]}{K_s + [S]}. \quad (32)$$

განტოლება (32)-ის ანალიზი გვიჩვენებს, რომ თეორიულად რეაქციის მაქსიმალური სიჩქარე მიიღწევა მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როდესაც ფერმენტის მთელი რაოდენობა $[F]_0$ დაკავშირებული იქნება $[FS]$ კომპლექსში. მაშინ ამ ორი სიდიდის რიცხვითი მნიშვნელობები ტოლი იქნებოდა $[FS] = [F]_0$ და მაქსიმალური სიჩქარე

$$V_{\max} = k_{+2}[FS] = k_{+2}[F]_0 \quad (33)$$

ე. ი. ფერმენტული რეაქციის მაქსიმალური სიჩქარე ეწოდება იმ სიჩქარეს, რომელიც მიიღწევა ფერმენტის სუბსტრატით სრული გაჯერებისას. ჩავსვათ $V_{\max}$ მნიშვნელობა (32)-ე განტოლებაში

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_s + [S]} \quad (34)$$

მიღებული განტოლება წარმოადგენს მიხაელის-მენტენის განტოლებას. (34)-ე შეიძლება ასე გადავწეროთ

$$K_s = [S] \left(\frac{V_{\max}}{v} - 1 \right) \quad (35)$$

განტოლება (35)-დან ჩანს, რომ როცა

$$v = \frac{V_{\max}}{2} \quad k_s = [S] \quad (36)$$

ამგვარად, სუბსტრატის იმ კონცენტრაციას, რომელზედაც მიიღწევა მაქსიმალური სიჩქარის ნახევარი, ეწოდება მიხაელის-მენტენის კონსტანტა და აღინიშნება ჩვეულებრივ K_m -ით. მიხაელის-მენტენის კონსტანტა აო არის დამოკიდებული ფერმენტის კონცენტრაციაზე.

განხილულ პირობებში

$$K_m = K_s = [S],$$

როდესაც

$$v = \frac{V_{\max}}{2}.$$

უნდა გვახსოვდეს, რომ ეს ტოლობა სამართლიანია მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როდესაც გამორიცხულია მეორე სტადიის გავლენა პირველზე. ლ. მიხაელისი და მ. მენტენი თვლიდნენ, რომ ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის $[FS]$ კონცენტრაცია განისაზღვრება მხოლოდ $\frac{k_{-1}}{k_{+1}}$ შეფარდებით, ე. ი., რომ $[FS]$ -ზე არსებითი გავლენა არა აქვს k_{+2} -ს.

ბრიგს-ჰოლდენის განტოლება

როგორც აღვნიშნეთ ლ. მიხაელისი და მ. მენტენი გამოდიოდნენ იმ დაშვებიდან, რომ ფერმენტსა და სუბსტრატს შორის წონასწორობა მყარდება გაცილებით უფრო სწრაფად (სტადია I), ვიდრე ხდება FS კომპლექსის პროდუქტად გარდაქმნა (სტადია II). ამგვარად, ფერმენტის მოქმედების მთელ მანძილზე კომპლექსი FS ყოველთვის იმყოფება წონასწორობაში F და S -თან. მაგრამ მრავალი ფერმენტული რეაქციის სიჩქარის მუდმივას მაღალმა მნიშვნელობამ აფიქრებინა დ. ბრიგსს და დ. ჰოლდენს, რომ ლ. მიხაელისის და მ. მენტენის დაშვება შეიძლება ყოველთვის არ იყო სამართლიანი.

დ. ბრიგსმა და დ. ჰოლდენმა გაითვალისწინეს $k+2$ -ის გავლენა FS-ის კონცენტრაციაზე. მათ დაუშვეს, რომ რეაქციის ნებისმიერ მომენტში FS კომპლექსის წარმოქმნისა და დაშლის სიჩქარეები პრაქტიკულად ერთმანეთის ტოლია, ე. ი. FS-ის კონცენტრაცია შეიძლება განხილულ იქნეს როგორც მუდმივი სიდიდე დროის მცირე პერიოდის განმავლობაში.

დ. ბრიგსისა და დ. ჰოლდენის ანალიზის მიხედვით მიიღება ზუსტად იგივე სახის განტოლება, რაც მიხაელის-მენტენის შემთხვევაში.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (37)$$

განტოლება (37) წარმოადგენს უმარტივესი ფერმენტული რეაქციების სტაციონარული კინეტიკის ძირითად განტოლებას, რომელიც თუმცა მიღებულ იქნა დ. ბრიგსისა და დ. ჰოლდენის მიერ, ატარებს ლ. მიხაელისისა და მ. მენტენის სახელწოდებას. ამ განტოლებაში

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \quad (38)$$

სადაც

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s$$

აზოტომ

$$K_m = K_s + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \quad (39)$$

როდესაც k_{+2} საგრძნობლად მცირეა k_{+1} -თან შედარებით, ე. ი. როდესაც შეიძლება უგულებელვყოთ k_{+2} , მაშინ

$$K_m = K_s \quad (40)$$

რხევე როგორც მიხაელის-მენტენის შემთხვევაში, როდესაც

$$v = \frac{V_{\max}}{2}$$

განტოლება (37)-დან

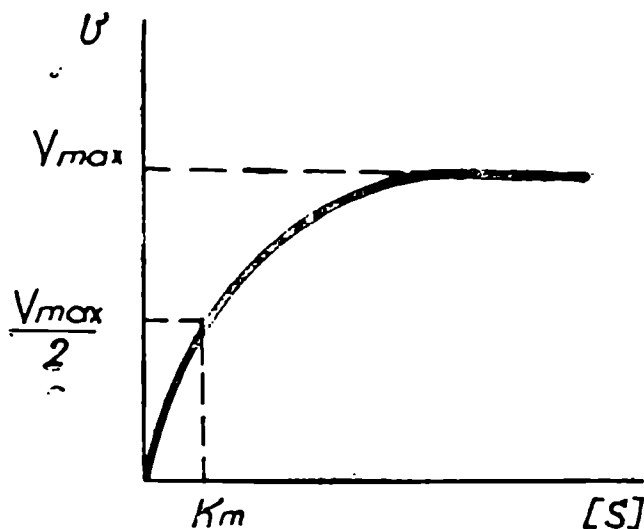
$$K_m = [S] \quad (41)$$

ამგვარად, მიხაელის-მენტენის კონსტანტა არის სუბსტრატის ის კონცენტრაცია, რომლის დროსაც რეაქციის სიჩქარე მაქსიმალური სიჩქარის ნახევრის ტოლია.

ხშირად კონცენტრაციას, რომელზედაც რეაქციის სიჩქარე მაქსიმალურის ნახევარია, აღნიშნავენ $[S]_0,5$.

ცხადია, რომ K_m -ის ერთეულს სუბსტრატის კონცენტრაციის ერთეული წარმოადგენს, ე. ი. გამოისახება მოლელების რიცხვით ერთ ლიტრში (M).

მიხაელის-მენტენისა და ბრიგს-ჰოლდენის განტოლებები გრაფიკულად კოორდინატებში $v-[S]$ ($v=f[S]$) გამოისახებიან ჰიპერბოლური მრუდებით (სურ. 10). მაგრამ ამ მეთოდით, ე. ი. ამ გრაფიკიდან K_m და V_{max} -ის განსაზღვრა გარკვეულ რისკთანაა დაკავშირებული, რადგან ჩვენ ყოველთვის არ ვართ დარწმუნებული, რომ V_{max} წარმოადგენს კეშმარიტ მაქსიმალურ სიჩქარეს.



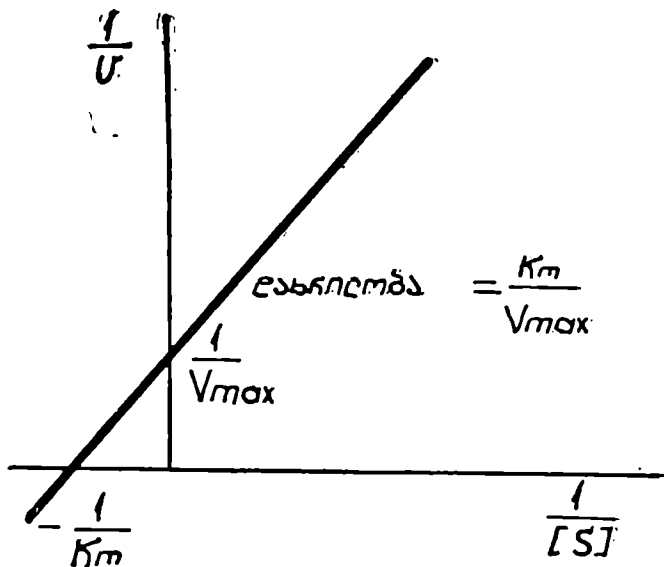
სურ. 10. მიხაელის-მენტენის განტოლების გრაფიკული გამოსახვა.

ამასთან დაკავშირებით მოწოდებულია რამდენიმე ხერხი, რომელთა საშუალებით მიხაელის-მენტენის განტოლება ღებულობს წრფის განტოლების სახეს და ე. ი. გრაფიკულად გამოისახება როგორც წრფე.

ენზიმოლოგიაში ყველაზე მეტ გამოყენებას პოულობს ჰ. ლაინვიგერისა და დ. ბერკის განტოლება.

$$\underbrace{\frac{1}{v}}_y = \underbrace{\frac{K_m}{V_{max}}}_{a} \underbrace{\frac{1}{[S]}}_x + \underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_b \quad (42)$$

რომელიც წარმოადგენს მიხაელის-მენტენის განტოლების ტრანსფორმაციულ სახეს. მეთოდს, რომელიც ამ განტოლების გამოყენებაზეა დამყარებული, ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეთა მეთოდი ეწოდება. გრაფიკულად ეს განტოლება შემდეგნაირად გამოისახება (სურ. 11).



სურ. 11. K_m -ისა და V_{max} -ის განსაზღვრა ლაინუივერისა და ბერკის გრაფიკული მეთოდით.

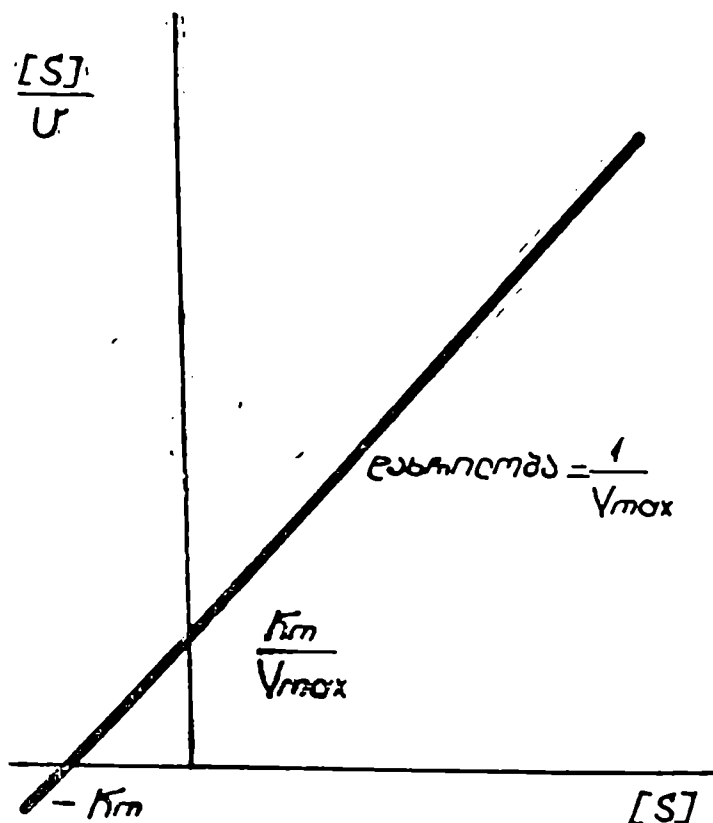
თუ ჰ. ლაინუივერისა და დ. ბერკის განტოლების ორივე მხარეს გავამრავლებთ $[S]$ -ზე მივიღებთ შემდეგი სახის განტოლებას:

$$\underbrace{\frac{[S]}{v}}_y = \underbrace{\frac{K_m}{V_{max}}}_b + \underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_a \underbrace{[S]}_v \quad (43)$$

რომელიც გრაფიკულად შემდეგნაირად გამოისახება (სურ. 12).

გამოყენებას პოულობს აგრეთვე გ. ილის მიერ მოწოდებული განტოლებაც, რომელიც გრაფიკულად ასე გამოისახება (სურ. 13).

გ. იდის განტოლება ერთად-ერთია, რომლის შესაბამის წრფეს გააჩნია საზღვრები. თუ ცდის დროს ერთსა და იმავე სუბსტრატზე მოქმედებს ერთზე მეტი ფერმენტი, მაშინ წრფეს უჩნდება, თუ შე-



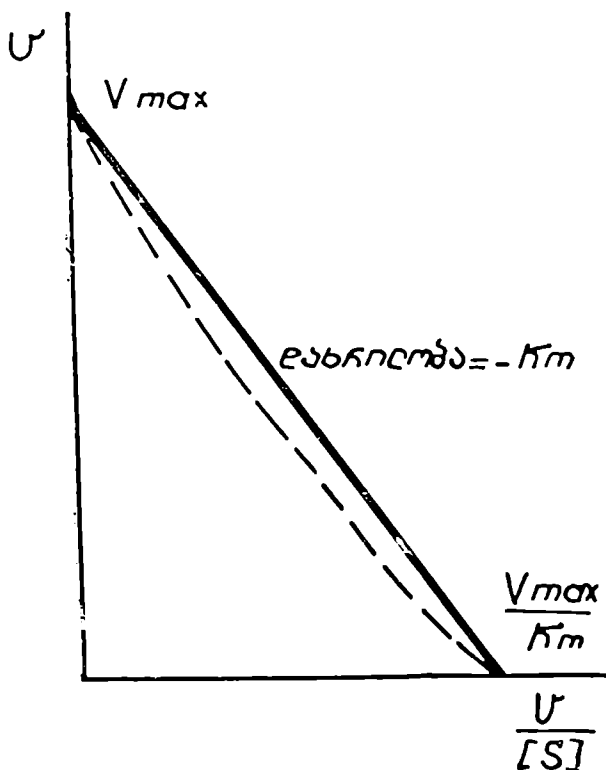
სურ. 12. K_m -ისა და V_{max} -ის გრაფიკული განსაზღვრა კოორდინატებში $1/v$ — $1/[S]$.

$$\underbrace{v}_{y} = - \underbrace{K_m}_{a} \underbrace{\frac{1}{[S]}}_x + \underbrace{V_{max}}_b \quad (44)$$

იძლება ასე ითქვას, გალუნგის გარკვეული ტენდენცია, რაც სურათზე წყვეტილი ხაზითაა აღნიშნული.

არის კიდევ სხვა განტოლებებიც, რომლებიც დამყარებულია

მიხედვის-მენტენის განტოლებაზე, მაგრამ ისინი შედარებით ნაკლებ გამოყენებას პოულობენ და ამდენად მათზე არ შეეჩერდებით.

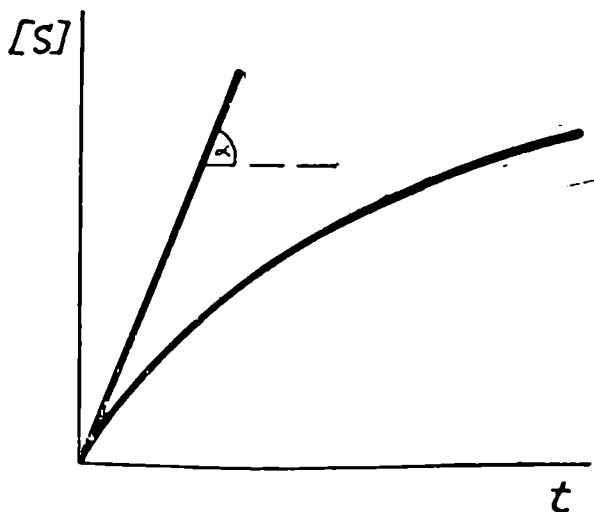


სურ. 13. K_m -ისა და V_{max} -ის განსაზღვრის იდის გრაფიკული მეთოდი.

K_m და V_{max} გრაფიკულად განსაზღვრის დროს ძალზე დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ექსპერიმენტულ წერტილებზე წრფის გატარების სიზუსტეს. ამ მიზნისათვის ხშირად წრფეს ატარებენ უმცირესი კვადრატების სტატისტიკური მეთოდის გამოყენებით. მაგრამ აქ საჭიროა გვახსოვდეს, რომ ჩვენს მიერ განხილულ გრაფიკებზე ყოველთვის არ მიიღება სწორი ხაზები და მათი ხელოვნურად (მაგალითად, უმცირესი კვადრატების მეთოდით) გასწორება არ შეიძლება. საკმე იმაშია, რომ ზოგიერთი ფერმენტის შემთხვევაში (მაგალითად, ალოსტერიული ფერმენტები) კანონზომიერი შეიძლება იყოს მრუდი და არა წრფე.

სავსებით ცხადია, რომ კინეტიკა რომელიც ითვალისწინებს K_m -ს, უნდა ემორჩილებოდეს პირველი რიგის რეაქციის განტოლებას, რაც ნიშნავს, რომ K_m -ის განსაზღვრა უნდა ხდებოდეს რეაქციის საწყისი სიჩქარეების დროს.

ამგვარად, ისეთი რეაქციების კინეტიკური პარამეტრების (K_m , V_{max}) განსაზღვრისათვის, რომლებიც აღიწერებიან ჰიპერბოლური მრუდებით, აუცილებელია განისაზღვროს რეაქციების საწყისი სიჩქარე, ე. ი. რეაქციის სიჩქარე, რომელიც ექსტრაპოლირებული იქნება $t=0$ მომენტისათვის, როდესაც რეაქციის პროდუქტის კონცენტრაცია ასევე მიისწრაფვის ნულისაკენ. რეაქციის საწყისი სიჩქარის განსაზღვრის ყველაზე მარტივი მეთოდი მდგომარეობს მოცემული მრუდისათვის მხების აგებაში იმ წერტილში, სადაც $t=0$ და დახრის კუთხის ტანგენსის გამოთვლაში. ასეთ შემთხვევაში $v_0 = t g \alpha$ (სურ. 14).



სურ. 14. რეაქციის საწყისი სიჩქარის განსაზღვრის გრაფიკული მეთოდი.

ცხადია v_0 -ის სიზუსტე ძლიერაა დამოკიდებული მხების გაკლების სიზუსტეზე და ჩვეულებრივ არაა მაღალი. უფრო ზუსტ შედეგებს იძლევა ანალიზური მეთოდები, თუმცა ტექნიკურად ისინი შედარებით რთულია. როგორც აღვნიშნეთ, K_m -ს ლ. მიხაელისი და მ. მენტენი განიხილავდნენ როგორც K_s ე. ი. როგორც

ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის დისოციაციის კონსტანტას (მას სუბსტრატის კონსტანტასაც უწოდებენ) და ბუნებრივია, რომ იგი მოწოდებულ იქნა როგორც სუბსტრატის ფერმენტთან „სწრაფვის“ საზომი. ცხადია, რაც უფრო მცირეა K_s -ის მნიშვნელობა, მით უფრო მეტია სუბსტრატის სწრაფვა ფერმენტთან და პირიქით, რაც მეტია K_s , მით ნაკლებია სწრაფვა სუბსტრატისა ფერმენტთან. ეს აიხსნება იმ გარემოებით, რომ როცა K_s მცირეა, მაშინ ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსი ნაკლებად და დისოცირებული სუბსტრატად და ფერმენტად, ვიდრე პროდუქტად და ფერმენტად და გამოდის, რომ სუბსტრატი უპირატესად გარდაიქმნება პროდუქტად, ე. ი. მას ვაჩნია ფერმენტის მიმართ უფრო მაღალი სწრაფვა. მაგრამ აღმოჩნდა, რომ

$$K_m = K_s + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}$$

ე. ი. K_m ყოველთვის აღემატება K_s -ს და ეს განსხვავება დამოკიდებულია იმაზე, თუ რამდენად K_{+2} სიდიდე მეტია ან ნაკლებია k_{+1} -ის სიდიდეზე. $\left(\frac{k_{+2}}{k_{+1}}\right)$ უწოდებენ კინეტიკურ კონსტანტას.

ზოგიერთ შემთხვევაში K_m უმნიშვნელოდ განსხვავდება K_s -გან, მაგრამ. მიუხედავად ამისა, დიდი სიფრთხილეა საჭირო K_m -ის, როგორც სუბსტრატის ფერმენტთან „სწრაფვის“, საზომის გამოყენების დროს.

ამგვარად, შეგვიძლია წარმოვიდგინოთ სამი ტიპის კონსტანტის აჩსებობა

$$1) k_{-1} \approx k_{+2} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \text{ (მიხაელისის კონსტანტა)}$$

$$2) k_{-1} \gg k_{+2} \quad K_m = K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \text{ (სუბსტრატის კონსტანტა)}$$

$$3) k_{-1} \ll k_{+2} \quad K_m = \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \text{ (კინეტიკური კონსტანტა)}$$

ცხადია, ექსპერიმენტულად მიღებულ K_m კონსტანტებს, შეიძლება გააჩნდეს სხვადასხვა არსი, ამიტომ სწორი ინტერპრეტაციისათვის საჭიროა k_{-1} და k_{+2} სიდიდეებს შორის თანაფარდობის ცოდნა.

ამგვარად, K_m უმნიშვნელოვანესი კინეტიკური მახასიათებელია, რომელიც უნდა ისაზღვრებოდეს რეაქციის საწყის სტადიებზე სუფთა ფერმენტებისათვის ტემპერატურის, pH-ის, იონური ძალისა და სხვა ფაქტორების ერთსა და იმავე მნიშვნელობაზე.

მაგალითად, ქვემოთ მოყვანილ ცხრილში ნაჩვენებია თუ როგორ იცვლება ფერმენტ პოლინუკლეოტიდფოსფორილაზის (ფკ 2. 7. 7. 8) V_{max} და K_m სიდიდეები სარეაქციო ხსნარის იონური ძალის სხვადასხვა მნიშვნელობის დროს (ცხრ. 1.).

ცხრილი 1

იონური ძალის გავლენა პოლინუკლეოტიდფოსფორილაზის V_{max} და K_m სიდიდეებზე

იონური ძალა	V_{max}	K_m
0,02	1,55	1,26
0,04	1,39	0,71
0,1	1,46	0,563
0,2	1,38	0,324
0,6	1,85	1,33

ორსუბსტრატთან რეაქციებში K_m -ის განსაზღვრა წარმოებს ერთ-ერთი სუბსტრატის მუდმივი კონცენტრაციის პირობებში, რის გამოც იმ სუბსტრატის K_m -ის მნიშვნელობა, რომლის კონცენტრაცია იცვლება, დაპოკლებული იქნება მეორე სუბსტრატის მუდმივი კონცენტრაციის მნიშვნელობაზე. ასეთ შემთხვევაში მიხაელის-მენტენის კონსტანტას მოჩვენებით კონსტანტას უწოდებენ.

კონკურენტული ინჰიბირების კინეტიკა

ნივთიერებებს, რომლებიც აკავებენ ფერმენტთა აქტივობას, რის შედეგადაც მცირდება მათ მიერ კატალიზებული რეაქციების სიჩქარე, ეწოდებათ ინჰიბიტორები. განასხვავებენ შექცევად და შეუქცევად ინჰიბიტორებს. ინჰიბიტორები, რომლებიც ფერმენტებთან წარმოქმნიან დისოცირებად კომპლექსებს, იწოდებიან შექცევად ინჰიბიტორებად. შეუქცევადი ინჰიბიტორები ეწოდებათ ისეთ ინჰიბიტორებს, რომლებიც ფერმენტებთან წარმოქმნიან არადისოცირებად კომპლექსებს.

როდესაც ინჰიბიტორი უშუალოდ ურთიერთქმედებს ფერმენტის აქტიურ ცენტრთან და ცვლის ფერმენტის აქტივობას, ამბობენ, რომ ადგლი აქვს კონკურენტულ ინჰიბირებას. როდესაც ინჰიბი-

ტორი უკავშირდება ფერმენტის არააქტიურ „ცენტრში“ და ამ გზით ანეცირებს ფერმენტის აქტივობას, მაშინ ადგილი აქვს ეგრეთ წოდებულ არაკონკურენტულ ინჰიბირებას.

კონკურენტული ინჰიბიტორები ურთიერთქმედებენ მხოლოდ თავისუფალ ფერმენტებთან როგორც შექცევადად, ისე შეუქცევადად, მაშინ როცა არაკონკურენტული ინჰიბიტორები ურთიერთქმედებენ როგორც თავისუფალ ფერმენტებთან, ისე ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსებთან.

კონკურენტული ინჰიბირების კლასიკურ მაგალითს წარმოადგენს სუქცინატდეჰიდროგენაზის ინჰიბირება მალონის მჟავით ($\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), რომელიც კონკურენტურობას უწევს ფერმენტის სუბსტრატს — ქარვის მჟავას ($\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$).

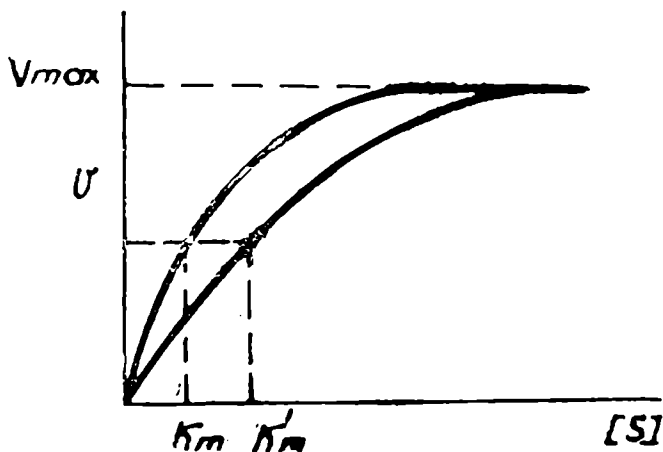
არაკონკურენტული ინჰიბირების მაგალითია მეტალშემცველ ფერმენტებზე ალკილმჟავას მოქმედება.

რიგ შემთხვევებში ადგილი აქვს უფრო რთული ხასიათის ინჰიბირებას. ინჰიბირების ხარისხისა და ტიპის მიხედვით იცვლება რეაქციის მაქსიმალური სიჩქარე $V_{\max}$ და K_m , ან ორივე ერთად. ინჰიბიტორის მოქმედების რაოდენობრივი მხარე შეიძლება გაანგარიშებულ იქნას ექსპერიმენტული გზით, რისთვისაც საჭიროა განისაზღვროს რეაქციის სიჩქარე ინჰიბიტორის თანაობისას და მისი გარეშე.

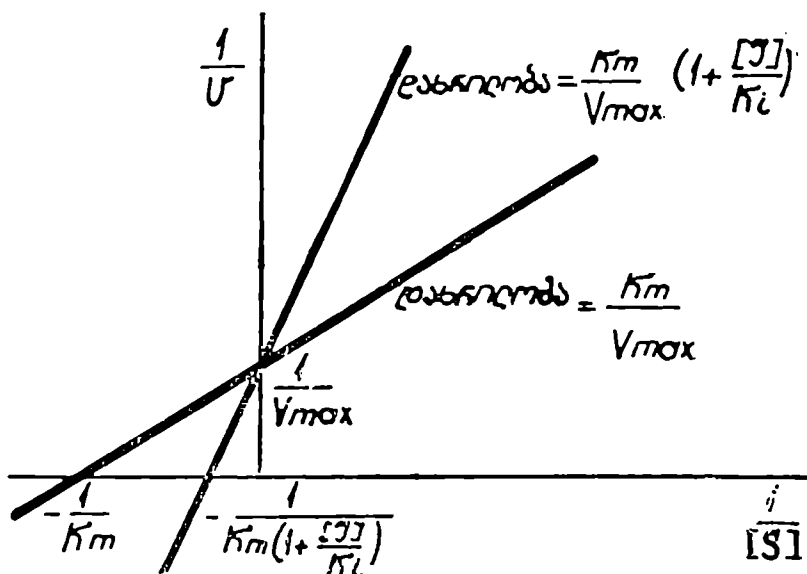
რეაქციის სიჩქარე კონკურენტული ინჰიბიტორის თანაობისას გამოისახება შემდეგი განტოლებით

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] + \frac{K_m}{K_i} [I]} \quad (45)$$

რომელიც მიხაელის-მენტენის განტოლების ანალოგიურია და მისგან განსხვავდება წევრით $\frac{K_m}{K_i} [I]$, რომელიც გამოსახავს ინჰიბიტორის მიერ რეაქციის სიჩქარის შემცირების ხარისხს. როგორც ჩანს, ამ წევრის მნიშვნელობა განისაზღვრება როგორც თვით ინჰიბიტორის კონცენტრაციით, ასევე მიხაელისის კონსტანტით. მიღებული განტოლება კოორდინატებში $v-[S]$ ინჰიბიტორის მუდმივი კონცენტრაციების პირობებში, ცხადია გამოისახება ჰიპერბოლური მრუდით (სურ. 15), ხოლო ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში ემორჩილება წრფის განტოლებას (სურ. 16), ე. ი.



სურ. 15. კონკურენტული ინჰიბირების გრაფიკული გამოსახვა კოორდინატებში $v-[S]$.



სურ. 16. კონკურენტული ინჰიბირების გრაფიკული გამოსახვა ლაინუივერისა და ბერკის ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეების მეთოდით.

$$\frac{1}{\frac{v_i}{y}} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right) \frac{1}{\frac{[S]}{x} + \frac{1}{V_{\max}}} \quad (46)$$

როგორც წარმოდგენილი გრაფიკიდან (სურ. 16) ჩანს ინჰიბიტორის თანაობისას წრფის დახრილობა იზრდება მამრავლით $\left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right)$. კონკურენტული ინჰიბირების დროს $V_{\max}$ არ იცვლება, მაგრამ იცვლება K_m -ის მნიშვნელობა—იგი იზრდება. თუ აღვნიშნავთ მიხაელისის კონსტანტას ინჰიბიტორის თანაობისას K'_m -ით, ის შეტი იქნება K_m -ზე $\frac{[J]}{K_i}$. K_m სიდიდით, ე. ი.

$$K'_m = K_m + \frac{[J]}{K_i} K_m \quad (47)$$

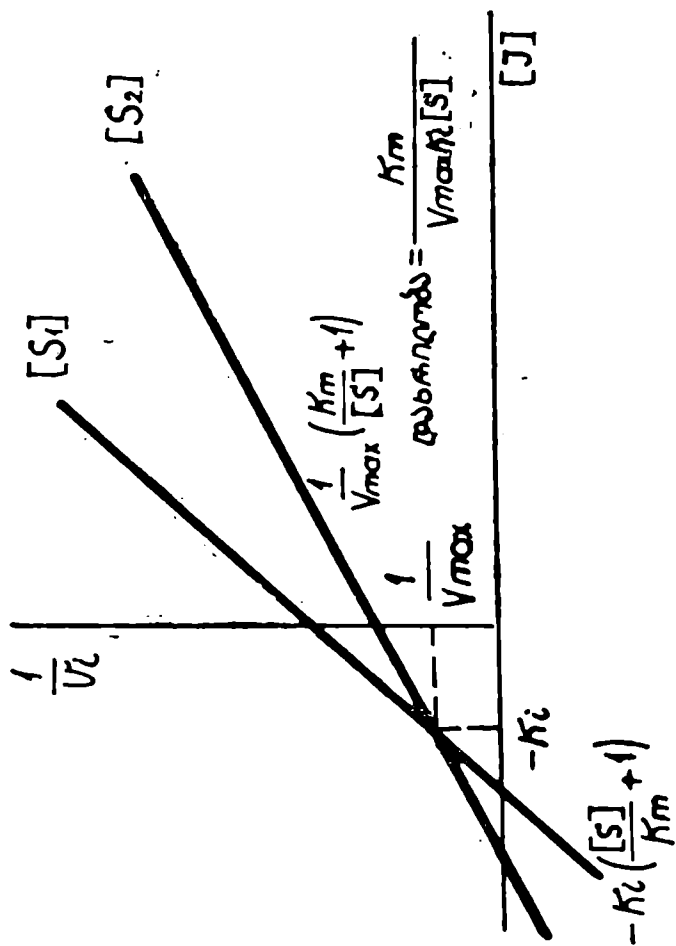
საიდანაც შეიძლება განისაზღვროს K_i ,

$$K_i = \frac{K_m [J]}{K'_m - K_m} \quad (48)$$

მ. დიქსონის მიერ მოწოდებულია K_i -ს განსაზღვრის მარტივი გრაფიკული მეთოდი, რისთვისაც საჭიროა აიგოს გრაფიკი კოორდინატებში $\frac{1}{v_i} - [J]$. შედეგად მიიღება წრფე, რომელიც აკმაყოფილებს შემდეგ განტოლებას

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{\max} [S] \cdot K_i} [J] + \frac{1}{V_{\max}} \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 \right) \quad (49)$$

თუ რეაქციას ჩავატარებთ სუბსტრატის $[S_1] = \text{const}$ და $[S_2] = \text{const}$ კონცენტრაციებზე ($[S_1] \neq [S_2]$) ცალ-ცალკე და ინჰიბიტორის ცვლადი კონცენტრაციის პირობებში, გრაფიკზე მიღებული წრფეები გადაკვეთენ ერთმანეთს წერტილში— K_i (სურ. 17). ამ განტოლებიდან გამოითვლება K_m -იც, რამდენადაც თითოეული წრფე კვეთს აბსცისთა ღერძს $K_i \left(\frac{[S]}{K_m} + 1 \right)$ წერტილში.



სურ. 17. K_i -ისა და K_{im} -ის განსაზღვრის ლიქსონის გრაფიკული მეთოდი.

როგორც აღვნიშნეთ, კონკურენტული ინჰიბირების დროს ინჰიბიტორი ვერ უკავშირდება ფერმენტს, თუ იგი უკვე დაკავშირებულია სუბსტრატთან. არაკონკურენტული ინჰიბიტორი კი უკავშირდება ფერმენტს მიუხედავად იმისა, დაკავშირებულია ფერმენტი სუბსტრატთან თუ არა.

რეაქციის სიჩქარე არაკონკურენტული ინჰიბიტორის თანაობისას გამოისახება შემდეგი განტოლებით:

$$v = \frac{v_i (K_i + [J])}{K_i}, \quad (50)$$

ხოლო:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_i}{v_i (K_i + [J])} \quad (51)$$

ამ ტოლობაში $\frac{1}{v}$ -ის მნიშვნელობის შეტანით ლაინუივერ-ბერკის განტოლებიდან (42) და შესაბამისი გარდაქმნების ჩატარებით მიიღება განტოლება

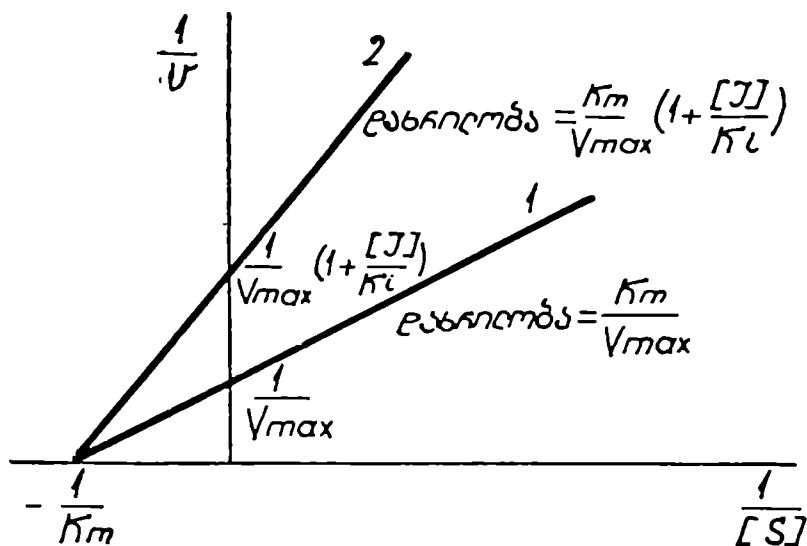
$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} [S]} \right) \left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right) \quad (52)$$

მიღებული განტოლების ანალიზი გვიჩვენებს, რომ არაკონკურენტული ინჰიბირების დროს წრფის დახრილობა $\frac{K_m}{V_{\max}}$ და ორდინატის ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთი $\frac{1}{V_{\max}}$ იზრდება მამრავლით

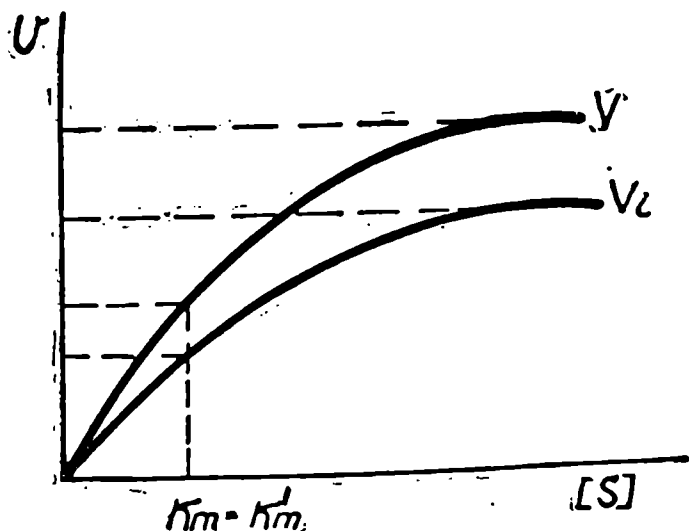
$\left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right)$ (სურ. 18).

როგორც გრაფიკიდან ჩანს, არაკონკურენტული ინჰიბირების დროს K_m არ იცვლება. მაგრამ იცვლება $V_{\max}$, ის მცირდება. კოორდინატებში v — $[S]$ ეს ასეთნაირად გამოისახება (სურ. 19).

ამგვარად, კონკურენტული ინჰიბირების დროს იცვლება K_m და არ იცვლება $V_{\max}$, ხოლო არაკონკურენტული ინჰიბირების დროს პირიქით, არ იცვლება K_m და იცვლება $V_{\max}$. არის შემთხვევები, როდესაც იცვლება ორივე. ეს შემთხვევა განიხილება როგორც შერეული (რთული) ინჰიბირების მაგალითი.



სურ. 18. არაკონკურენტული ინჰიბიტორების გრაფიკული გამოსახვა ლაინეივერისა და ბერკის ორმაგ შებრუნებული სიდიდეების მეთოდით 1—ინჰიბიტორის გარეშე, 2—ინჰიბიტორის თანაობისას

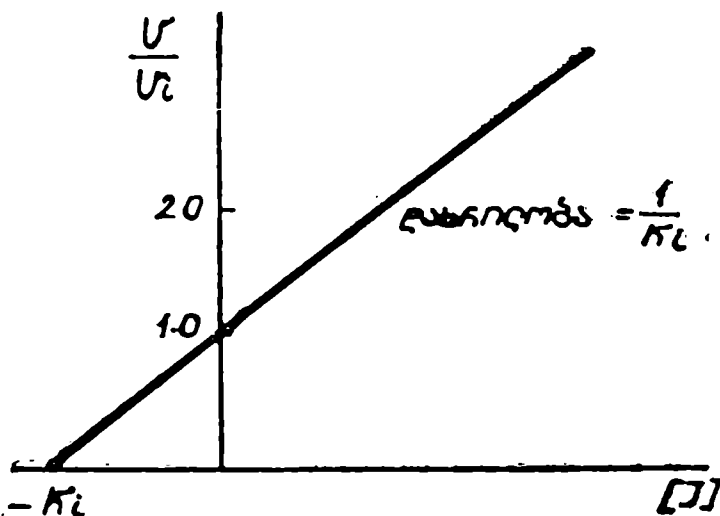


სურ. 19. არაკონკურენტული ინჰიბიტორების გრაფიკული გამოსახვა კოორდინატებში $v-[S]$

განტოლებიდან (50) შეგვიძლია დაწეროთ

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{[J]}{K_i} \quad (53)$$

რომელიც წარმოადგენს წრფის განტოლებას. (53)-დან შეიძლება განსაზღვრული იქნას არაკონკურენტული ინჰიბირების K_i , რისთვისაც საჭიროა წრფის გავლება კოორდინატებში $\frac{v}{v_i} - [J]$ (სურ. 20).



სურ. 20. არაკონკურენტული ინჰიბირების K_i -ის განსაზღვრის გრაფიკული მეთოდი.

თანაზარდობა J_{50} და K_i შორის

ენზიმოლოგიაში ხშირად ინჰიბიტორის იმ კონცენტრაციას, რომელიც იწვევს რეაქტივის სიჩქარის ორჯერ შემცირებას აღნიშნავენ I_{50} . ე. ი. I_{50} გამოიყენება როგორც ინჰიბირების ხარისხის საზომი. იგი განისაზღვრება ექსპერიმენტულად.

შექცევადი კონკურენტული ინჰიბირებისათვის დამოკიდებულება I_{50} და K_i შორის გამოისახება განტოლებით:

$$J_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (54)$$

ამგვარად, თუ ცნობილია K_m და სუბსტრატის კონცენტრაცია, მაშინ J_{50} -ის მიხედვით შეიძლება განსაზღვრული იქნეს K_1 და პირიქით.

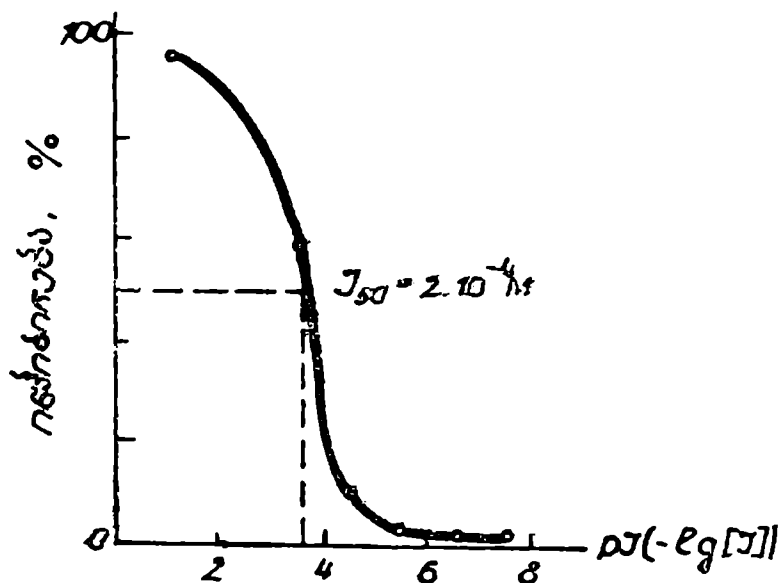
შექცევადი არაკონკურენტული ინჰიბირებისათვის თანაფარდობა J_{50} და K_1 -ის შორის გამოისახება ფორმულით:

$$\frac{J_{50}}{K_1} = 1 \quad (55)$$

და

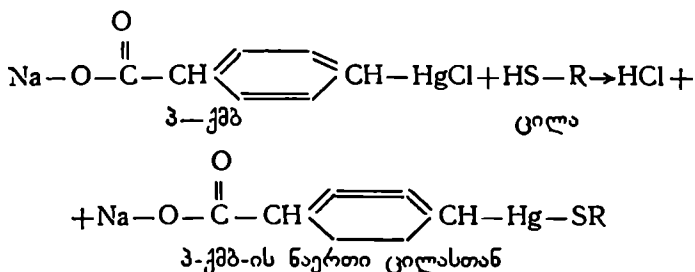
$$J_{50} = K_1 \quad (56)$$

ეს გასაგებიცაა, რადგან არაკონკურენტული ინჰიბირების მექანიზმის მიხედვით ინჰიბიტორი ურთიერთქმედებს ფერმენტთან სუბსტრატისაგან დამოუკიდებლად. I_{50} საზღვრავენ ექსპერიმენტული მონაცემების საფუძველზე.



სურ. 21. ბარდის მალატდეჰიდროგენაზის პ-ქლორმერიბენზოატი ინჰიბირება და მისი J_{50} -ის გამოთვლა.

21 სურათზე გამოსახულია ბარდის მალატდეჰიდროგენაზის (ფკ 1. 1. 1. 37) პ-ქლორმერიბენზოატი ინჰიბირება და გამოთვლილია მისი I_{50} . პ-ქლორმერიბენზოატი შერჩევითად მოქმედებს ფერმენტის SH-ჯგუფზე შემდეგი განტოლების შესაბამისად



პ-ქლორმერკურიბენზოატის ხსნარს ამზადებენ პ. ბოიერის მეთოდით. იღებენ ნიმუშს 34 მგ-ის (ნაცვლად თეორიულად გაანგარიშებული 29 მგ-ისა) რაოდენობით, შეაქვთ 5 მლ 0,5 M ფოსფატის ბუფერში pH 8,7 და გულდასმით ურევენ. გაუხსნელი ნალექის მოსაცილებლად აცენტრიფუგირებენ 15 წთ-ის განმავლობაში (ცივად დაცენტრიფუგირება არ შეიძლება, ვინაიდან ხდება ბუფერიდან მარილების გამოკრისტალდება). ნალექზედა ხსნარი უნდა გადმოიწუროს და განზავდეს 200-ჯერ. ხსნარის ექსტინქციას (E) საზღვრავენ 232 ნმ-ზე.

ცნობილია, რომ პ-ქლორმერკურიბენზოატის ერთმოლური ხსნარის ექსტინქცია ტოლია $1.69 \cdot 10^4$ სმ²/მოლი. ხსნარის მოლარობის გაანგარიშება ხდება შემდეგნაირად:

თუ

$$E_{232} = 0,99,$$

მაშინ

$$1M - 1,69 \cdot 10^4 \quad X = \frac{0,99}{1,69 \cdot 10^4} = 0,58 \cdot 10^{-4} M$$

$$X - 0,99$$

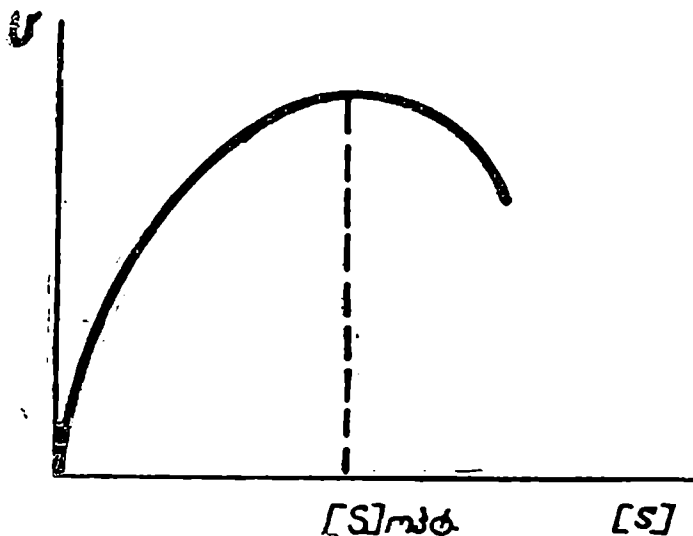
რადგან ხსნარი განზავებულია 200-ჯერ, ამიტომ მისი კონცენტრაცია ტოლი იქნება $0,58 \cdot 10^{-4} \cdot 200 = 1,16 \cdot 10^{-2} M$.

ვინაიდან სარეაქციო არეში (3 მლ) შეიტანება პ-ქლორმერკურიბენზოატის ხსნარის 0,1 მლ, ის ზავდება 30-ჯერ და შესაბამისად ასეთი ხსნარის მოლარობა ტოლი იქნება

$$\frac{1,16 \cdot 10^{-2}}{30} = 0,38 \cdot 10^{-3} M.$$

პ-ქლორმერკურიბენზოატის ხსნარის გაფილტვრა არ შეიძლება, რადგან ქაღალდის ფილტრიდან ხსნარში გადადის ნივთიერება, რომელსაც 230 ნმ-ზე გააჩნია შთანთქმა.

მთელი რიგი ფერმენტებისათვის ნაჩვენებია, რომ ფერმენტული რეაქტივის სიჩქარე სუბსტრატის გარკვეული კონცენტრაციების შემდეგ კონცენტრაციების ზრდასთან ერთად მცირდება. ინჰიბირების ეს სახე ენზიმოლოგიაში ცნობილია, როგორც სუბსტრატული ინჰიბირება. მას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ფერმენტთა მოქმედების მექანიზმების დადგენაში. განტოლება, რომელიც გამოსახავს სუბსტრატული ინჰიბირების შემთხვევას კოორდინატებში $v-[S]$ გამოისახება მაქსიმუმის მქონე მრუდით (სურ. 22).



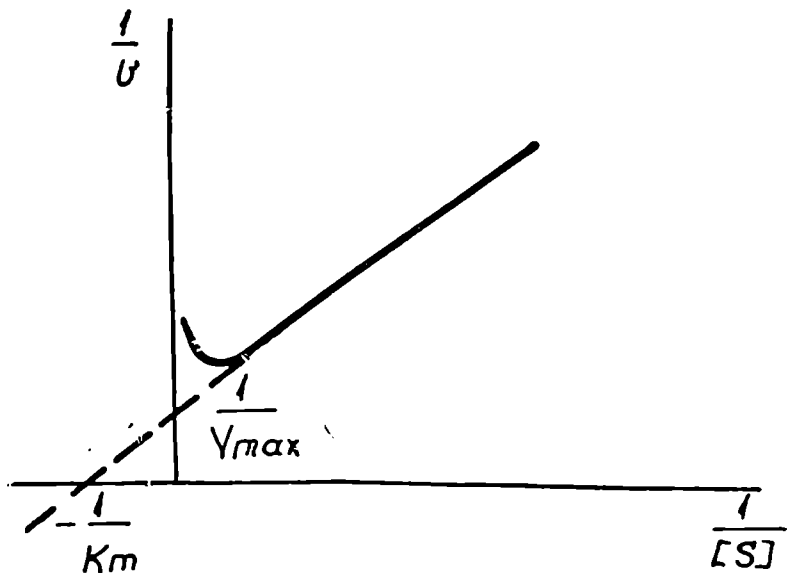
სურ. 22. სუბსტრატული ინჰიბირების გრაფიკული გამოსახვა.

ასეთი რეაქციებისათვის სუბსტრატის იმ კონცენტრაციას, რომელზედაც მიიღწევა მაქსიმალური სიჩქარე ეწოდება სუბსტრატის ოპტიმალური კონცენტრაცია. კარგად უნდა გვახსოვდეს, რომ ამ სიდიდეს გააჩნია დიდი მნიშვნელობა, რადგან ფერმენტის ხვედრითი აქტივობა ისაზღვრება სუბსტრატის ოპტიმალურ კონცენტრაციაზე. ცხადია, ამ დროს დაცული უნდა იყოს სხვა ფაქტორების (pH, იონური ძალა, ტემპერატურა, ფერმენტისა და კოფაქტორების კონცენტრაცია) ოპტიმალური პირობები.

სუბსტრატული ინჰიბირების შემთხვევაში K_m და V_{max} -ის გან-

საზღვრა წარმოებს უპირატესად ორმაგი შებრუნებული სიდიდეებისა და სხვა ანალოგიური მეთოდებით.

მრუდის სწორხაზოვანი ნაწილის ექსტრაპოლირებით ორდინატა და აბსცისა ღერძებამდე მიიღება მონაკვეთები, რომელთა საშუალებითაც განსაზღვრება K_m და V_{max} (სურ. 23).



სურ. 23. K_m -ისა და V_{max} -ის განსაზღვრა სუბსტრატული ინჰიბიტორების შემთხვევაში ორმაგ შებრუნებული სიდიდეების მეთოდით.

სუბსტრატული ინჰიბიტორების მექანიზმი შეიძლება მრავალმხრივი იყოს. უფრო მეტად ეს გამოწვეული უნდა იყოს არააქტიური ფერმენტ-სუბსტრატული კომპლექსების წარმოქმნით სუბსტრატის მაღალი კონცენტრაციების პირობებში. ცხადია, რაც მეტი იქნება სუბსტრატის კონცენტრაცია, მით მეტი იქნება არააქტიური ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნის ალბათობა. საქმე იმაშია, რომ სუბსტრატის თითოეული მოლეკულა უკავშირდება ფერმენტს რამდენიმე წერტილში, ე. ი. წარმოქმნის ბმათა განსაზღვრულ და აუცილებელ რაოდენობას. სუბსტრატის მაღალი კონცენტრაციების დროს სუბსტრატის ყველა მოლეკულა უკვე ველარ უკავშირდება ფერმენტს საჭირო ბმებით, რის გამოც რეაქციის სიჩქარე კლებულობს.

ფერმენტული რეაქციების ინჰიბირება რეაქციის პროდუქტებით, როგორც $v = [S]$ კოორდინატებში გამოისახება ზუსტად ისე, როგორც სუბსტრატული ინჰიბირების შემთხვევაში, როგორც ჩანს, აიხსნება იმ გარემოებით, რომ პროდუქტების დაგროვება იწვევს რეაქციის წონასწორობის გადახრას საწინააღმდეგო მხარისაკენ (მოქმედ მასათა კანონის თანახმად), რის შედეგადაც პირდაპირი რეაქციის სიჩქარე კლებულობს. აქ უნდა გვახსოვდეს, რომ ფერმენტული რეაქციების უმრავლესობისათვის წონასწორობა გადახრილია ერთ-ერთი მხარისაკენ და, როგორც წესი, უკურეაქცია მიმდინარეობს შედარებით ნაკლები სიჩქარით.

ხშირად რეაქციის პროდუქტები გამოდიან ფერმენტის ინჰიბიტორის როლში და სარეაქციო არიდან მათ გაყვანამდე (მოცილებაამდე) გარკვეული დროის განმავლობაში რჩებიან ფერმენტთან დაკავშირებულ მდგომარეობაში, რის შედეგადაც რეაქციის სიჩქარე მცირდება და მით უფრო მეტად, რაც მეტია მათი კონცენტრაცია და სწრაფვა ფერმენტისადმი.

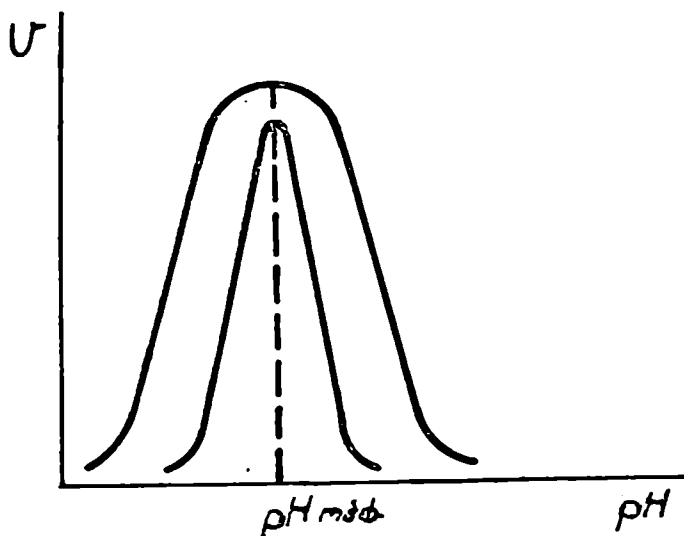
pH-ის გავლენა

pH ანუ წყალბადიონთა კონცენტრაცია დიდ გავლენას ახდენს ფერმენტთა აქტივობაზე. ეს დამოკიდებულება ჩვეულებრივ გამოისახება ზარისმაგვარი მრუდით, ვიწრო ან ფართო მაქსიმუმით pH-ის განსაზღვრულ მნიშვნელობებზე (სურ. 24).

pH-ის იმ მნიშვნელობას, რომელზედაც მქლავდება ფერმენტის მაქსიმალური აქტივობა, ეწოდება pH-ოპტიმუმი. სურათიდან ნათლად ჩანს, თუ რა დიდი მნიშვნელობა ენიჭება pH-ოპტიმუმს. ფერმენტის pH-ოპტიმუმი უნდა დადგინდეს pH-ის კონკრეტულ მნიშვნელობებზე სუბსტრატის ოპტიმალური კონცენტრაციების გამოყენების პირობებში.

უნდა გვახსოვდეს, რომ ერთი და იგივე ფერმენტის pH-ოპტიმუმი შეიძლება განსხვავდებოდეს (ზოგჯერ საგრძნობლადაც) სხვადასხვა ბუფერულ სისტემაში, სხვადასხვა ტემპერატურასა და იონური ძალის შეცვლის პირობებში. გარდა ამისა, ხშირად ერთი და იგივე ფერმენტით კატალიზებული რეაქციების პირდაპირი და შებრუნებული მიმართულებები ხასიათდებიან განსხვავებული pH-ოპტიმუმებით. ფერმენტის აქტივობის შეცვლის ხასიათი pH-ის გავლენით ძალზე რთულია. pH-ით ფერმენტების აქტივობის შეცვლა შეიძლება გამოწვეული იყოს შემდეგი მიზეზებით: აქტიურ ცენტრში იონოგენურ ჯგუფებზე პირდაპირი და არაპირდაპირი ზე-

შოქმედებით. სისტემის არაფერმენტული კომპონენტების იონიზაციის მდგომარეობის ცვლილებით, ფერმენტის მოლეკულის სტრუქტურული ცვლილებით და ა. შ.



სურ. 24. pH-ის გავლენა ფერმენტის აქტივობაზე.

იონური ძალის გავლენა

მრავალი ფერმენტი ძალზე მგრძნობიარეა ბუფერული ხსნარების კონცენტრაციების ცვლილების მიმართ, რაც ჩვეულებრივ გავლენას ახდენს ფერმენტული რეაქციების კინეტიკაზე. არჩევნად ფერმენტის აქტივობაზე ბუფერის შემადგენელი იონების სპეციფიკურ და არასპეციფიკურ გავლენას. არასპეციფიკურია ხსნარის მხოლოდ იონური ძალის გავლენა, მაშინ როცა სპეციფიკური გავლენა გამოიხატება ბუფერის შემადგენელი ზოგიერთი იონების ურთიერთქმედებაში ფერმენტებთან ან რეაქციის ხსეა კომპონენტებთან.

ჩვენ აქ არ განვიხილავთ იმ ეფექტებს, რომლებსაც ადგილი აქვთ ხსნარის იონური შედგენილობის ანდა იონური ძალის ცვლილების დროს. აღვნიშნავთ მხოლოდ, რომ ისევე, როგორც pH-ს და ხსეა ფაქტორებს, ბუფერული ხსნარის იონურ ძალასა და იონურ

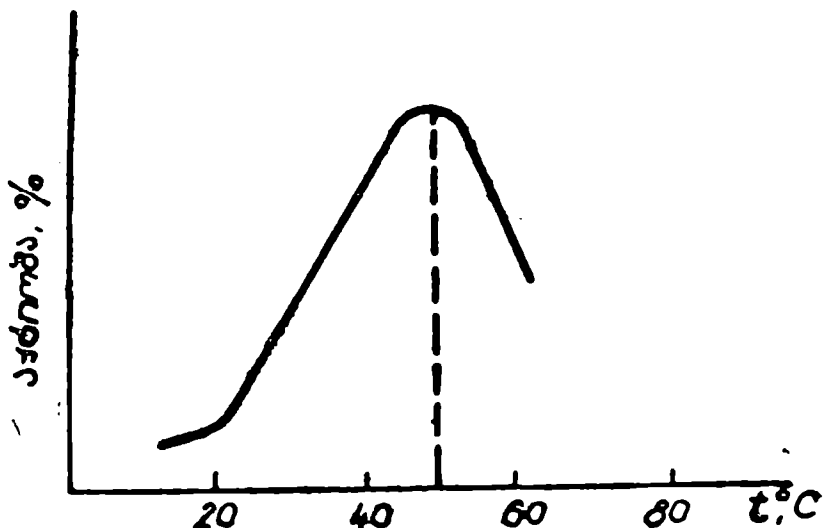
შედგენილობას მნიშვნელოვანი გავლენა აქვთ ფერმენტის აქტივობაზე.

უმჯობესია, რომ ბუფერის კონცენტრაცია იყოს შეძლებისდაგვარად მინიმალური (ფიზიოლოგიური), რომელსაც შეუძლია დაიჭიროს pII-ის საჭირო მნიშვნელობა და შეიცავდეს ისეთ იონებს, რომლებიც არ არიან უცხო ცოცხალი უჯრედისათვის.

იონური ძალის საჭირო დონე შეიძლება შენარჩუნებული იქნას ნეიტრალური მარილების (NaCl, KCl) დამატებით, ან სხვა ორგანული ან არაორგანული მარილებით. გარდა ამისა, საჭიროა შერჩეული იქნეს ისეთი ბუფერული სისტემები, რომლებიც არ მოქმედებენ მოცემულ ფერმენტზე, ე. ი. უნდა ვიპოვათ ისეთ ბუფერულ სისტემებზე, რომლებშიც ფერმენტი ამჟღავნებს მაქსიმალურ აქტივობას.

ტემპერატურის გავლენა

ფერმენტული რეაქციის სიჩქარე, როგორც აღვნიშნეთ, დამოკიდებულია ტემპერატურაზე. მათ შორის დამოკიდებულება კოორდინატებში $v-t$ ასე გამოისახება (სურ. 25).



სურ. 25. ტემპერატურის გავლენა ფერმენტის აქტივობაზე.

როგორც სურათიდან ჩანს, ფერმენტის მოქმედების ტემპერა-

ტურული ოპტიმუმი მდებარეობს 50°C -ზე. ეს ტემპერატურა იწოდება ოპტიმალურად.

ფერმენტული რეაქციის სიჩქარის შემცირება ოპტიმალურზე უფრო მაღალ ტემპერატურაზე აიხსნება ფერმენტის ცილოვანი ნაწილის არასპეციფიკური სითბური დენატურაციით, რის შედეგადაც მკვეთრად ეცემა კატალიზური აქტივობა. ამიტომ ფერმენტის აქტივობის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების ძალზე მნიშვნელოვან მაჩვენებელს წარმოადგენს მისი თერმოსტაბილობა.

ფერმენტის თერმოსტაბილობის განსაზღვრისათვის იღებენ ცალკეულ ნიმუშებს და გარკვეული დროის განმავლობაში აჩერებენ 20° , 30° , 40° , 50° , 60°C და ა. შ. ტემპერატურაზე, შესაბამისად. ინკუბაციის დაშთავრებისას ნიმუშებს სწრაფად აცივებენ და თითოეულში საზღვრავენ ფერმენტის აქტივობას ოპტიმალურ პირობებში.

წნევის გავლენა

ფერმენტული რეაქციების კინეტიკაში გარკვეული მნიშვნელობა ენიჭება წნევას. წნევის გავლენა იმ შემთხვევაში გამოძლევა, როდესაც თუ პროცესს თან ახლავს რეაქციაში მონაწილე კომპონენტების საერთო მოცულობის ცვლილება.

რამდენადაც წნევა ეწინააღმდეგება მოცულობის გაზრდას, წნევის გადიდება წონასწორობას ხრის მარცხნივ, თუ მოცულობა იზრდება, და პირიქით, თუ მოცულობა მცირდება, მაშინ წნევის გადიდებისას წონასწორობა იხრება მარჯვნივ. ამგვარად, თუ წონასწორობის კონსტანტა დამოკიდებულებას იჩენს წნევასთან, მაშინ უნდა შეიცვალოს სიჩქარის მუდმივაც.

ჩვეულებრივად, ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის საბოლოო პროდუქტად გარდაქმნისას გააქტივებული კომპლექსის წარმოქმნა ხდება მოცულობის შემცირებით, ამიტომ მაღალი წნევა ზრდის k_{+2} და აჩქარებს ფერმენტულ რეაქციას.

კინეტიკური პარამეტრების— K_m , V_{max} და K_i -ის

გრაფიკული განსაზღვრის მაგალითები

1. გლუტამინის მჟავა იწვევს არგინაზის (ფკ 3. 5. 3. 1) აქტივობის ინჰიბირებას. გლუტამინის მჟავას კონცენტრაცია მუდმივია და შეადგენს 2.10^{-3}M . ქვემოთ მოყვანილი მონაცემების საფუძველზე დავადგინოთ ინჰიბირების ხასიათი, ე. ი. გლუტამინის მჟავით გამოწვეული ინჰიბირება ემორჩილება კონკურენტული თუ

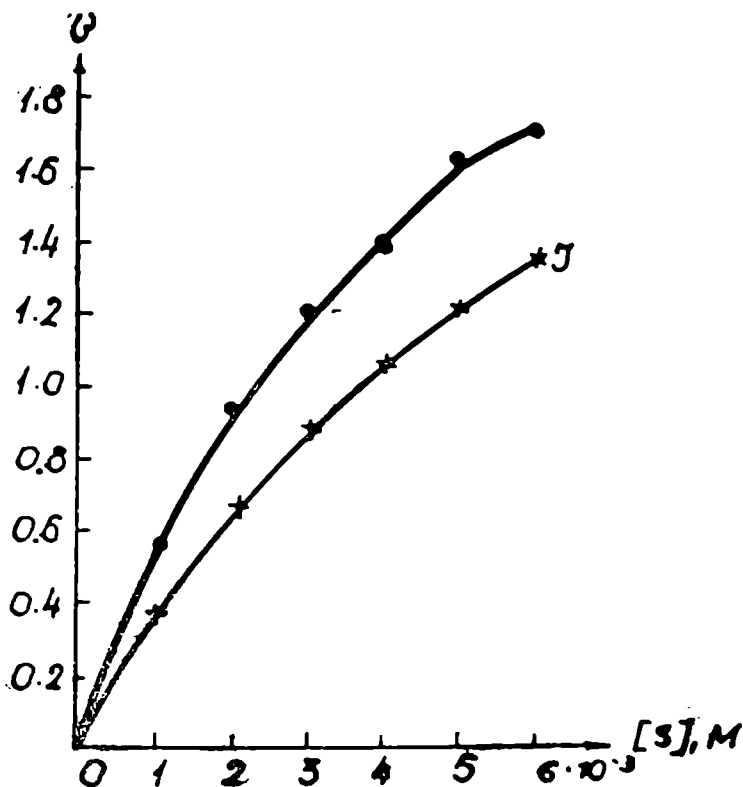
არაკონკურენტული ინჰიბიტორების მექანიზმს. განესაზღვროთ K_m , V_{max} და და ფერმენტ-ინჰიბიტორის კომპლექსის დისოციაციის კონსტანტა — K_i .

სუბსტრატის კონცენტრაცია, M $1 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $6 \cdot 10^{-3}$

რეაქციის სიჩქარე გლუტამინის
მეფას გარეშე (v) 0,55, 0,92, 1,19, 1,40, 1,60, 1,70

რეაქციის სიჩქარე გლუტამინის
მეფას თანამყოფობისას (v_i) 0,37, 0,65, 0,88, 1,05, 1,20, 1,35

ექსპერიმენტული მონაცემების საფუძველზე, პირველ რიგში, ვაგებთ დამოკიდებულებას რეაქციის სიჩქარესა და სუბსტრატის კონცენტრაციას შორის: შესაფერისი მასშტაბის შერჩევის შემდეგ მიიღება მრუდები, როგორც ეს გამოსახულია სურ. 26.



სურ. 26. ექსპერიმენტული მონაცემები კოორდინატებში $v-[S]$

ამ მრუდების მიხედვით გაძნელებულია იზომირების ხასიათის დადგენა, $V_{\max}$ და K_m -ის მნიშვნელობების განსაზღვრა. ამიტომ უმჯობესია ვისარგებლოთ ლაინუივერისა და ბერკის ორმაგი შებრუნებული სიდიდეების მეთოდით. აგრეთვე გამოვსახოთ ექსპერიმენტული მონაცემები კოორდინატებში $\frac{[S]}{v} - [S]$ და $v - \frac{v}{[S]}$, როგორც ცნობილია უკანასკნელ სამ შემთხვევაში მიიღება სწორი ხაზები. ამისათვის საჭიროა საწყისი ექსპერიმენტული მონაცემები გაზოსახულ იქნას შესაბამის სიდიდეებში (ცხრ. 2).

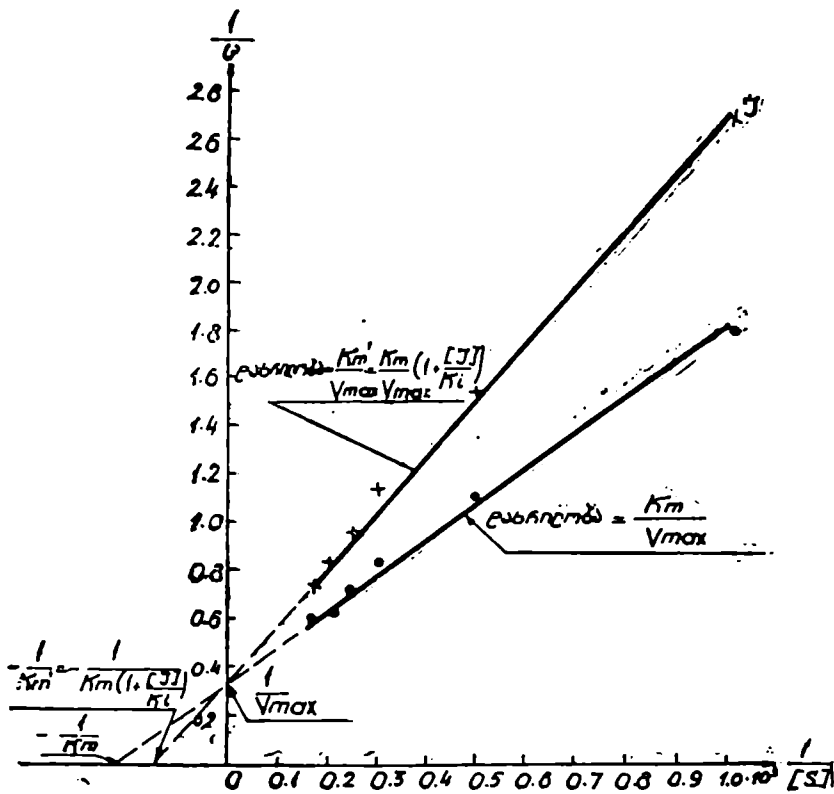
ცხრილი 2

ექსპერიმენტული მონაცემები გამოსახული სხვადასხვა სიდიდეებში

[S]	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$
v	0,55	0,92	1,19	1,40	1,60	1,70
v_t	0,37	0,65	0,88	1,05	1,20	1,35
$\frac{1}{[S]}$	$1 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^3$	$0,3 \cdot 10^3$	$0,25 \cdot 10^3$	$0,2 \cdot 10^3$	$0,17 \cdot 10^3$
$\frac{1}{v}$	1,82	1,09	0,84	0,71	0,63	0,59
$\frac{1}{v_t}$	2,70	1,54	1,14	0,95	0,83	0,74
$\frac{[S]}{v}$	$1,82 \cdot 10^{-3}$	$2,17 \cdot 10^{-3}$	$2,52 \cdot 10^{-3}$	$2,86 \cdot 10^{-3}$	$3,125 \cdot 10^{-3}$	$3,53 \cdot 10^{-3}$
$\frac{[S]}{v_t}$	$2,70 \cdot 10^{-3}$	$3,08 \cdot 10^{-3}$	$3,41 \cdot 10^{-3}$	$3,81 \cdot 10^{-3}$	$4,17 \cdot 10^{-3}$	$4,44 \cdot 10^{-3}$
$\frac{v}{[S]}$	$0,55 \cdot 10^3$	$0,46 \cdot 10^3$	$0,4 \cdot 10^3$	$0,35 \cdot 10^3$	$0,32 \cdot 10^3$	$0,28 \cdot 10^3$
$\frac{v_t}{[S]}$	$0,37 \cdot 10^{-3}$	$0,325 \cdot 10^{-3}$	$0,23 \cdot 10^{-3}$	$0,26 \cdot 10^{-3}$	$0,24 \cdot 10^{-3}$	$0,225 \cdot 10^{-3}$

27 სურათზე ნაჩვენებია წრფეები, რომლებიც მიღებულია კინეტიკური მონაცემების დამუშავებით ლაინუივერისა და ბერკის მეთოდით. როგორც ჩანს, წრფეები კოორდინატებში $\frac{1}{v} - \frac{1}{[S]}$

ორდინატა ღერძს კვეთენ ერთ წერტილში $\frac{1}{V_{\max}} = 0,33$, ხოლო აბსცისთა ღერძს — განსხვავებულ წერტილებში:



სურ. 27. ექსპერიმენტული მონაცემები ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში.

$$-\frac{1}{K_m} = -0,22 \cdot 10^3 \text{ და } -\frac{1}{K'_m} = -\frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[J]}{K_i}\right)} = -0,14 \cdot 10^3.$$

აბსცისთა და ორდინატთა ღერძზე მოკვეთილი სიდიდეების მიხედვით განისაზღვრება $V_{\max}$, K_m , K'_m და K_i

$$V_{\max} = 1/0,33 = 3,03 \quad K_m = 1/0,22 \cdot 10^3 = 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ M} \\ K'_m = 1/0,14 \cdot 10^3 = 7,15 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

რადგან K_m -ს აქვს კონცენტრაციის განზომილება, ამიტომ მისი განსაზღვრისათვის მნიშვნელობა არა აქვს თუ რა ერთეულებში იქნება გამოსახული რეაქციის სიჩქარე. K_i განისაზღვრება შემდეგი ტოლობის საფუძველზე

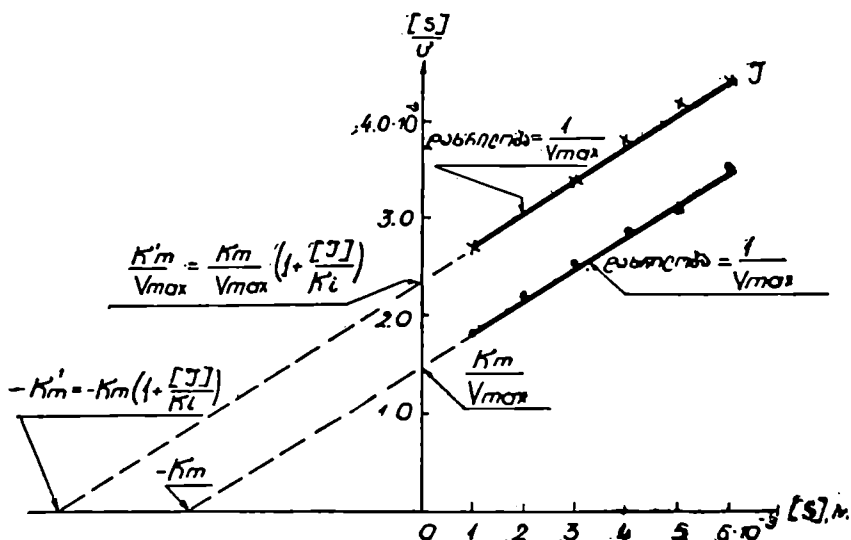
$$-\frac{1}{K'_m} = -\frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[J]}{K_i}\right)}$$

საიდანაც

$$K_i = \frac{K_m [J]}{K'_m - K_m} = \frac{4,5 \cdot 10^{-3} \cdot 2 \cdot 10^{-3}}{7,15 \cdot 10^{-3} - 4,5 \cdot 10^{-3}} = 3,4 \cdot 10^{-3} M$$

K_m , V_{max} და K_i შეიძლება განსაზღვრული იქნან აგრეთვე წრფეების დახრილობის მიხედვით.

28 სურათზე მოცემულია წრფეები კოორდინატებში $\frac{[S]}{v} - [S]$. ორივე წრფის დახრილობა ერთნაირია (წრფეები პარალელურია) და უდრის $1/V_{max}$. აბსცისთა ღერძს წრფეები კვეთენ წერტილებში:—



სურ. 28. ექსპერიმენტული მონაცემები კოორდინატებში $[S]/v - [S]$

$$-K_m = -4,5 \cdot 10^{-3} M \quad (K_m = 4,5 \cdot 10^{-3} M)$$

და

$$-K'_m = -K_m \left(1 + \frac{[J]}{K_i}\right) = -7,1 \cdot 10^{-3} M \quad (K'_m = 7,1 \cdot 10^{-3} M).$$

ორდინატთა ღერძს წრფეები კვეთენ წერტილებში:

$$\frac{K_m}{V_{\max}} = 1,5 \cdot 10^{-3}$$

და

$$\frac{K'_m}{V_{\max}} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right) = 2,4 \cdot 10^{-3}.$$

ამ ტოლობებიდან განისაზღვრება $V_{\max}$ და K_i

$$V_{\max} = \frac{4,5 \cdot 10^{-3}}{1,5 \cdot 10^{-3}} = 3,0$$

$$K_i = \frac{[J] K_m}{2,4 \cdot 10^{-3} \cdot V_{\max} - K_m} = \frac{2 \cdot 10^{-3} \cdot 4,5 \cdot 10^{-3}}{2,4 \cdot 10^{-3} \cdot 3 - 4,5 \cdot 10^{-3}} = 3,3 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

$V_{\max}$ შეიძლება განისაზღვროს აგრეთვე წრფის დახრილობის, ხოლო K_i — აბსცისთა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთის სიდიდის მიხედვითაც.

29 სურათზე წარმოდგენილია კინეტიკური მონაცემები კოორდინატებში $v - \frac{v}{[S]}$; წრფეები ორდინატთა ღერძს კვეთენ ერთ წერტილში $V_{\max} = 3,0$.

წრფის დახრილობა ინჰიბიტორის გარეშე ტოლია — K_m , ხოლო ინჰიბიტორის თანამყოფობისას

$$-K'_m = -K_m \left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right).$$

K_m და K'_m -ის განსაზღვრა წარმოებს დახრილობის მიხედვით.

$$\begin{aligned} -K_m = \text{დახრილობა} &= \operatorname{tg} (180^\circ - \alpha) = -\operatorname{tg} \alpha = -\frac{b}{a} = \\ &= -0,45/0,1 \cdot 10^3 = -4,5 \cdot 10^{-3} \text{ M} \end{aligned}$$

$$K_m = 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

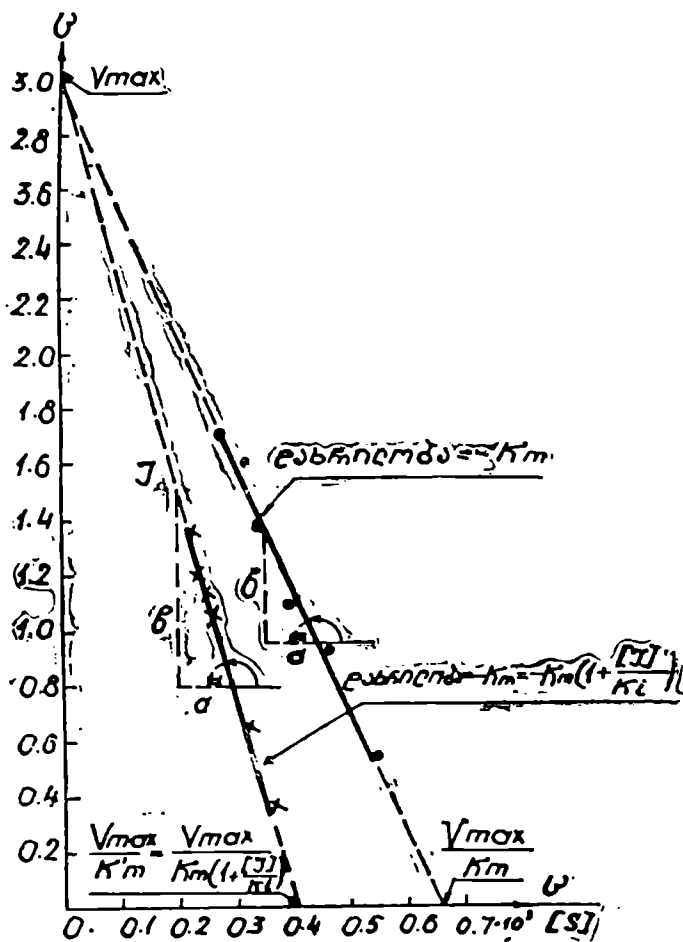
$$\begin{aligned} -K_{im} = \text{დახრილობა} &= \operatorname{tg} (180^\circ - \alpha) = -\operatorname{tg} \alpha = -\frac{b}{a} = \\ &= -0,71/0,1 \cdot 10^3 = -7,1 \cdot 10^{-3} \text{ M} \end{aligned}$$

$$K'_m = 7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

K_i განსაზღვრა შეიძლება დახრილობის ან აბსცისთა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთის სიდიდის მიხედვით. მაგალითად, დახრილობის მიხედვით

$$K_i = \frac{K_m |J|}{K'_m - K_m} = \frac{4,5 \cdot 10^{-3} \cdot 2 \cdot 10^{-3}}{7,1 \cdot 10^{-3} - 4,5 \cdot 10^{-3}} = 3,3 \cdot 10^{-3} M$$

საჩივე გრაფიკული მეთოდით განსაზღვრული K_m , K'_m , V_{max} და K_i -ის მნიშვნელობები ერთმანეთს კარგად ემთხვევა.



სურ. 29. ექსპერიმენტული მონაცემები კოორდინატებში $v - v/[s]$

ამგვარად, ჩვენს მიერ განხილულ მაგალითში გლუტამინის მეა-
ვა გამოდის კონკურენტული ინჰიბიტორის როლში, რადგან მისი გავ-

ლენით იცვლება მიხაელისის კონსტანტა (K_m) და არ იცვლება მაქსიმალური სიჩქარე (V_{max}).

2. სალიცილატი იწვევს გლუტამატდეჰიდროგენაზის აქტივობის ინჰიბირებას. სალიცილატის კონცენტრაცია მუდმივია და შეადგენს $4.10^{-2}M$. ქვემოთ მოყვანილი მონაცემების საფუძველზე დავადგინოთ ინჰიბირების ხასიათი, განვსაზღვროთ K_{m1} , V_{max} და K_i .

სუბსტრატის კონცენტრაცია, M $1.5 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-3}$, $8 \cdot 10^{-4}$, $16 \cdot 10^{-3}$.

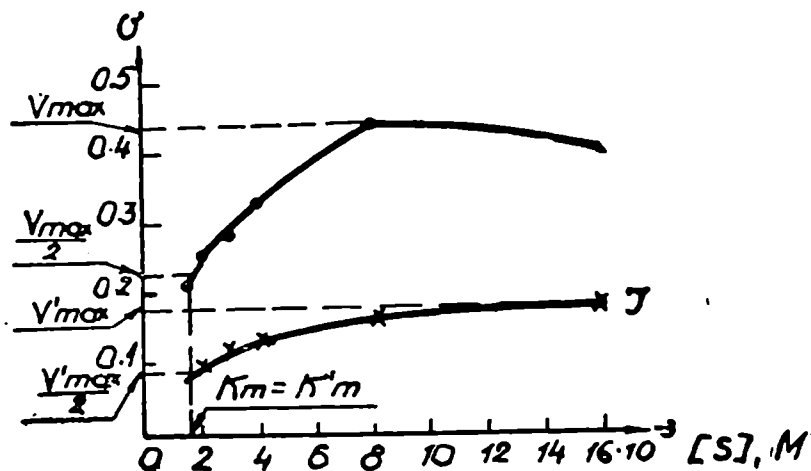
პროდუქტის დაგროვების სიჩქარე სალიცილატის გარეშე (v), მგ/წთ

0,21 0,25 0,28 0,33 0,44 0,40

პროდუქტის დაგროვების სიჩქარე სალიცილატის თანამყოფობისას (v_i), მგ/წთ

0,08, 0,10, 0,12, 0,13, 0,16, 0,18

ექსპერიმენტული მონაცემების საფუძველზე ვაგებთ დამოკიდებულებას რეაქციის სიჩქარესა და სუბსტრატის კონცენტრაციას შორის (სურ. 30). ამ მრუდების მიხედვით არ შეიძლება ქვე-



სურ. 30. ექსპერიმენტული მონაცემები კოორდინატებში $v-[S]$

მარიტი V_{max} განსაზღვრა და შესაბამისად K_m -ის ზუსტი მნიშვნელობის დადგენა. ამ გრაფიკიდან ჩანს, რომ $K_m = K'_m = 1.75 \cdot 10^{-3} M$, ხოლო $V_{max} = 0.44$ და მაქსიმალური სიჩქარე ინჰიბიტორის თანამყოფობისას $V'_{max} = 0.18$.

როგორც ჩანს, მიხაელისის კონსტანტები სალიცილატის თანამყოფობისას და მის გარეშე ერთმანეთის ტოლია, ხოლო მაქსი-

ზალური სიჩქარეები განსხვავებული, რაც მიუთითებს არაკონკურენტული ინჰიბირების მექანიზმების არსებობაზე. მაგრამ კინეტიკური პარამეტრების ქვეშარიტი მნიშვნელობების დადგენისათვის უმჯობესია ლაინივიერისა და ბერკის ორმაგი შებრუნებული სიდიდეების მეთოდის გამოყენება, ანდა ექსპერიმენტული მონაცემების გრაფიკული გამოსახვა კოორდინატებში $\frac{[S]}{v} - [S]$ და $v - \frac{v}{[S]}$. ზემოთ დასახელებულ კოორდინატებში კინეტიკური კანონზომიერებების გამოსახატავად საჭიროა საწყისი ექსპერიმენტული მონაცემების შესაბამის სიდიდეებში გამოსახვა (ცხრილი 3).

ცხრილი 3

ექსპერიმენტული მონაცემები გამოსახული სხვადასხვა სიდიდეებში

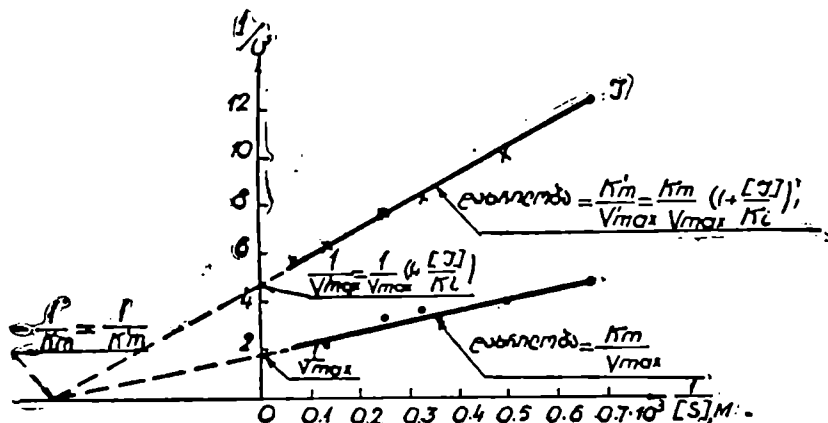
[S]	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$8,0 \cdot 10^{-3}$	$16,0 \cdot 10^{-3}$
v	0,21	0,25	0,28	0,33	0,44	0,40
v_i	0,08	0,10	0,12	0,13	0,16	0,18
$\frac{1}{[S]}$	$0,67 \cdot 10^3$	$0,50 \cdot 10^3$	$0,33 \cdot 10^3$	$0,25 \cdot 10^3$	$0,13 \cdot 10^3$	$0,06 \cdot 10^3$
$\frac{1}{v}$	4,76	4,00	3,57	3,33	2,25	2,50
$\frac{1}{v_i}$	12,5	10,00	8,33	7,69	6,25	5,56
$\frac{[S]}{v}$	$7,14 \cdot 10^{-3}$	$8,00 \cdot 10^{-3}$	$10,71 \cdot 10^{-3}$	$13,32 \cdot 10^{-3}$	$18,08 \cdot 10^{-3}$	$40,0 \cdot 10^{-3}$
$\frac{[S]}{v_i}$	$18,75 \cdot 10^{-3}$	$20,0 \cdot 10^{-3}$	$24,99 \cdot 10^{-3}$	$30,76 \cdot 10^{-3}$	$50,0 \cdot 10^{-3}$	$88,96 \cdot 10^{-3}$
$\frac{v}{[S]}$	$1,41 \cdot 10^2$	$1,25 \cdot 10^2$	$0,92 \cdot 10^2$	$0,83 \cdot 10^2$	$0,57 \cdot 10^2$	$0,24 \cdot 10^2$
$\frac{v_i}{[S]}$	$0,54 \cdot 10^2$	$0,50 \cdot 10^2$	$0,40 \cdot 10^2$	$0,33 \cdot 10^2$	$0,21 \cdot 10^2$	$0,11 \cdot 10^2$

31 სურათზე წარმოდგენილია წრფეები, რომლებიც მიღებული არიან ორმაგი შებრუნებული სიდიდეების მეთოდის გამოყენებით.

როგორც ჩანს, წრფეები ერთმანეთს კვეთენ აბსცისთა ღერძზე წერტილში

$$-\frac{1}{K_m} = -\frac{1}{K'_m} = -0,42 \cdot 10^3 \left(K_m = K'_m = \frac{1}{0,42 \cdot 10^3} = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M} \right),$$

ხოლო ორდინატთა ღერძს ეს წრფეები კვეთენ სხვადასხვა წერტილებში:



სურ. 31. ექსპერიმენტული მონაცემები დამუშავებული ორმაგი შებრუნებული სიდიდეების მეთოდით.

$$\frac{1}{v_{\max}} = 1,8 \quad \left(v_{\max} = \frac{1}{1,8} = 0,55 \right)$$

$$\frac{1}{v'_{\max}} = \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right) = 4,8 \quad \left(v'_{\max} = \frac{1}{4,8} = 0,21 \right)$$

K_i -ის განსაზღვრა წარმოებს შემდეგი ტოლობის საფუძველზე

$$\frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right) = 4,8,$$

საიდანაც

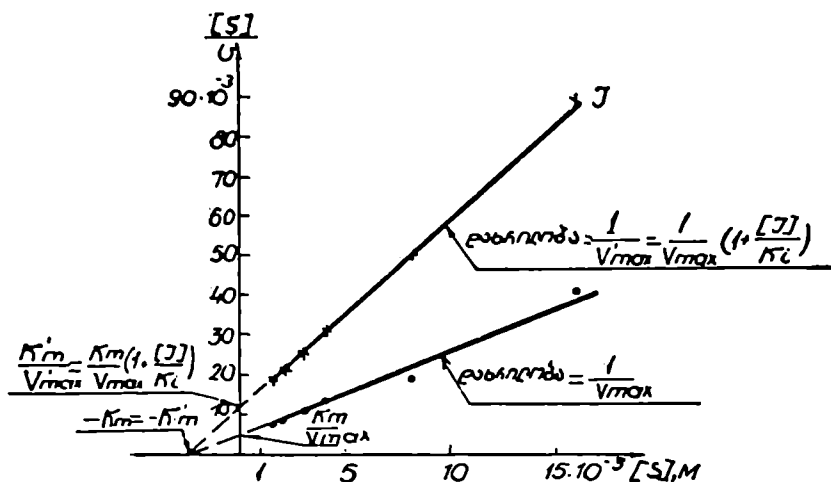
$$K_i = \frac{[J]}{4,8 \cdot v_{\max} - 1} = \frac{4 \cdot 10^{-3}}{4,8 \cdot 0,55 - 1} = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

K_m , V_{max} , V'_{max} და K_i -ის განსაზღვრა შეიძლება წრფეების დახრილობის მიხედვითაც.

32 სურათზე წარმოდგენილია წრფეები კოორდინატებში

$$\frac{[S]}{v} - [S].$$

ამ გრაფიკზე ორივე წრფე აბსცისთა ღერს კვეთს ერთ წერტილში



სურ. 32. ექსპერიმენტული მონაცემები კოორდინატებში $[S]/v - [S]$

$$-K_m = -K'_m = -2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M} \quad (K_m = K'_m = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}),$$

ხოლო ორდინატთა ღერძს — განსხვავებულ წერტილებში:

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 4,4 \cdot 10^{-3}, \quad \frac{K'_m}{V'_{max}} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[J]}{K_i}\right) = 11,25 \cdot 10^{-3}$$

ამ პტოლობებიდან განისაზღვრება V_{max} და V'_{max}

$$V_{max} = \frac{K_m}{4,4 \cdot 10^{-3}} = \frac{2,4 \cdot 10^{-3}}{4,4 \cdot 10^{-3}} = 0,54$$

$$V'_{max} = \frac{K'_m}{11,25 \cdot 10^{-3}} = \frac{2,4 \cdot 10^{-3}}{11,25 \cdot 10^{-3}} = 0,21$$

K_i განვსაზღვროთ შემდეგი ტოლობიდან

$$\frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[J]}{K_i} \right) = 11,25 \cdot 10^{-3}$$

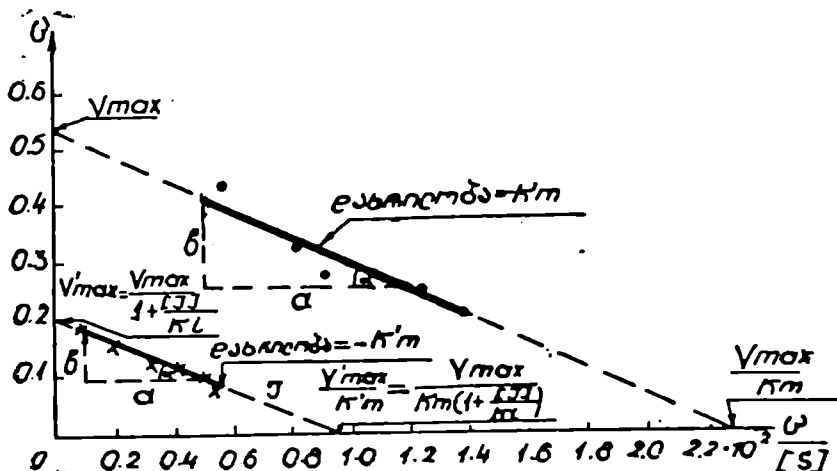
საიდანაც

$$K_i = \frac{K_m [J]}{11,25 \cdot 10^{-3} \cdot V_{\max} - K_m} = \frac{2,4 \cdot 10^{-3} \cdot 4 \cdot 10^{-3}}{11,25 \cdot 10^{-3} \cdot 0,54 - 2,4 \cdot 10^{-3}} = 2,6 \cdot 10^{-2} M$$

$V_{\max}$, $V'_{\max}$ და K_i შეიძლება აგრეთვე განისაზღვრონ წრფეების დახრილობის მიხედვით.

33 სურათზე მოცემულია წრფეები კოორდინატებში $v - \frac{v}{[S]}$.

როგორც ჩანს, ორივე წრფის დახრილობა ერთნაირია (წრფეები პარალელურია) და უდრის $-K_{ii} = -K'_{ii}$



სურ. 33. ექსპერიმენტული მონაცემები კოორდინატებში $v - v/[S]$

$$\begin{aligned} -K_m = \text{დახრილობა} &= \operatorname{tg}(180^\circ - \alpha) = -\operatorname{tg} \alpha = -\frac{b}{a} = -\frac{0,16}{0,68 \cdot 10^2} = \\ &= -2,4 \cdot 10^{-3} M \\ K_m &= 2,4 \cdot 10^{-3} M \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} -K'_{ii} = \text{დახრილობა} &= \operatorname{tg}(180^\circ - \alpha) = -\operatorname{tg} \alpha = -\frac{b}{a} = -\frac{0,09}{0,38 \cdot 10^2} = \\ &= -2,4 \cdot 10^{-3} M \\ K'_{ii} &= 2,4 \cdot 10^{-3} M \end{aligned}$$

ეს წრფეები აბსცისთა და ორდინატთა ღერძს კვეთენ განსხვავებულ წერტილებში: აბსცისთა ღერძს — წერტილებში:

$$\frac{V_{\max}}{K_m} = 2,28 \cdot 10^2$$

და

$$\frac{V_{\max}}{K'_m} = \frac{V_{\max}}{K_m \left(1 + \frac{|J|}{K_i}\right)} = 0,95 \cdot 10^2;$$

ხოლო ორდინატთა ღერძს წერტილებში: $V_{\max} = 0,54$ და

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{|J|}{K_i}} = 0,21.$$

K_i -ის განსაზღვრა შეიძლება როგორც ორდინატთა ისე აბსცისთა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთების სიდიდეებიდან. მაგალითად, ორდინატთა ღერძზე მოკვეთილი სიდიდის მიხედვით განსაზღვრა წარმოებს შემდეგი ტოლობის თანახმად

$$\frac{V_{\max}}{1 + \frac{|J|}{K_i}} = 0,21$$

საიდანაც

$$K_i = \frac{0,21 \cdot |J|}{V_{\max} - 0,21} = \frac{0,21 \cdot 4 \cdot 10^{-2}}{0,54 - 0,21} = 2,5 \cdot 10^{-2} M$$

ისევე როგორც პირველ მაგალითში, ამ შემთხვევაშიც, სხვადასხვა გრაფიკული მეთოდებით განსაზღვრული კინეტიკური პარამეტრების მნიშვნელობები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან უმნიშვნელოდ.

როგორც განხილული მაგალითებიდან ჩანს, $V_{\max}$ და K_m სიდიდეების განსაზღვრა კოორდინატებში v — $[S]$ ყოველთვის იძლევა შემცირებულ მნიშვნელობებს.

ამგვარად, სალიცილატი იწვევს გლუტამატდეჰიდროგენაზის აქტივობის შემცირებას არაჟონურენტული ინჰიბიტორების მექანიზმით, რადგან მისი გავლენით არ იცვლება მიხაელისის კონსტანტა, მაგრამ იცვლება მაქსიმალური სიჩქარე.

1. კოკონაშვილი ვ. ფიზიკური ქიმია ტ. 3. თსუ. თბილისი, 1974.
2. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. Пер. с англ., М., «Мир», 1972.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. «Мир», М., 1966.
4. Керридж Д., Типтон К. Биохимическая логика. «Мир», М., 1974.
5. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. «Наука», М., 1974.
6. Ленинджер А. Л. Биохимия. Пер. с англ., «Мир», М., 1974.
7. Механизм и кинетика ферментативного катализа. под ред. А. Е. Браунштейна и В. А. Яковлева, «Наука», М., 1964.
8. Паттон Л. Энергетика и кинетика биохимических процессов. Пер. с англ., «Мир», М., 1968.
9. Уолтер Ю. Кинетика ферментативных реакций. «Мир», М., 1969.
10. Уэбб Э. Ингибиторы ферментов и метаболизма. «Мир», М., 1966.
11. Уэстли Дж. Ферментативный катализ. «Мир», М., 1972.
12. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа, «Наука», М., 1965.
13. Boyer P. D. Spectrophotometric study of the reaction of protein sul-fydryl groups with organic mercurials. J. Amer. Chem. Soc., 76, 17, 4331, 1954.
14. Reiner J. M. Behavior of enzyme systems. N. Y. 1969.



ფერმენტების ბიოსინთეზი

ფერმენტების ბიოსინთეზის საერთო სქემა

ინდივიდუალური ფერმენტების ბიოსინთეზი ცილების სინთეზის ცნობილი სქემის სრული ანალოგიით მიმდინარეობს (სურ. 34). ამ პროცესის შესწავლაში დიდი ღვაწლი მიუძღვის ჯეიმს უოტსონსა და ფრენსის კრიკს. მათ მიერ პირველად იქნა დადგენილი დეზოქსირიბონუკლეინის მექავას გენეტიკური კოდის ტრანსკრიბციისა და ტრანსლაციის ცალკე ეტაპები.

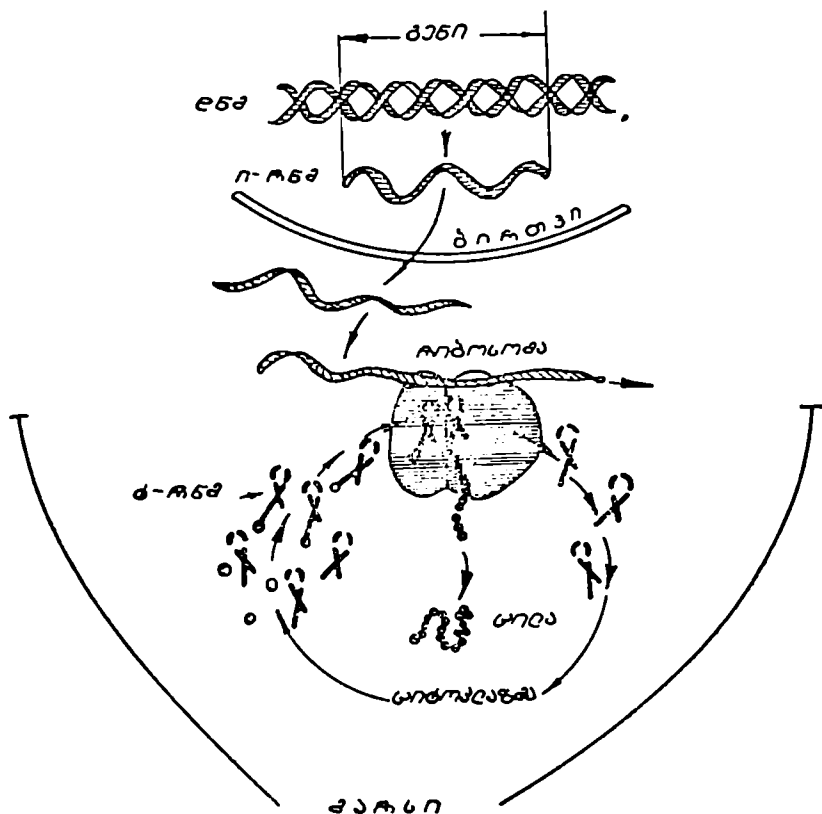
ძირითადი როლი ფერმენტების ბიოსინთეზში მიეკუთვნება არაჩვეულებრივად გრძელი ხაზოვანი სტრუქტურის მქონე ბიოპოლიმერს — დეზოქსირიბონუკლეინის მექავას — დნმ-ს. ცნობილია, რომ დნმ ლოკალიზებულია სავსებით განსაზღვრულ ადგილას. ეუკარიოტულ ორგანიზმებში დნმ, როგორც წესი, წარმოდგენილია ბირთვებში და ნაწილობრივ მიტოქონდრიებში, ხოლო პროკარიოტულ ორგანიზმებში — ბაქტერიებში, წყალმცენარეებსა და სხვა, დნმ დაგროვილია ცალკე, ე. წ. ნუკლეარული წარმონაქმნის სახით.

დნმ შედგება ორი პოლიმერული ჯაჭვისაგან, რომლებიც ურთიერთ „იგრძნებიან“ ორწვერა თოკის სახით. დნმ-ის მაკრომოლეკულა შედგება ოთხი ტიპის მონონუკლეოტიდისაგან, სახელდობრ: ადენილის, გუანილის, ციტიდილისა და თიმიდილის ნუკლეოტიდებისაგან. ისინი ერთი მეორესთან დაკავშირებულნი არიან ფოსფორიკური ბმებით. ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობა სპეციფიკურია და მკაცრად განსაზღვრულია ყოველი ცალკეული ტიპის დნმ-ისათვის.

დნმ-ის მაკრომოლეკულური სტრუქტურის საფუძველს წარმოადგენს ე. წ. კომპლემენტარობის პრინციპი. ეს იმაში მდგომარეობს, რომ დნმ-ის ორი ჯაჭვი ურთიერთ დაკავშირებულია ნუკლეოტიდებს შორის წყალბადის ბმების საშუალებით. წყალბადის ბმე-

ბი წარმოიქმნება ყველაზე ოპტიმალური ვარიანტით: ერთი ჯაჭვის თიმინისა და ადენინის ნაშთები უკავშირდება მეორე ჯაჭვის გუანინსა და ციტოზინს.

დნმ-ის მოლეკულის გარკვეული ფრაგმენტით ისაზღვრება ცისტრონი ანუ გენი. გენის ფრაგმენტში კოდირებულია ერთი



სურ. 34. ცილების ბიოსინთეზის სქემატური გამოსახულება.

გარკვეული ტიპის ცილის ბიოსინთეზის ინფორმაცია. მხედველობაში თუ მივიღებთ იმ გარემოებას, რომ დნმ-ის მოლეკულა არაჩვეულებრივად გრძელია, ცხადი გახდება, რომ დნმ-ში კოდირებულია განსხვავებული ფერმენტებისა და სხვადასხვა ცილების ბიოსინთეზის შესაძლებლობის უსაზღვროდ დიდი რაოდენობა.

გენის უნიკალური სტრუქტურა ისაზღვრება ნუკლეოტიდების

შენების გარკვეული თანმიმდევრობით. ის შეიცავს ცალკეული ფერმენტის სტრუქტურის სრულ ინფორმაციას. ჭერჭერობით არ არის შესწავლილი ყველა ცნობილი ფერმენტის ბიოსინთეზის დეტალუბი. მაგრამ არსებული დიდი მოცულობის ფაქტიური მონაცემები იმაზე მიუთითებენ, რომ ყველა ფერმენტის ბიოსინთეზის ზოგადი მექანიზმი იდენტური უნდა იყოს. ეს მექანიზმი ისაზღვრება დნმ-ის აქტივობით.

დნმ და მისი ცალკეული უბნები უშუალოდ მონაწილეობას არ იღებენ ცილის სინთეზში. დნმ-ის მაკრომოლეკულაში კოდირებული ინფორმაციის გადაცემის პირველ ეტაპს წარმოადგენს ინფორმაციის „გადაწერა“ სხვა სახის ნუკლეინის მკავაზე კერძოდ ინფორმაციული რიბონუკლეინის მკავაზე. ამ პროცესის დროს, რომელსაც ტრანსკრიპცია ეწოდება, დნმ-ის შესაბამის უბანზე, გენზე, მიმდინარეობს მისი მსგავსი ნუკლეინის მკავას—ინფორმაციული რნმ-ის სინთეზი.

ინფორმაციული რნმ-ის შენება ემსგავსება დნმ-ის გარკვეული ჯაჭვის შენებას იმ განსხვავებით, რომ ის თიმილის ნაცვლად შეიცავს ურაცილს და დეზოქსირიბოზის ნაცვლად რიბოზას. ი-რნმ-ის მოლეკულა წარმოადგენს ერთი ჯაჭვიდან შემდგარ პოლიმერს, რომელიც აშენებულია ადენილის, გუანილის, ციტიდილისა და ურაცილის ოთხი ტიპის ნუკლეოტიდების ნაშთებიდან. ამ ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობა რნმ-ში ზუსტად იმეორებს დნმ-ის ერთ-ერთი გარკვეული ფრაგმენტის ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობას. დნმ-ის სხვადასხვა მატრიცებიდან მიღებული ინფორმაციული რნმ-ები ნაწილდებიან უჯრედში და სხვა ნაერთებთან და სტრუქტურებთან ერთად უკვე უშუალო მონაწილეობას ლებულობენ ცილის სინთეზში. თითოეული გენიდან ინფორმაციული რნმ-ის ენაზე გადაყვანილი დიდი რაოდენობით „ასლების“ მიღებაა შესაძლებელი.

გამოირკვა, რომ ინფორმაციული რნმ-ების ხვედრითი წონა სხვა ტიპის რიბონუკლეინის მკავებში შედარებით მცირეა, მათი რაოდენობა ყველა რნმ-ების 3—5%-ს შეადგენს. ეს რაოდენობა სავსებით აკმაყოფილებს სინთეზის პროცესში მყოფ ყველა სახის ცილასა და ფერმენტს.

როგორც ცნობილია, ცილა შედგება 20 სახის სხვადასხვა ტიპის ამინომკავებისაგან, რომლებიც ერთმანეთთან დაკავშირებულნი არიან პეპტიდური ბმებით. ცილის შემადგენელი ამინომკავების თანმიმდევრობა ბიოსინთეზის დროს ინფორმაციული რნმ-ის მოლეკულაშია კოდირებული. მაგრამ საჭიროა ამ ამინომკავების წინასწარ გააქტივება, რომ გაადვილდეს მათი გამოყენება ცილის სინ-

თეზში. ამ ფუნქციას ასრულებს უჯრედში არსებული რიბონუკლეინის მექავას განსაკუთრებული სახეობა, რომელსაც ადაპტორული ან ტრანსპორტული რიბონუკლეინის მექავა ეწოდება. ყოველი ცალკეული ამინომექავასათვის არსებობს სპეციფიკური ტრანსპორტული რნმ. ამინომექავა კავშირდება ამ ტიპის რნმ-ის ერთ ბოლოში და ამ გზით გადაიტანება რიბოსომებზე, სადაც უშუალოდ წარმოებს ცილის სინთეზი. უნდა აღინიშნოს, რომ ინფორმაციულ რნმ-თან შედარებით ტრანსპორტული რნმ-ის მოლეკულური მასა გაცილებით მცირეა და უდრის დაახლოებით 25000.

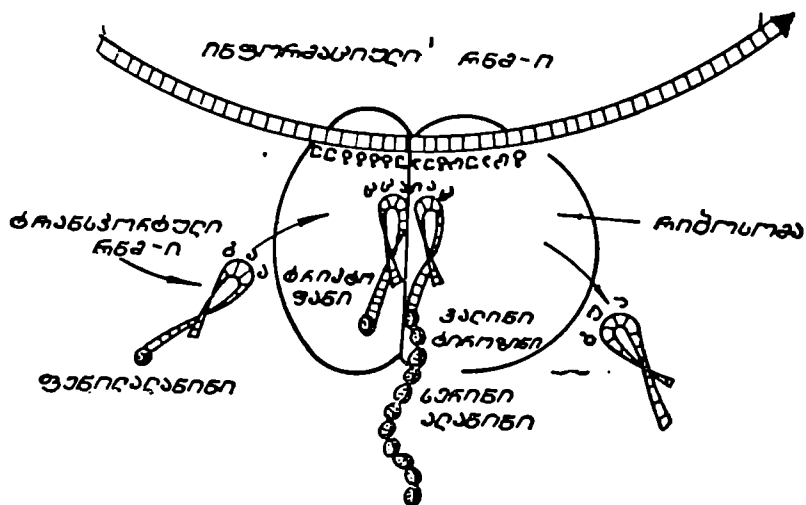
ცილის სინთეზის მთავარ მომენტს წარმოადგენს განსაკუთრებული სტრუქტურის მქონე პოლისომების შექმნა. ამ პროცესში მონაწილეობას ღებულობს: ინფორმაციული რნმ, ტრანსპორტული რნმ, რიბოსომები და ცილოვანი ფაქტორები.

ვინაიდან ინფორმაციული რნმ გრძელი ჯაჭვის მქონე პოლიმერია, მასზე შესაძლებელი ხდება ერთდროულად დაკავშირდეს ბევრი მოქმედი რიბოსომა. რიბოსომა ციტოპლაზმის მიკროსკოპული ნაწილაკაა, რომელიც ინფორმაციულ რნმ-ში არსებული გენეტიკური ინფორმაციის და ტრანსპორტული რნმ-ების მიერ „მიზიდულ“ ამინომექავებისაგან ანხორციელებს სპეციფიკური ცილის სინთეზს. ყველა უჯრედი შეიცავს ათასობით რიბოსომას და როცა ცილის სინთეზი ძლიერდება, რიბოსომების რაოდენობა საგრძნობლად მატულობს.

გენეტიკური კოდის გაშიფვრის საქმეში დიდი ღვაწლი მიუძღვით ამერიკელ მეცნიერებს მ. ნირენბერგსა და ჯ. მატეის, რომლებმაც პირველად აჩვენეს პოლიურიდილის მექავას (ე. ი. მხოლოდ ურიდილის მექავასაგან შემდგარი რნმ) მაგალითზე, რომ ის იძლევა ფენილალანინისაგან შემდგარ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვს. შემდგომში გამოკვლევებმა კი დაამტკიცეს, რომ ერთი ამინომექავას ინფორმაციის კოდირება ხდება სამი ნუკლეოტიდის თანმიმდევრობით, ამ სამი ნუკლეოტიდის კომბინაციას კოდონი ეწოდება. ინფორმაციულ რნმ-ში არსებული ოთხი ტიპის ნუკლეოტიდის (ურაცილის, ადენინის, ციტიდინისა და გუანინის) სხვადასხვა თანმიმდევრობით შეიძლება მიღებული იქნას 64 ტრიპლეტი. აქედან 61 ტრიპლეტში კოდირებულია ყველა ამინომექავას ინფორმაცია, ხოლო დარჩენილი სამი ტრიპლეტი (უაგ, უაა და უგა) უაზრო კოდონებია, ე. ი. ამ სამ კოდონს არც ერთი ამინომექავას ინფორმაცია არ გააჩნია. მხოლოდ მეთიონინისა და ტრიპტოფანის ინფორმაცია კოდირებულია თითო კოდონით, აუგ-თი მეთიონინი, ხოლო უგგ-თი ტრიპტოფანი. ყველა დანარჩენი ამინომექავების კოდირება ორი, სამი ან ოთხი კოდონით

წარმოებს, რადგან ამინომჟავათა რაოდენობა სულ ოცია, ხოლო აზ-რიანი კოდონების რიცხვი კი 61-ს უდრის.

მეცნიერების თანამედროვე მიღწევებიდან გამომდინარე ცილის სინთეზი რიბოსომაზე შემდეგნაირად უნდა წარმოვიდგინოთ: რიბოსომა აგებულია ინფორმაციულ რნმ-ზე, როგორც ნემსი კოჭის ძაფზე. და კითხულობს მას. მეორეს მხრივ რიბოსომაში შემოდის ტრანსპორტული რნმ თავისი ამინომჟავით და უკავშირდება ინფორმაციული რნმ-ის ტრიპლეტს ისეთნაირად, რომ არსებულ ამინომჟავურ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვსა და ტრანსპორტულ რნმ-ზე მიბმულ ამინომჟავას შორის წარმოიქმნება კოვალენტური ბმა. ამის შემდეგ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვში ჩართული ამინომჟავა შორდება რნმ-ს და ეს უკანასკნელი გამოდის რიბოსომიდან თავისუფალ მდგომარეობაში, რათა კვლავ შეასრულოს ანალოგიური აქტი (სურ. 35).



სურ. 35. ცილის ბიოსინთეზის ტრანსლაციის ეტაპი.

როდესაც ინფორმაციული რნმ მთლიანად „წაიკითხება“ რიბოსომის მიერ, ეს უკანასკნელი შორდება მას და ერთდროულად გამოიყოფა გარკვეული ცილის დასრულებული მოლეკულა. ამ პროცესს ტრანსლაცია ეწოდება.

ცილის სინთეზის ბიოლოგიური არსი იმაში მდგომარეობს, რომ ნუკლეინის მჟავების გენეტიკური ინფორმაცია (დნმ-ში, შემდეგ ინფორმაციულ რნმ-ში), რომელიც ოთხი ტიპის ნუკლეოტიდის თანმიმდევრობით არის კოდირებული, გადაყვანილი იქნას ცილების

20 ტიპის ამინომჟავისაგან ასევე გარკვეული თანმიმდევრობით შემდგარ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვში.

ფერმენტების ინფუსირებაული სინთეზი

ცილათა ანაკრები, რომელიც უჯრედში სინთეზირდება, მთლიანად დამოკიდებულია უჯრედის გენეტიკური აპარატისაგან. უჯრედში გენები საზღვრავენ გარკვეული ცილის სინთეზის პოტენციურ შესაძლებლობას, რომლის რეალიზაცია დამოკიდებულია უჯრედის სპეციალურ მაკონტროლებელ სისტემებზე. მიუხედავად იმისა, რომ ყველა ცოცხალ ორგანიზმში ცილების სინთეზი ერთი და იგივე მექანიზმებით ხორციელდება, ხელსაყრელ ობიექტად ამ საკითხის შესწავლისათვის მიკროორგანიზმები აღმოჩნდნენ. ეს იქედან გამომდინარეობს, რომ ისინი შედარებით სხვა ცოცხალ ორგანიზმებთან უფრო მარტივ ფორმებს წარმოადგენენ, სადაც ფერმენტების სიმრავლე ლიმიტირებულია, მაგრამ მეორე მხრივ მათ პოტენციურად შესწევთ თითქმის ყველა ცნობილი ფერმენტების სინთეზის უნარი. გარდა ამისა, ინტერესს იწვევს ის ფაქტი, რომ პრაქტიკაში გამოსაყენებელი ფერმენტების 90%-ზე მეტის პროდუცენტები სწორედ მიკროორგანიზმები არიან. ამასთან ერთად აღმოჩნდა, რომ მიკროორგანიზმებში სინთეზირებული ცილების სახესხვაობა დამოკიდებულია არა მარტო გენეტიკური აპარატის ჩვეულებრივ მოქმედებაზე, არამედ სხვა ფაქტორებზედაც, მაგალითად, საკვები არის შემადგენლობაზე, ორგანიზმის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე და სხვა.

თუ ობის სოკოს კულტურას, რომელიც სახამებლიან საკვებ არეზე იზრდებოდა და ამავე დროს α -ამილაზის სინთეზს აწარმოებდა, გადავითანთ საკვებ არეში, რომელიც სახამებლის ნაცვლად კაზეინს შეიცავს, დავინახავთ, რომ α -ამილაზის ნაცვლად კულტურა დაიწყებს პროტეაზის სინთეზს. არაორგანული პიროფოსფატი, დამატებული საკვებ არეში იწვევს ბაქტერიების ზოგიერთ სახეობებში ფოსფატაზის სინთეზის შეკავებას, ხოლო ტრიპტოფანი ტრიპტოფანაზის ბიოსინთეზს მთლიანად წყვეტს, ამგვარად საკვებ არეში ნახშირწყლის კომპონენტის შეცვლა, როგორც მოყვანილი მაგალითებიდან ჩანს, იწვევს ახალი სახის ცილების წარმოქმნას და ამავე დროს შეკავდება იმ ფერმენტის სინთეზი, რაზედაც დაჩვეული იყო მიკროორგანიზმი. ინდუქციისა და რეპრესიის მექანიზმები ძირითადად შესწავლილია ბაქტერიებზე, მაგრამ აქვე უნდა აღინიშ-

ნოს, რომ ცხოველურ და მცენარეულ ორგანიზმებში ეს მოვლენები მსგავს კანონზომიერებებს ექვემდებარებიან.

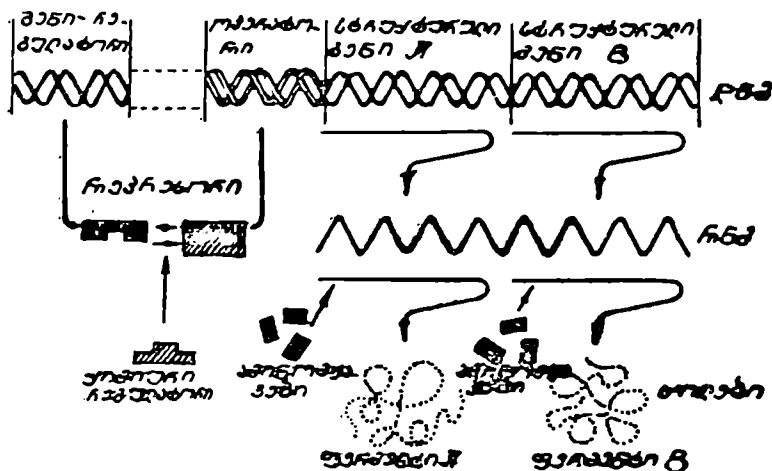
ფერმენტების ინდუქციისა და რეპრესიის მექანიზმების შესწავლაში დიდი ღვაწლი მიუძღვით ფრანგ მეცნიერებს ფრანსუა ჟაკობს და ჟაკ მონოს.

გ. კარსტრიომმა ჯერ კიდევ 30-იან წლებში გამოთქვა მოსაზრება იმის შესახებ, რომ უჯრედში არსებობს ორი ტიპის ფერმენტი. ფერმენტების ერთი სახე ყველა პირობებში წარმოიქმნება და მოქმედებს ორგანიზმში. ამ ფერმენტებს კონსტიტუციური ფერმენტები უწოდეს. მეორე ტიპის ფერმენტებს, რომელთა სინთეზი ახლად იწყება. ანდა მატულობს სპეციფიკური ნახშირბადოვანი ნაერთის — ინდუქტორის ზემოქმედების პასუხად უჯრედში, ინდუცირებული ფერმენტების სახელწოდებას ატარებს.

ფ. ჟაკობისა და ჟ. მონოს მონაცემებით ყოველი ნორმალური E. coli-ის უჯრედი, თუ ეს კულტურა ლაქტოზიან საკვებ არეზე იზარდება წარმოქმნის β -გალაქტოზიდაზის დაახლოებით 3000 მოლეკულას. მაგრამ, თუ საკვები არე შეიცავს არა β -გალაქტოზიდს, არამედ ნახშირბადის სხვა წყაროს ფერმენტის პროდუქცია 1000-ჯერ მცირდება. სუბსტრატებს, ან მათ ანალოგებს, რომელთა მოხვედრა უჯრედში იწვევს ახალი ტიპის ფერმენტების სინთეზს, ანდა სინთეზის საგრძნობ გაძლიერებას ინდუქტორები ეწოდებათ. თვით ფერმენტის სინთეზს *de novo*, ან მის გაძლიერებას ეწოდება ინდუქცია.

ზოგიერთი ნაერთი ფერმენტის სინთეზის ინჰიბირებას იწვევს. ასეთ ფერმენტებს რეპრესირებული ფერმენტები ეწოდებათ. ასე მაგალითად: პისტრდინის დამატება საკვებ არეში იწვევს რამდენიმე ფერმენტის სინთეზის შეკავებას, რომლებიც მონაწილეობას ღებულობენ პისტრდინის ბიოსინთეზის თანმიმდევრულ რეაქციებში. მეტაბოლიტებს, რომლებიც უჯრედში იწვევენ არსებული ფერმენტის სინთეზის დაქვეითებას, კორეპრესორები ეწოდებათ. ჩვეულებრივ, უჯრედში ინდუქციისა და რეპრესიის მოვლენები ხორციელდება საჭიროების მიხედვით. თუ უჯრედის მეტაბოლიზმისათვის აუცილებელია რომელიმე ფერმენტი ან ფერმენტების კომპლექსი უჯრედი აწარმოებს მათ სინთეზს და პირიქით. მთელი რიგი გამოკვლევებით ზუსტად იქნა დამტკიცებული, რომ ინდუქტორი იწვევს ფერმენტების სინთეზს *de novo* და გავლენას არ ახდენს უკვე არსებულ ფერმენტებზე. რეპრესორი აკავებს გარკვეული ერთი ფერმენტის ან ფერმენტების სინთეზს და არ იწვევს სინთეზირებული ფერმენტების აქტივობის დაქვეითებას. მაგალითისათვის შეიძლება

ჯანვხილოთ შემდეგი მოვლენა: ნაერთი, რომელიც იწვევს E. coli-ში β -გალაქტოზიდაზის სინთეზის რეპრესიას, აწარმოებს ორი ფერმენტის თვით β -გალაქტოზიდაზის და β -გალაქტოზიდპერმეაზის სინთეზის რეგულაციას. ეს უქანასკნელი არეგულირებს β -გალაქტოზიდაზების განვლადობის სიჩქარეს უჯრედში. მოყვანილი მაგალითი მიუთითებს იმაზე, რომ ამ ორი ფერმენტის სინთეზი ზუსტად რეგულირდება უჯრედის მიერ და ორივე ფერმენტის ბიოსინთეზის ინფორმაცია ლოკალიზებულია ერთ და იმავე მოლეკულა ინფორმაციულ რნმ-ში. ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობა დნმ-ში, სადაც კოდირებულია ერთი ინფორმაციული რნმ-ის სინთეზი და კონტროლირდება ერთი რეპრესორით, ოპერონი ეწოდება (სურ. 36).



სურ. 36. მეტაბოლიტით ფერმენტის ბიოსინთეზის რეგულირება შანვეს მიხედვით.

ოპერონი შედგება ერთი, ორი ან რამდენიმე გენისაგან. ოპერონის მოქმედებას კონტროლს უწევს დნმ-ის განსაკუთრებული უბანი — ოპერატორი. ყველა ოპერონს გააჩნია თავისი ოპერატორი, რომელიც ლოკალიზებულია იმ გენებთან, რომელთა ფუნქციასაც ის აკონტროლებს. ამ ჰიპოთეზის თანახმად, აქტიური რეპრესორის დაკავშირება ოპერატორთან ინფორმაციული რნმ-ის სინთეზს ბლოკირებას უკეთებს, რაც საბოლოო ჯამში გამოიხატება შესაბამისი ცილა-ფერმენტის ბიოსინთეზის შეკავებაში. უქანასკნელ ხანებში მიღებულია ბაქტერიების ისეთი მუტანტური ფორმები, სადაც ოპერატორი გადაყვანილია ფუნქციურად არააქტიურ მდგომარეობაში.

ამ შტამების რეპრესორებს აღარ გააჩნიათ საშუალება, რომ დაუკავშირდნენ ოპერატორს და შეაკავონ ი-რნმ-ის ბიოსინთეზი, რომელიც კულტურის მთელი ზრდის პერიოდში წარმოებს. შესაბამისად ფერმენტების სინთეზი აღწერილ მუტანტებში კონსტიტუციურად მიმდინარეობს. ამგვარ მუტანტებს კონსტიტუციური მუტანტებს უწოდებენ. სწორედ კონსტიტუციური მუტანტური შტამები წარმოადგენენ დიდ ინტერესს ფერმენტების საწარმოო დანიშნულებით მიღებისათვის.

ნორმალურ ბაქტერიულ შტამს უნარი შესწევს დააგროვოს რომელიმე ცილა-ფერმენტი ცილის საერთო რაოდენობის 0,01—3,0%-მდე. 3% ცალკეული ფერმენტის ის მაქსიმალური რაოდენობაა, რომელიც შეიძლება დააგროვოს უჯრედმა, თუ მისი ქრომოსომა შეიცავს ამ ცილისადმი სპეციფიკურ მბოლოდ ერთ გენს, ხოლო თუ ქრომოსომებში არსებობს გენის ორი ასლი ფერმენტის რაოდენობამ შეიძლება ცილის საერთო რაოდენობის 6%-ს მიაღწიოს. არსებობს ისეთი კონსტიტუციური მუტანტები რომლებიც ზოგიერთ ფერმენტს ცილის საერთო რაოდენობის 10—15%-მდე აგროვებენ. ამგვარ მუტანტებს “სუპერმუტანტებს” უწოდებენ. ცალკეული ფერმენტის ასეთი გაძლიერებული სინთეზი შესაძლებელია მხოლოდ იმ პირობებში, თუ მინიმუმამდე დაიყვანება უჯრედისათვის აუცილებელი ყველა სხვა ცილის სინთეზის დონე. თუ ეს პირობა არ სრულდება და მიღებულ მუტანტში უჯრედისათვის აუცილებელი ცილების სინთეზის ბალანსი დარღვეულია, ასეთი კულტურები, როგორც წესი ძალზე ცუდად იზრდებიან და მოითხოვენ ზრდის განსაკუთრებულ პირობებს — საკვებ არეში ვიტამინების, ამინომჟავების ან ნუკლეოტიდების დამატებას. ის ფაქტი, რომ ერთი გენის მოქმედების პირობებში ნორმალურ უჯრედში გარკვეული ფერმენტის რაოდენობა ცილის საერთო რაოდენობის 0,01—3,0%-მდე მერყეობს, აიხსნება გარკვეული ცილის მიმართ უჯრედის კონკრეტული მოთხოვნილებით. ასე მაგალითად *E. coli*-ის კულტურაში β -გალაქტოზიდაზა ყოველთვის გაცილებით მეტია შესაბამის პერმეაზებთან შედარებით და ეს მაშინ, როცა ორივე ფერმენტის ბიოსინთეზის ინფორმაცია ერთი მოლეკულა ი-რნმ-ით გადმოიცემა. ამ გარემოების ასახსნელად არსებობს ორი თეორია; პირველის თანახმად რიბოსომები მატრიცის საწყის წერტილებს არაერთნაირი სიჩქარით უერთდებიან. მეორის თანახმად კი ი-რნმ-ის „წაკითხვის“ სიჩქარე კოდონების რიცხვზე და შედგენილობაზეა დამოკიდებული. ასეა თუ ისე, ფაქტი ის არის, რომ თუ ერთი ინდუქტორი იწვევს ორი ან რამდენიმე ფერმენტის ბიოსინთეზის გაძლიერებას, რაც ერთი და იმა-

ვს სისტემით კონტროლდება, მათი რაოდენობა უჯრედში თითქმის ყოველთვის განსხვავებულია. ეს კი უჯრედის საერთო მეტაბოლური მოთხოვნებით აიხსნება.

როგორც უკანასკნელ ხანებში ჩატარებულმა გამოკვლევებმა გვიჩვენა, *E. coli*-ის ქრომოსომაში კოდირებულია 4000-მდე სხვადასხვა პოლიპეპტიდური ჯაჭვის სინთეზის შესაძლებლობა. თუ *E. coli*-ის კულტურა გლუკოზის შემცველ არეზე იზრდება, მის უჯრედში დაახლოებით 800-მდე სხვადასხვა ტიპის ფერმენტი წარმოიქმნება. ზოგიერთი ფერმენტი შედარებით მეტი რაოდენობით წარმოიქმნება უჯრედში, იმიტომ, რომ უჯრედის მოთხოვნა გარკვეული კატეგორიის ფერმენტების მიმართ გაცილებით უფრო დიდია. სწორედ ასეთებია ის ფერმენტები, რომელთა მეშვეობით გლუკოზა განიცდის დაშლას და დაშლის პროდუქტებიდან ფერმენტული რეაქციებით წარმოიქმნებიან ამინომჟავები და ნუკლეოტიდები. ასევე დიდი მოთხოვნა გააჩნია ყოველ უჯრედს იმ ფერმენტების მიმართ, რომლებიც მონაწილეობენ ენერგიით მდიდარ ატფ-ის და სხვა ტრიფოსფატების სინთეზში. მცირე რაოდენობით აგროვებს უჯრედი კოფერმენტების სინთეზში მონაწილე ფერმენტებს, ვინაიდან კოფერმენტების მიმართ მოთხოვნა გაცილებით უფრო ნაკლებია. შედარებით მაღალია ზოგიერთი სტრუქტურული ცილების სინთეზი უჯრედში, რადგან ისინი მონაწილეობას ღებულობენ უჯრედის გარსისა და რიბოსომების შენებაში.

განსაზღვრულ პირობებში ნორმალურ უჯრედს შესწევს უნარი ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობა შეაღებდეს დონეზე არეგულიროს. ამავე მექანიზმით წარმოებს სტრუქტურული ცილების სინთეზის რეგულაცია. ეს მოვლენა კარგად ჩანს რიბოსომების მაგალითზე, როდესაც ბაქტერიები მაქსიმალური სიჩქარით იზრდებიან და ცილების სინთეზის პროცესი ინტენსიურად მიმდინარეობს, რიბოსომები შეადგენენ მთელი უჯრედის ბიომასის დაახლოებით 25%-ს. იმ შემთხვევაში კი როდესაც ზრდა შენელებულია და ცილების სინთეზის პროცესი მინიმალური ინტენსივობით წარმოებს, რიბოსომების ხვედრითი წონა უჯრედის ბიომასაში დაახლოებით ხუთჯერ მცირდება. ბაქტერიულ უჯრედში სინთეზირებული ფერმენტის ან რომელიმე სტრუქტურული ცილის მოლეკულა მეტ-ნაკლებად მდგრადია. ეს იმას ნიშნავს, რომ ამგვარი ცილები არ განიცდიან სწრაფ დაშლას. ამიტომ ინდივიდუალური ცილის რაოდენობის დონე უჯრედში დამოკიდებულია არა მის მდგრადობაზე, არამედ მისი სინთეზის სიჩქარეზე. ცილის სინთეზის სიჩქარე კი უჯრედში პირდაპირპროპორციულია უჯრედში არსებულ

და ამ ცილისადმი სპეციფიკურ ინფორმაციულ რნმ-ის რაოდენობისა. ასე მაგალითად, *E. coli*-ის კულტურაში, სადაც აქტიურად მემდინარეობს β -გალაქტოზიდაზის სინთეზი, თითოეული უჯრედი შეიცავს 40-მდე β -გალაქტოზისადმი სპეციფიკურ ი-რნმ-ს, მაშინ, როდესაც თუ *E. coli*-ის საკვები არე არ შეიცავს ამ ფერმენტისადმი სპეციფიკურ ინდუქტორს, იშვიათად უჯრედს თუ გააჩნია β -გალაქტოზიდაზის სპეციფიკური მატრიცა. ყოველივე ზემოთ თქმული იმაზე მიუთითებს, რომ ფერმენტების ინდუქციისა და რეპრესიის სისტემები, რომელთა საშუალებითაც უჯრედი ახორციელებს ცილის სინთეზის რეგულაციას, წარმოადგენენ რთულ მექანიზმებს. ამავე დროს რეპრესია და ინდუქცია მჭიდროდ არის დაკავშირებული უჯრედის ენერგეტიკასთან და გენეტიკური აპარატის ნორმალური მუშაობისათვის საჭიროა ენერგიის გამუდმებითი უზრუნველყოფა მაკროერგული ნაერთებით.

ინდუქციის მოვლენას განსაკუთრებით დიდი მნიშვნელობა აქვს პრაქტიკაში, როდესაც ფერმენტების მიღება მიკროორგანიზმებიდან წარმოებს. ინდუცირებული ფერმენტებისა თეორიის საფუძვლების გამოყენება საშუალებას იძლევა გაცილებით დიდი რაოდენობით იქნას მიღებული სასურველი ფერმენტი, ან ფერმენტთა კომპლექსები.

არანაკლები მნიშვნელობა აქვს აქტიური მუტანტური შტამების მიღებას, რომლებსაც დარღვეული აქვთ ცალკეული ფერმენტების ბიოსინთეზის რეგულაციის უნარი და აგროვებენ ინდივიდუალური ფერმენტების ძალზე დიდ რაოდენობას. ასეთი შტამები საშუალებას იძლევიან საქარხნო მასშტაბებში ეფექტური მეთოდებით მიღებული იქნას ბაქტერიებიდან, საფუერებიდან, ობის სოკოებიდან და აქტინომიცეტებიდან ისეთი სამრეწველო დანიშნულების ფერმენტები, როგორიცაა: ამილაზები, ცელულაზები, პროტეაზები, ნუკლეაზები, პექტინაზები და სხვა.

ლიტერატურა

- Уотсон Дж., Молекулярная биология гена, М. «Мир», 1967.
Спирин А. С., Гаврилова Л. П., «Рибосома», М. «Наука», 1968.
Дэвидсон Дж., Биохимия нуклейновых кислот, М. «Мир», 1967.

ალმოსტარიული ფერმენტების მოქმედების რეგულაცია და კინეტიკა

ფერმენტებისა და ფერმენტული სისტემების დიდი რიცხვის მიუხედავად ცოცხალ ორგანიზმში მიმდინარე მრავალი რეაქცია ხორციელდება ძალზე მოწესრიგებულად და მკაცრად განსაზღვრული თანმიმდევრობით. ნივთიერებათა ცვლის სიჩქარე და მიმართულება კოორდინირებულია დროსა და სივრცეში, რაც უზრუნველყოფს ცოცხალი ორგანიზმის ფუნქციურ აქტივობას. კატალიზური ფუნქციის გარდა ფერმენტები აწარმოებენ მეტაბოლური პროცესების სპეციფიკურ რეგულირებას. ცოცხალი უჯრედი და მრავალუჯრედიანი ორგანიზმები მთლიანად წარმოადგენენ თვითრეგულირებად სისტემებს. მეტაბოლური პროცესების ხასიათი განსაზღვრავს ორგანიზმის სპეციფიკურობას, მის განვითარებასა და ღიფერენციაციას. ამ საქმეში წამყვანი როლი ენიჭებათ ფერმენტებს.

ფერმენტთა ბიოსინთეზისა და მათი აქტივობის რეგულაციის შესწავლა არის თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ამოცანა.

ფერმენტული პროცესები: რეგულაცია უაქსეზური პრინციპით

ცოცხალ უჯრედში ნებისმიერი მეტაბოლიტი სინთეზირდება მთელი რიგი თანმიმდევრული რეაქციების შემწეობით. ეს რეაქციები აქტივდება სპეციფიკური ფერმენტებით. ცალკეული მეტაბოლიტის სინთეზისათვის საჭიროა ფერმენტთა მთელი წყება. ნივთიერებათა ცვლის (მეტაბოლიზმის) რეგულაციის უჯრედშიდა მექანიზმების გაგებისათვის აუცილებელია უჯრედის ფერმენტული აპარატის ორგანიზაციის ზოგიერთი ძირითადი პრინციპის ცოდნა. ამ ორგანიზაციას გააჩნია ორი მხარე — სტრუქტურული და დინამი-

კური. პირველი ეხება ლოკალიზაციას და ფერმენტისა და სუბსტრატის ურთიერთ განლაგებას უჯრედში, რასაც ნივთიერებათა ცვლის რეგულაციაში დიდი მნიშვნელობა ენიჭება. დინამიკური ორგანიზაცია კი გამოხატავს ცვლის პროცესებში ფერმენტთა ფუნქციური ურთიერთ დამოკიდებულებას. ცვლის ორგანიზაციის ეს ორივე მხარე ერთმანეთთან მჭიდროდაა დაკავშირებული. ბიოქიმიური პროცესების უმრავლესობა შედგება სუბსტრატის თანდათანობითი გარდაქმნის მრავალსაფეხურიანი რეაქციებისაგან, რომლებიც სპეციფიკური ფერმენტებით აქტივდებიან. ასეთი ფერმენტული სისტემები შეიძლება განხილული იქნას როგორც მეტაბოლიზმის ფუნქციური ერთეულები. განსაზღვრული პროდუქტის ბიოსინთეზში მონაწილე ფერმენტული რეაქციების ერთიანობა ხშირად აღინიშნება როგორც ანაბოლიზმი.

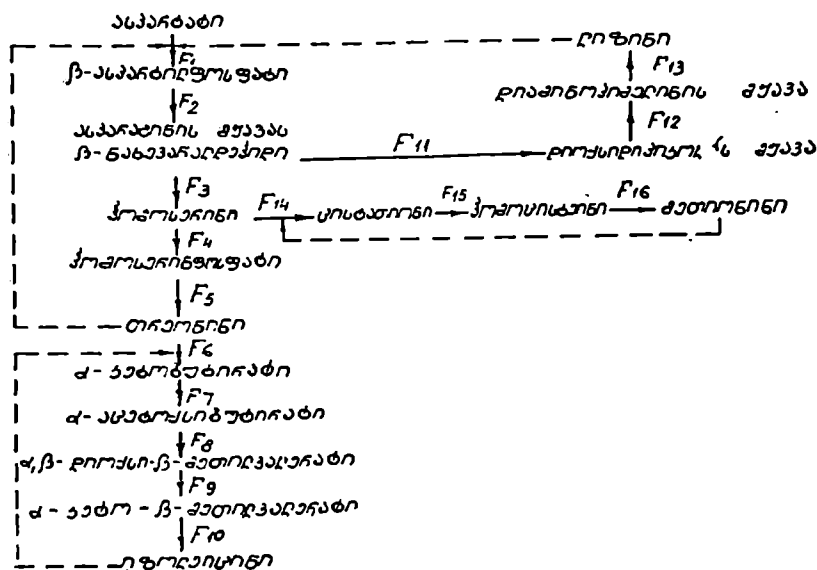
საქიროა განისაზღვროს ამა თუ იმ პროდუქტის ანაბოლიზმის „დასაწყისის“ დადგენის კრიტერიუმი, ანუ დაზუსტდეს გარდაქმნაში მონაწილე უწყვეტი ჯაჭვის ფერმენტებიდან, რომელი ჩაითვალოს პირველ ფერმენტად. მოცემულ ანაბოლურ სისტემას უნდა მივაკუთვნოთ მხოლოდ ის ფერმენტები, რომლებსაც მიყვევართ საბოლოო პროდუქტამდე.

ამგვარად, მოცემული სისტემის პირველ ფერმენტად ჩაითვლება ფერმენტი, რომელიც მოქმედებას იწყებს უშუალოდ სხვადასხვა მეტაბოლური გზების განშტოების წერტილის შემდეგ, ამასთანავე მხედველობაში უნდა მივიღოთ შესაბამისი მარეგულირებელი მექანიზმების მიმართულება და მოდების წერტილი. განვიხილოთ ეს დებულება შემდეგ კონკრეტულ მაგალითზე (იხ. სქემა).

მოყვანილი სქემიდან ჩანს, რომ თრეონინი შეიძლება განხილული იქნეს როგორც ასპარაგინის მჟავას გარდაქმნის „საბოლოო“ პროდუქტი, მაგრამ იგივე თრეონინი გამოდის შუალედი პროდუქტის როლში ასპარაგინის მჟავადან იზოლეიცინის ბიოსინთეზის გზაზე. რამდენადაც თრეონინი იწვევს β -ასპარტატ—კინაზის— F_1 (ფერმენტი, რომელიც ააქტივებს ასპარაგინის მჟავას გარდაქმნას β -ასპარტილფოსფატად). ხოლო იზოლეიცინი თრეონინდეჰიდრატაზის — F_2 (ფერმენტი, რომელიც აჩქარებს L -თრეონინის გარდაქმნას α -კეტოვარბომჟავად) რეტროინჰიბირებას და არ მოქმედებს β -ასპარტატკინაზაზე, თვლიან, რომ გზები ასპარაგინის მჟავადან თრეონინამდე და თრეონინიდან იზოლეიცინამდე მეტაბოლურად დამოუკიდებელნი არიან.

მაშასადამე, თრეონინი გვევლინება საბოლოო პროდუქტად, ხოლო β -ასპარტატკინაზა საწყის ფერმენტად რეაქციების პირ-

ველ ჯაქვში, ხოლო იზოლეციინი და თრეონინდეჰიდრატაზა შესაბამისად მეორე ჯაქვში.



სქემა. ლიზინის, თრეონინის, მეთიონინისა და იზოლეციინის ბიოსინთეზის გზები (→) და მათი მაინიმიზირებადი მოქმედების მიმართულებები (— — →) E. coli-ში.

ამა თუ იმ საბოლოო პროდუქტის სინთეზის რეგულაციის ჩვეულებრივ საშუალებას წარმოადგენს თვითრეგულაცია უარყოფითი უკუკავშირის ტიპის მიხედვით, რომელიც მდგომარეობს ბიოსინთეზის საბოლოო პროდუქტით იმ ფერმენტის სინთეზის შეკავებაში, რომელიც მონაწილეობს ამ საბოლოო პროდუქტის ბიოსინთეზში (რეპრესია), ან ამ ფერმენტის კატალიზური აქტივობის შეკავებაში (რეტროინჰიბირება ანუ ინჰიბირება საბოლოო პროდუქტით). ორივე შემთხვევაში საბოლოო პროდუქტი წარმოადგენს მარეგულირებადი სისტემის ქიმიურ „სიგნალს“.

თვითრეგულირებას რეპრესიისა და რეტროინჰიბირების მექანიზმებით აქვს უდიდესი ფიზიოლოგიური მნიშვნელობა. რეტროინჰიბირება წარმოგვიდგება უჯრედის მყისიერ პასუხად არის „საკვები“ პირობების ცვლილებაზე.

რეტროინჰიბირება ფართოდაა გავრცელებული უჯრედში და უზრუნველყოფს სწრაფ და მგრძნობიარე კონტროლს მეტაბოლი-

ტების სინთეზის სიჩქარეზე. ამ მექანიზმის შესწავლამ ბაქტერიებში დიდი როლი შეასრულა ისეთი სხვადასხვა მუტანტური შტამების გამოყვანაში, რომლებმაც დაკარგეს გარკვეული ფერმენტის ბიოსინთეზის უნარი და ამიტომ არ შეუძლიათ შესაბამისი პროდუქტის წარმოქმნა. ეს ბაქტერიები იზრდებიან მხოლოდ ამ პროდუქტის საკმარისი რაოდენობით შემცველ არეზე; ამასთანავე ხშირად შეიმჩნევა მიკრობის შიღვ არეში იმ პროდუქტების გამოყოფა და დაგროვება, რომლებიც წარმოადგენენ დაკარგული ფერმენტის სუბსტრატებს.

შეპყავებული მეტაბოლიტი, რეაქციის საბოლოო პროდუქტი, აღნიშნება როგორც რეტროინჰიბიტორი. განსხვავებით ფერმენტული რეაქციების ჩვეულებრივი ინჰიბიტორებისაგან. საბოლოო პროდუქტებით ინჰიბირების შემჩნევა უჩრდეს გარეთ (ექსტრაქტებში) საშუალებას გვაძლევს განვასხვავოთ რეტროინჰიბირება ფერმენტის სინთეზის რეპრესიისაგან: თუ ექსტრაქტი ავლენს ნაკლებ აქტივობას საბოლოო პროდუქტის თანამყოფობისას, ვიდრე მისი არყოფნის დროს, შეგვიძლია ვილაპარაკოთ ფერმენტის აქტივობის შეკავებაზე. საბოლოო პროდუქტით რეტროინჰიბირება მოქმედებს მყისიერად და საშუალებას აძლევს უჩრდეს სწრაფად და ეფექტურად შეეგუოს არეს. ასეთი მგრძნობიარე მექანიზმი განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია იმ შემთხვევაში, როდესაც უჩრდეს გადადის ერთი ფუნქციური მდგომარეობიდან მეორეში.

ალოსტერიული ფერმენტები

ფერმენტთა აქტიური ცენტრის მაღალი სუბსტრატული სპეციფიკურობის გათვალისწინებით ძნელი გასაგები იყო მათი აქტივობის შეკავება ნაერთებით, რომლებიც თავისი სტრუქტურით მკვეთრად განსხვავდებოდნენ შესაბამისი სუბსტრატებისაგან. ეს გარემოება და ის, რომ ფერმენტთა ურთიერთქმედებისას რეტროინჰიბიტორი არ განიცდიდა ქიმიურ ცვლილებას, გვაიძულებდა გვეფიქრა, რომ რეტროინჰიბირება არ არის დაკავშირებული რეაქციაში რეტროინჰიბიტორის მონაწილეობასთან და ფერმენტის აქტიური ცენტრისთვის კონკურენციასთან. აქედან გამომდინარე, გამოითქვა, აზრი, რომ ფერმენტთა ურთიერთმოქმედება სხვადასხვა ნაერთთან შეიძლება არ იყოს დაკავშირებული სტერიულ შესაბამისობასთან, როგორც ამას ადგილი აქვს კონკურენტული შეკავებისას. ამ არასტერიულ შეუსაბამისობას ეწოდა „ალოსტერიული“ შეკავება. რამდენადაც ზოგიერთი მეტაბოლიტი კონკურენტულად ხსნის რეტ-

როინპიბიტორის მოქმედებას, ტერმინი „რეტროინპიბირება“ ხდება უფრო ვიწრო გაგების, ვიდრე ტერმინი „ალოსტერიული ურთიერთმოქმედება“, ანუ როგორც იტყვიან „ალოსტერიული ეფექტი“. შეაბამისად, ასეთი ნივთიერებებისათვის მოწოდებული იქნა ტერმინი „ალოსტერიული ეფექტორები“ ან უბრალოდ „ეფექტორები“.

ალოსტერიული რეგულირებისა და ალოსტერიული ცილა-ფერმენტების საერთო თეორია დამუშავებული და ფორმულირებულია ფრანგი მეცნიერების ფ. ჟაკობის, ჟ. მონოს, ჟ. უაიმენისა და ჟ. შანჟეს მიერ. ალოსტერიული ფერმენტების ძირითად თვისებას წარმოადგენს მათ მოლეკულაში ისეთი აქცეპტორული უბნების არსებობა, რომლებიც სტერეოსპეციფიკურად არ გადაფარავენ ერთმანეთს. ასეთი უბანი უნდა იყოს ორი მაინც, რომელთაგან ერთი იერთებს სუბსტრატს, მეორე კი ეფექტორს. სპეციალური ალოსტერიული კონტაქტური უბნის არსებობა ნაჩვენებია პირდაპირი გზითაც. აღმოჩნდა, რომ ყველა ალოსტერიული ფერმენტი ლაბილურია, ამასთანავე მათ უპირველეს ყოვლისა უქრებათ ალოსტერიული ეფექტორის მიმართ მგრძნობიარობის უნარი („დესენსიბილიზაცია“), ხოლო ფერმენტის კატალიზური აქტივობა ამ დროს არ იცვლება (ან იცვლება უმნიშვნელოდ). ასეთ შემთხვევაში სუბსტრატი და ეფექტორი ერთიანდება საერთო ტერმინის ქვეშ — „ლიგანდა“. ამგვარად სუბსტრატსა და ეფექტორს შორის არ ხდება პირდაპირი ურთიერთმოქმედება. ასეთი ეფექტორის მიერთებას მივყევართ ცილა-ფერმენტის მოლეკულური სტრუქტურის შექცევად ცვლილებანდე, ანუ ალოსტერიულ ეფექტამდე, რასაც თან სდევს აქტიური ცენტრისა და აქტიური ცილის კატალიზური პარამეტრების ცვლილება. ამგვარად, ალოსტერიული ეფექტი გულისხმობს სუბსტრატის დაკავშირების სპეციფიკურ ცენტრებსა და ალოსტერიულ ეფექტორებს შორის ურთიერთქმედებას.

ფ. ჟაკობის, ჟ. მონოს, ჟ. უაიმენისა და ჟ. შანჟეს თეორია აჯამებს ალოსტერიულ ფერმენტებზე არსებულ თანამედროვე მონაცემებს. ალოსტერიული ცილები ჩვეულებრივად წარმოადგენენ ოლიგომერებს, სადაც სუბერთეულები (პროტომერები) დაკავშირებული არიან ერთმანეთთან არაკოვალენტური ბმებით. ალოსტერიული ცილების საერთო მოლეკულური თვისებაა მათი მაღალი კონფორმაციული ლაბილობა და მაღალი სპეციფიკურობა ზოგიერთი „სიგნალური“ ნივთიერებების მიმართ და სწორედ ამის წყალობით ალოსტერიული ცილები ამყარებენ ინფორმაციულ კავშირს ქიმიურად დაუკავშირებელ პროცესებს შორის და ახორციელებენ განსხვავებული ხასიათის ქიმიური ინფორმაციების შეკრებასა და ანალიზს.

ალოსტერიული ცილები კონფორმაციული გადასვლების წყალობით გარდაქმნიან ინფორმაციას შესაბამის რეგულატორულ ეფექტში. ამით შესაძლებელი ხდება უჯრედის გარემო არესთან მიზანდასახული შეგუება. სისტემები, სადაც მონაწილეობენ ალოსტერიული ცილები და სადაც ხდება ალოსტერიული გარდაქმნები, დგანან თვისობრივად უფრო მაღალ დონეზე, ვიდრე ჩვეულებრივ ქიმიურ ურთიერთქმედებაზე დაფუძნებული სისტემები.

ალოსტერიული ცილების შექმნა არის ხანგრძლივი მოლეკულური ევოლუციის შედეგი. ალოსტერიული ფერმენტების შესწავლა არის რეალური გზა, რომელსაც მივყავართ ცოცხალი უჯრედის, როგორც მთლიანი სისტემისა და მორფოგენეზის მოლეკულური საფუძვლების შემეცნებამდე.

კოოპერატიული კინეტიკა

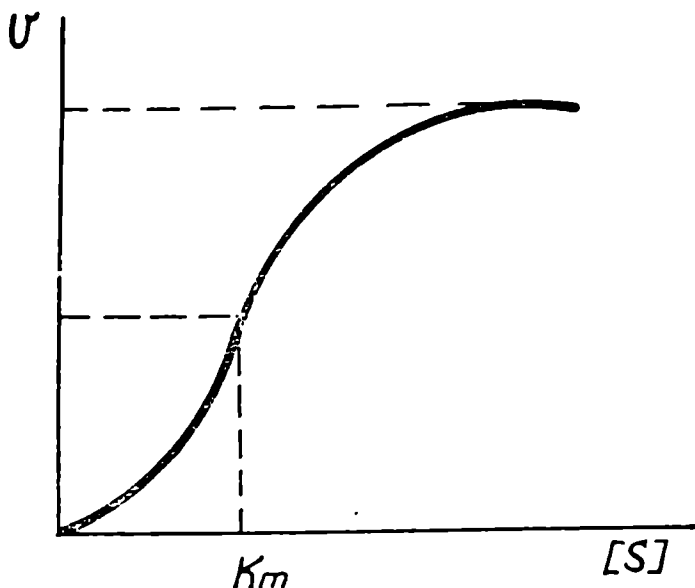
როგორც აღვნიშნეთ, ალოსტერიულ ფერმენტებს ახასიათებთ მეოთხეული სტრუქტურა და შესაბამისად მათ აქვთ რამდენიმე აქტიური ცენტრი, ამიტომ ამბობენ, რომ მათ ურთიერთმოქმედებას გააჩნია კოოპერატიული ხასიათი. კოოპერატიულობა თავის გამოხატულებას პოულობს ასეთი მრავალცენტრიანი ფერმენტების მიერ გააქტივებული რეაქციების კინეტიკაში.

მიხელოს-მენტენის განტოლებას ექვემდებარება სტაციონარული ფერმენტული რეაქციის მსვლელობა და ამ განტოლების მრუდი ისწრაფვის სუბსტრატით გაჯერებისაკენ გალუნვის გარეშე. ალოსტერიული ფერმენტების შემთხვევაში კი ექსპერიმენტულ მრუდს კოორდინატებში v — $[S]$ გააჩნია გალუნვის წერტილი, ანუ S -ის მაგვარი, ან როგორც კიდევ ამბობენ სიგმოიდური ფორმა (სურ. 37). პრინციპში მრუდის S -ის მაგვარობა შეიძლება განპარობებული იყოს მეორე რიგის რეაქციით.

S -ის მაგვარობის არსებობა კოორდინატებში v — $[S]$ მიუთითებს ურთიერთმოქმედი აქტიური ცენტრების ორი ან მეტი რიცხვის არსებობაზე (მეორე რიგის რეაქციების გამოკლებით), მაგრამ შეზღუდული მტკიცება არაა სამართლიანი — S -ის მაგვარობის არ არსებობა ჯერ კიდევ არ ნიშნავს ურთიერთმოქმედი ცენტრების არ არსებობას.

ამგვარად, ალოსტერიული ფერმენტების მონაწილეობით მიმდინარე ფერმენტული რეაქციების სტაციონარული კინეტიკის შესწავლა საშუალებას გვაძლევს მთელ რიგ შემთხვევებში დავადგინოთ კოოპერატიულობა მეოთხეული სტრუქტურის დონეზე.

განვიხილოთ ჰემოგლობინის-ცილის მოქმედების კინეტიკა, რომლის ფუნქციაც მდგომარეობს მოლეკულური ჟანგბადის გადატანაში და წარმოადგენს ალოსტერიული ფერმენტის შესანიშნავ მოდელს.



სურ. 37. ალოსტერიული ფერმენტების აქტივობის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციისაგან.

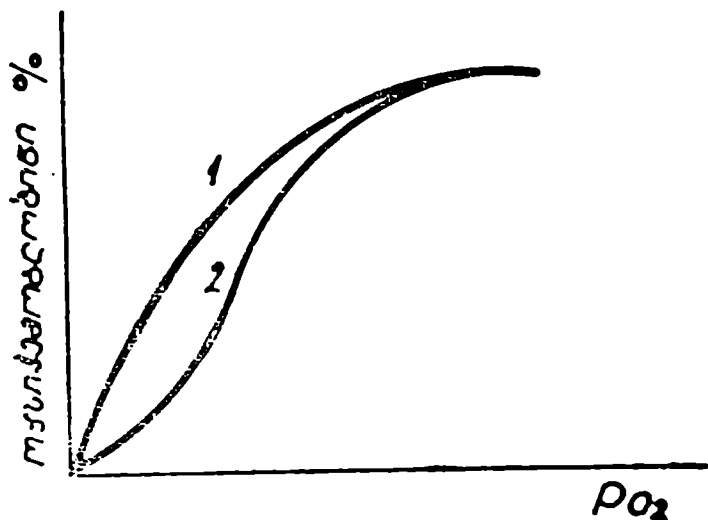
ჰემოგლობინი შედგება 4 სუბერთეულისაგან, რომლებიც ერთიმეორისაგან განსხვავდებიან — ეს არის α და β ტიპის სუბერთეულები. თითოეულ სუბერთეულს აქვს ფუნქციური ჯგუფი-ჰემი (პორფირინის ბირთვი შუაში რკინის ატომით). ჰემი ჰემოგლობინში იმავე როლს ასრულებს, როგორც პროსთეტული ჯგუფი ფერმენტებში. ჟანგბადი განიხილება როგორც სუბსტრატი, ხოლო სხვა ნივთიერებები, რომლებსაც ჰემი მიიერთებს, მაგალითად CO, როგორც კონკურენტული ინჰიბიტორები.

რამდენადაც ჰემოგლობინი კატალიზურად არააქტიურია, მისი თვისებები არ შეიძლება დახასიათდეს რომელიმე სხვა რეაქციის კინეტიკით, გარდა ჟანგბადის ან სხვა ნივთიერებების მიერთებისა. ჰემოგლობინის ოქსიგენიზაციის (ოქსიჰემოგლობინის წარმოქმნა) ხარისხის დამოკიდებულება ჟანგბადის პარციალურ წნევაზე (P) ხასიათდება S-ის მაგვარი მრუდით. (სურ. 38, მრუდი 2), რომლის მა-

თეზატურული დამოკიდებულება გამოისახება ა. ჰილის განტოლებით.

$$Y = \frac{kX^n}{1+kX^n}$$

სადაც Y — ჰემოგლობინის ჟანგბადით გაჯერების ხარისხია, X — ჟანგბადის პარციალურა წნევა, n — ჰემოგლობინის ერთ მოლეკულასთან დაკავშირებული ჟანგბადის მოლეკულების რიცხვია, k — კონსტანტა.



სურ. 38. ჰემოგლობინისა (2) და მიოგლობინის (1) ჟანგბადით გაჯერების ხარისხის დამოკიდებულება ჟანგბადის პარციალური წნევისაგან.

ა. ჰილის განტოლება, მიხაელის-მენტენის განტოლების მსგავსად, გამომდინარეობს წონასწორობის მდგომარეობიდან. როდესაც $n=1$ ა. ჰილის განტოლება, მიხაელის-მენტენის განტოლების მსგავსად, გამოისახება ჰიპერბოლური მრუდით.

ჰემოგლობინისაგან განსხვავებით, კუნთოვანი ქსოვილის მიოგლობინთან ჟანგბადის მიერთება გამოისახება უკვე არა S-ის მაგვარი. არამედ ჩვეულებრივი ჰიპერბოლური მრუდით (სურ. 38, მრუდი 1). ჰემოგლობინისა და მიოგლობინის ჟანგბადით გაჯერების მრუდების შედარება გვიჩვენებს, რომ ჟანგბადის უფრო მაღალი

პარციალური წნევისას ჰემოგლობინის მიერ O_2 დაკავშირებული რაოდენობა იზრდება უფრო სწრაფად, ვიდრე მიოგლობინის. იქმნება შთაბეჭდილება, რომ ჰემოგლობინთან დაკავშირებული ჟანგბადის პირველი მოლეკულები ადვილდებიან ჟანგბადის ახალი მოლეკულების დაკავშირებას, ანუ ადგილი აქვს ჟანგბადის მოლეკულების კოოპერატიულ ურთიერთქმედებას მათი ჰემოგლობინთან დაკავშირების პროცესში.

მართლაც, ჟანგბადის მიერთების შედეგად იზრდება ჰემის სწრაფვა ჟანგბადისადმი, რაც თავის მხრივ აიხსნება ჰემოგლობინის მოლეკულის კონფორმაციის შეცვლით — მცირდება β - α ჯაჭვში რკინის ატომებს შორის მანძილი $6,5 \text{ \AA}$, ხოლო α - β ჯაჭვში ის იზრდება $1 \text{ \AA}$, ამგვარად, მოცემულ შემთხვევაში თვით ჟანგბადი გამოდის ჰემოგლობინთან მისი დაკავშირების მარეგულირებელი ფაქტორის როლში.

ჰემოგლობინის კოოპერატიული თვისებების გაგებისათვის აუცილებელია მისი ლაპირისპირება მიოგლობინთან. როგორც ცნობილია, მიოგლობინი შეიცავს ჰემის მხოლოდ ერთ ჯგუფს და შედგება მხოლოდ ერთი სუბერთეულისაგან. მიოგლობინს არ გააჩნია მეოთხეული სტრუქტურა. ამგვარად, გამოდის, რომ ჰემოგლობინის კოოპერატიული თვისებები განისაზღვრება მისი მეოთხეული სტრუქტურით. მართლაც, მარილების კონცენტრირებულ ხსნარებში ჰემოგლობინი განიცდის დისოციაციას სუბერთეულებად, რასაც თან ახლავს მრუდის S-ის მაგვარობის გაქრობა. ამგვარად, ჰემოგლობინის შესწავლას მნიშვნელობა ენიჭება, რადგან ის ემსგავსება ალოსტერიულ ფერმენტებს და წარმოადგენს კოოპერატიული ურთიერთქმედების კარგ მოდელს. მსგავსი კოოპერატიული ურთიერთქმედება კარგად ხსნის ალოსტერიული ან, როგორც მათ ხშირად უწოდებენ, რეგულატორული ფერმენტების მრუდების S-ის მაგვარობის ხასიათს.

პირველ ფერმენტებს, რომელთა შესწავლის საფუძველზე შემუშავებული იყო ალოსტერიული ფერმენტების თეორია, წარმოადგენენ L-თრეონინდეჰიდრატაზა და ასპარტატტრანსკარბამილაზა.

ამჟამად მიღებულია დამაჯერებელი მონაცემები, რომ ალოსტერიული ფერმენტები შედგებიან სუბერთეულებისაგან, მათ გააჩნიათ მეოთხეული სტრუქტურა. მაგალითად, ასპარტატტრანსკარბამილაზა შედგება ორი სახის სუბერთეულისაგან, რომელთაგან ერთი არის აქტიური ცენტრის მატარებელი, ხოლო მეორე-ალოსტერიული. ამგვარად, ალოსტერიული ფერმენტისათვის დამახასიათე-

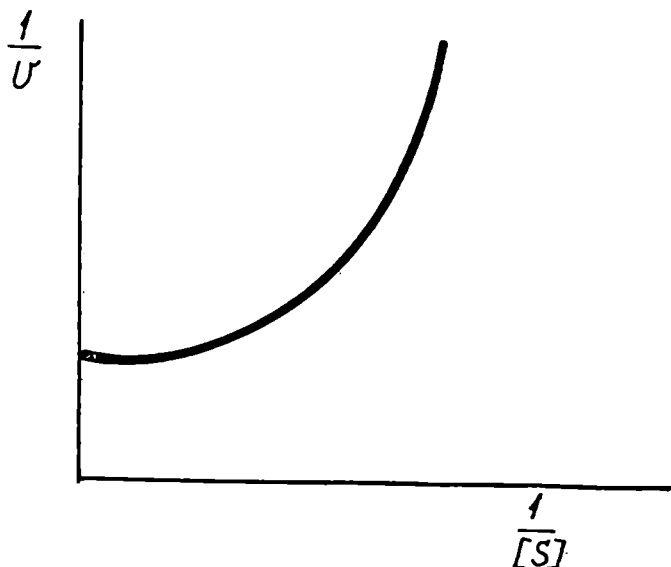
ბელი კოოპერატიული ეფექტი განპირობებულია მის მოლეკულა-ში მეოთხეული სტრუქტურის არსებობით.

კოოპერატიულობის დადგენა

საჭიროა შევჩერდეთ იმ მეთოდებსა და მიდგომებზე, რომლებიც სარგებლობენ ამჟამად ალოსტერიული ფერმენტების მრუდების ხასიათის—კოოპერატიულობის ხარისხის დასადგენად.

ეს აუცილებელია, რადგან ძალიან ხშირად ალოსტერიული ფერმენტების ექსპერიმენტულ მრუდებს არ გააჩნიათ მკვეთრად გამოხატული S-ის მაგვარობა.

როგორც უკვე აღნიშნული იყო, ჰიპერბოლური მრუდი სწორდება კოორდინატებში $\frac{1}{v} - \frac{1}{[S]}$ ხოლო S-ის მაგვარი მრუდები არ სწორდებიან აღნიშნულ კოორდინატებში და აქვთ სურ. 39 წარ-



სურ. 39. S-ის მაგვარი მრუდის სახე ლაინფიფერისა და ბერკის კოორდინატებში.

მოდგენილი მრუდის სახე. როგორც ამ სურათიდან ჩანს, მრუდი არ კვეთს აბსცისის ღერძს. უნდა აღინიშნოს, რომ ამის გამო ალოსტერიული ფერმენტებისათვის K_m -ის განსაზღვრა ორმაგი შებ-

რუნებული სიდიდეების მეთოდით არ ხერხდება. ასეთ შემთხვევებში K_m ისაზღვრება კოორდინატებში $v-[S]$ აგებული გრაფიკის მეშვეობით.

S -ის მაგვარობის, ანუ კოოპერატიულობის ხარისხის დასადგენად იყენებენ ჰილის გრაფიკულ მეთოდს შემდეგი ფორმულის საფუძველზე:

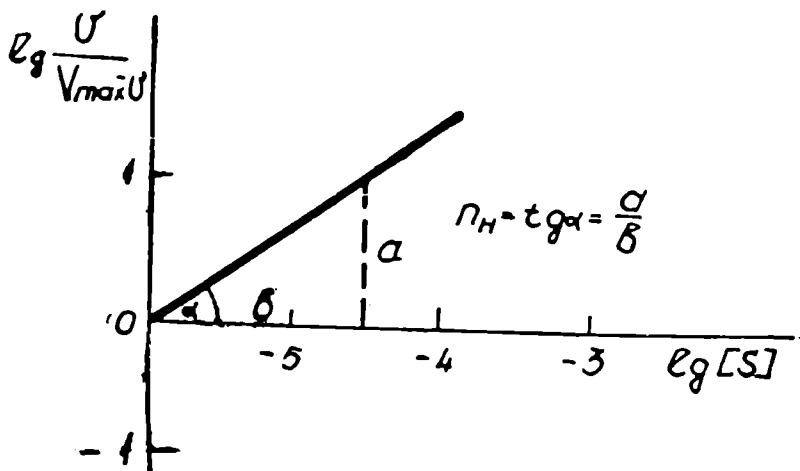
$$\lg \frac{v}{V_{\max} - v} = n_H \lg S - \lg K_m$$

სადაც n_H —კოოპერატიულობის კოეფიციენტი, მას ეწოდება აგრეთვე ჰილის კოეფიციენტი. ჩვეულებრივად n_H ახასიათებს სუბსტრატის დამაკავშირებელი ცენტრების ურთიერთქმედების ხარისხს და მის გაზრდასთან ერთად n_H -ის მნიშვნელობა უახლოვდება სიდიდეს, რომელიც შეესაბამება ფერმენტის მოლეკულაში დამაკავშირებელი ცენტრების რიცხვს (ამიტომაც ეწოდება კოოპერატიულობის კოეფიციენტად).

ჰილის გრაფიკული მეთოდით n_H -ის განსაზღვრისათვის მიმართავენ სისტემას კოორდინატებში

$$\lg \frac{v}{V_{\max} - v} - \lg [S].$$

ჰიპობოლური მრუდები ამ კოორდინატებში იძლევიან სწორხაზს, რომლის დახრის კუთხე უდრის 45° ანუ $n_H = 1$, ვინაიდან $n_H = \operatorname{tg} 45^\circ = 1$ (სურ. 40).

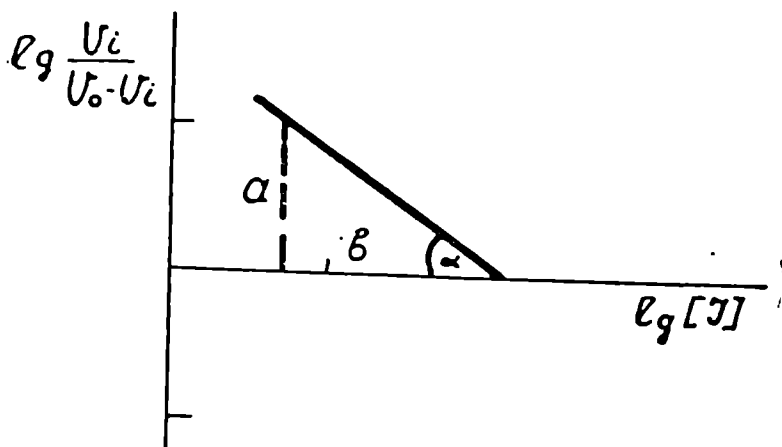


სურ. 40. კოოპერატიულობის კოეფიციენტის (n_H) განსაზღვრა ჰილის გრაფიკული მეთოდით.

კოოპერატიული კინეტიკის შემთხვევაში (ანუ S-ის მაგვარ მრუდებზე) ჰილის კოორდინატებში მიიღება სწორი ხაზი, რომლის დახრის კუთხე 45° -ზე მეტია და შესაბამისად $n_H > 1$. სიდიდე n_H შეიძლება აგრეთვე გამოითვალოს $\frac{a}{b}$ შეფარდების მეშვეობით. ინჰიბირების კინეტიკის შემთხვევაში ჰილის ფორმულას აქვს შემდეგი სახე:

$$\lg \frac{v_i}{v_0 - v_i} = -n_H \lg [J] - \lg [J]_{50}$$

სადაც v_0 — არის რეაქციის სიჩქარე, როცა ინჰიბიტორის კონცენტრაცია უდრის ნულს. ამ შემთხვევაში ვლელულობთ სწორ ხაზს, როგორც წარმოდგენილია სურ. 41. n_H -ის მნიშვნელობა იხაზღვრება ანალოგიურად.



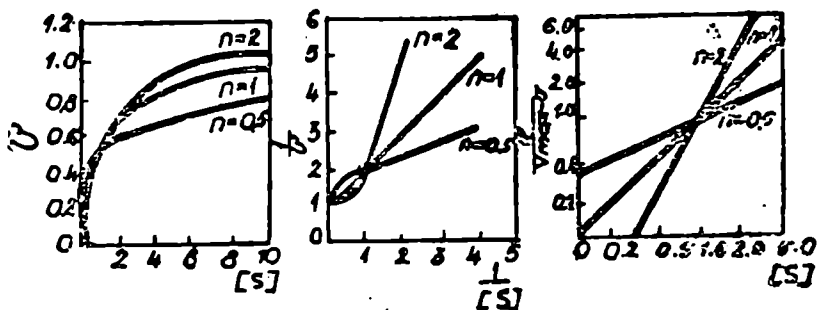
სურ. 41. კოოპერატიულობის კოეფიციენტის (n_H) განსაზღვრა ჰილის გრაფიკული მეთოდით ინჰიბირების შემთხვევაში.

კოოპერატიულობის კოეფიციენტი n_H შეიძლება იყოს ერთზე ნაკლებიც. ასეთ შემთხვევაში მრუდს, კოორდინატებში $\frac{1}{v} - \frac{1}{[S]}$

(სურ. 42) გააჩნია ზემოთ მიმართული მოხრილობა, ხოლო ჰილის გრაფიკზე იძლევა წრფეს, რომლის დახრილობა ნაკლებია 45° -ზე. სურ. 42-ზე წარმოდგენილია თეორიული მრუდები, როდესაც n_H

ტოლია 0,5; 1 და 2 (იმ დაშვებით, რომ $V_{\max} = 1$ და $K_m = 1$ ფორმულაში $v = \frac{V_{\max} [S]^n}{K_m + [S]^n}$).

ამგვარად, როდესაც $n=1$ კოოპერატიულობა არ არის, როდესაც $n > 1$ გვაქვს დადებითი, ხოლო როდესაც $n < 1$ უარყოფითი



სურ. 42. თეორიული მრედეები შემთხვევებისათვის როდესაც $n=0,5,1$ და 2.

კოოპერატიულობა. და ბოლოს, გვინდა კიდევ ერთხელ ჩამოვავალო-ბოთ ზოგიერთი ის დებულება. რომელიც აუცალებლად უნდა იქნას გათვალისწინებული ფერმენტების მოქმედების კინეტიკის შესწავ-ლის დროს.

1. ფერმენტების მოქმედების კეშმარტი კინეტიკური პარა-მეტრების მისაღებად აუცილებელია გამოკვლევები ჩატარდეს გა-წმენდილ, პომოგენურ ფერმენტულ პრეპარატებზე, ე. ი. ზგწმენით, რომ საკვლევი ფერმენტული პრეპარატი არ არის პეტეროგენული. უფრო მეტიც, ის არ უნდა შედგებოდეს იზოფერმენტებისაგან ან იზოფორმებისაგან (კონფორმერებისაგან). საქმე იმაშია. რომ კინე-ტიკურ მაჩვენებლებში განსხვავებამ შეიძლება გამოიწვიოს კინე-ტიკური უცნაურობანი, რაც თავის მხრივ, მიგვიყვანს მცდარ დასკვ-ნამდე.

2. მეორე მხრივ, გაწმენდილ პრეპარატებზე მუშაობას თან სდევს გარკვეული ხიფათი. როგორც აღნიშნული იყო, ალოსტერი-ული (რეგულატორული) ფერმენტები ძალიან ლაბილური არიან იმ გაგებით, რომ მათ ადვილად შეუძლიათ დაკარგონ ალოსტერიუ-ლი ეფექტორების მიმართ მგრძნობიარობა, ანუ ისინი კარგავენ ალოსტერიულ ცენტრს, რის შედეგადაც ქრება S-მაგვარობა (კო-ოპერატიულობა). ასეთი ფერმენტების გამოყოფისა და გაწმენდის

დროს ფერმენტები ხშირად კარგავენ S-ის მაგვარობის ანუ სიგმოიდური კინეტიკის გამომჟღავნების უნარს. ამით უნდა აიხსნას ის გარემოება, რომ ხშირად ღებულობდნენ ჰიპერბოლურ და მოკიდებულებას და არა სიგმოიდურს.

ამგვარად, ალოსტერიული ფერმენტების კინეტიკა *in vivo* უნდა იყოს სიგმოიდური და ყოველგვარი გადახრები უნდა განიხილებოდეს როგორც გამოყოფასა და გაწმენდასთან დაკავშირებული არტეფაქტები. ამიტომ უმჯობესია კინეტიკა შესწავლილი იყოს დიალიზირებულ ექსტრაქტებში და ჰომოგენატებში და მხოლოდ შემდეგ მოხდეს გაწმენდა. კინეტიკა უნდა ისაზღვრებოდეს გაწმენდის ყოველი სტადიის შემდეგ და ამით ხდებოდეს ფერმენტის თავდაპირველი, ნატიური თვისებების შემოწმება. იმ შემთხვევაში, თუ ფერმენტი გაწმენდის რომელიმე სტადიაზე დაკარგავს S-ის მაგვარობას, საჭიროა ამ სტადიის შეცვლა სხვა სტადიით და ა. შ.

ამგვარად, საბოლოოდ მიიღება ნატიური თვისებების მქონე გაწმენდილი ფერმენტი. რა თქმა უნდა, არაა გამორიცხული, რომ გაწმენდისას ფერმენტმა გარკვეულად განიცადოს ცვლილებები. ეს გამოიხატება კინეტიკური პარამეტრების ცვლილებაში, მაგრამ ამავე დროს მისი ძირითადი თვისებები უცვლელი უნდა დარჩეს.

3. უცნობი ფერმენტის, ან საერთოდ, ფერმენტის უცნობი ობიექტიდან, კინეტიკის კვლევის დაწყებამდე, პირველ რიგში, უნდა დადგინდეს ფერმენტის მოქმედების pH—ობტიმუმი, უნდა შესწავლოს სარეაქციო არის იონური ძალისა და ბუფერის იონური შემადგენლობის გავლენა. საქმე იმაშია, რომ ზემოთ ჩამოთვლილ აგენტებს შეუძლიათ გამოვიდნენ ალოსტერიული ეფექტორების როლში.

4. დიდი ყურადღება უნდა მიექცეს ტემპერატურულ ფაქტორს. ცნობილია შემთხვევები, როდესაც ფერმენტის კონფორმაციული მდგომარეობა მკიდრო კავშირში იმყოფება ტემპერატურასთან. არსებობს ფერმენტები, რომლებიც დაბალ ტემპერატურაზე განიცდიან დისოციაციას.

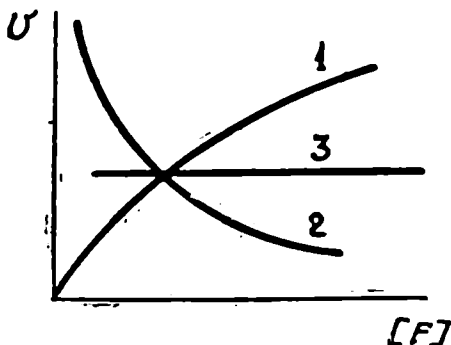
5. ყურადღება უნდა მიექცეს ფერმენტული რეაქციის მიმდინარეობის ხანგრძლივობასაც. სხვა სიტყვებით, ყოველი ფერმენტის, და იზოფერმენტისათვისაც კი, უნდა დადგინდეს რეაქციის მიმდინარეობის ისეთი ხანგრძლივობა, რომლის დროსაც უზრუნველყოფილი იქნება პირდაპირპროპორციული დამოკიდებულება რეაქციის სიჩქარესა და დროს შორის. ზოგიერთი ფერმენტისათვის რეაქციის ხანგრძლივობა ისაზღვრება წამებით, ზოგიერთისათვის კი წუთებითა და საათებით.

6. ბოლო ხანებში ცნობილი გახდა, რომ ალოსტერიული ფერმენტების კოოპერატიული ეფექტები შეიძლება მჭიდრო კავშირში იმყოფებოდნენ სუბსტრატების, კოფერმენტებისა და კოფაქტორების კონცენტრაციებთან, ამიტომ ამ ფაქტორსაც უნდა მიეჭეს დიდი ყურადღება.

7. ბუნებრივია, რომ ფერმენტების კინეტიკური თვისებებთან შესწავლისას, რაოდენობრივი განსხვავებების დადგენის მიზნით ან იზოფერმენტების კვლევისას, მკაცრად უნდა იქნას დაცული ცდის პირობები, ე. ი. რეაქციები უნდა ტარდებოდეს აბსოლუტურად იდენტურ პირობებში.

8. და ბოლოს, ძირითადი ფაქტორის შესახებ, რომელსაც უნდა მიეჭეს დიდი ყურადღება და პრინციპში, საიდანაც უნდა დაიწყოს ალოსტერიულ ურთიერთმოქმედებათა კვლევა. ეს არის ფერმენტის მოქმედების შესწავლა მისი სხვადასხვა კონცენტრაციების პირობებში.

ის გარემოება, რომ ალოსტერიული ფერმენტების მოლეკულები შედგებიან ცალკეული სუბერთეულებისაგან, განაპირობებს კიდევ, გარკვეულ პირობებში, მათი დისოციაციის შესაძლებლობას. ფერმენტის მოლეკულის დისოციაციის ხარისხი შეიძლება შეიცვალოს ფერმენტის კონცენტრაციის უბრალო ვარირების დროსაც კი.



სურ. 43. ფერმენტის ხვედრითი აქტივობის ფერმენტის კონცენტრაციაზე დამოკიდებულების გამომსახველი მრუდები.

43-ე სურათზე გამოსახულია რეაქციის სიჩქარის (ფერმენტის ხვედრითი აქტივობის) ფერმენტის კონცენტრაციებზე დამოკიდებულების თეორიულად შესაძლებელი სამი შემთხვევა:

1. ფერმენტის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად იზრდება რეაქციის სიჩქარე.

2. ფერმენტის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად მცირდება რეაქციის სიჩქარე.

3. იზრდება ფერმენტის კონცენტრაცია, მაგრამ არ იცვლება რეაქციის სიჩქარე.

პირველ შემთხვევაში, როგორც ჩანს, აქტიურია ფერმენტის ოლიგომერული ფორმა, მეორეში — დისოცირებული, მესამეში კი ან დისოცირებული და ოლიგომერული ფორმები ხასიათდებიან ერთნაირი აქტივობებით, ან ფერმენტი არ განიცდის დისოციაციას.

ცხადად ჩანს, თუ რა დიდი მნიშვნელობა აქვს ფერმენტის კონცენტრაციას ფერმენტების კინეტიკაში.

კოოპერატიულობის კოეფიციენტის — n_{H} -ის გრაფიკული განსაზღვრის მაგალითი

მალატდეჰიდროგენაზის (ფკ. 1. 1. 1. 37) მოქმედება pH-ის არაპრაქტიკულ პირობებში ხასიათდება კოოპერატიული კინეტიკით. ქვემოთ მოყვანილი მონაცემების საფუძველზე განესაზღვროთ კოოპერატიულობის კოეფიციენტი, n_{H} .

სუბსტრატის, მელაუნილმარმეაზას

კონცენტრაცია, M	2,4 · 10 ⁻⁶ ,	3,2 · 10 ⁻⁶ ,	6,4 · 10 ⁻⁶ ,
	9,6 · 10 ⁻⁶ ,	19,0 · 10 ⁻⁶ ,	38,0 · 10 ⁻⁶ ,
	960,0 · 10 ⁻⁶		

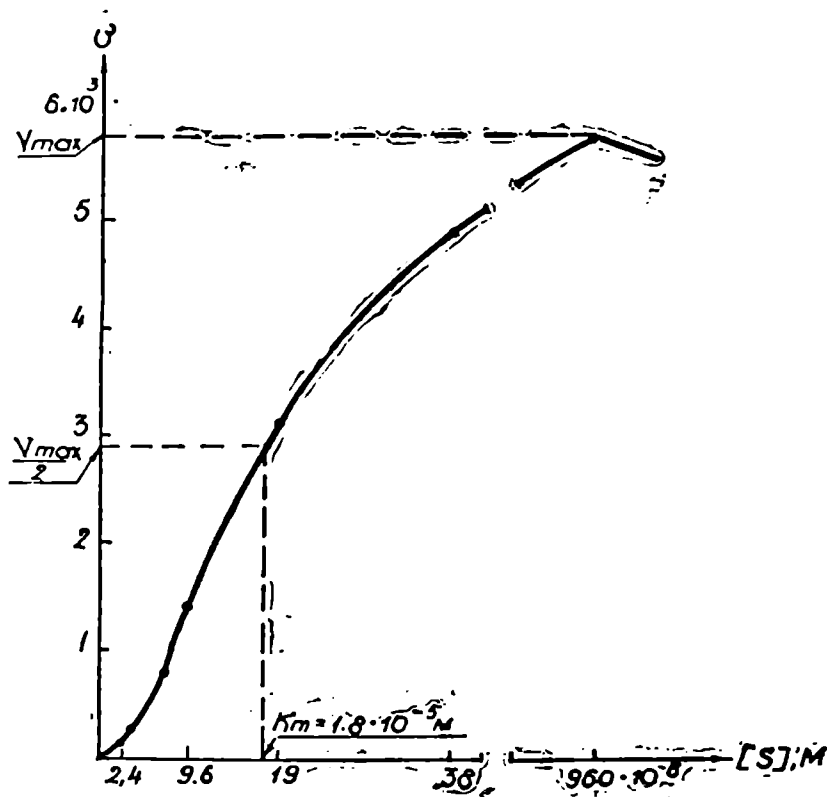
რეაქციის სიჩქარე, v (ΔE · 1000/წთ)	152 255 802 1386 3138 4890 4839 5839
---------------------------------------	---

პირველ რიგში ავაგოთ გრაფიკი, რომელიც გამოსახავს დამოკიდებულებას რეაქციის სიჩქარესა და სუბსტრატის კონცენტრაციას შორის (სურ. 44).

როგორც სურათიდან ჩანს, მრუდის ფორმის მიხედვით ძნელია კინეტიკის ხასიათის დადგენა. იმისათვის, რომ გავიგოთ მიღებული მრუდი ემორჩილება მიხაელის-მენტენის თუ ჰილის განტოლებას, საჭიროა კოოპერატიულობის კოეფიციენტის — n_{H} -ის მნიშვნელობის განსაზღვრა.

კოოპერატიულობის კოეფიციენტის განსაზღვრა წარმოებს ჰილის კოორდინატებში $\lg \frac{v}{v_{\text{max}} - v} - \lg [S]$, რისთვისაც საჭიროა საწყ-

ყისი ექსპერიმენტული მონაცემების გამოსახვა შესაბამის სიდიდე-ებში:



სურ. 44. ექსპერიმენტული მონაცემები გამოსახული კოორდინატებში
 $v-[S]$

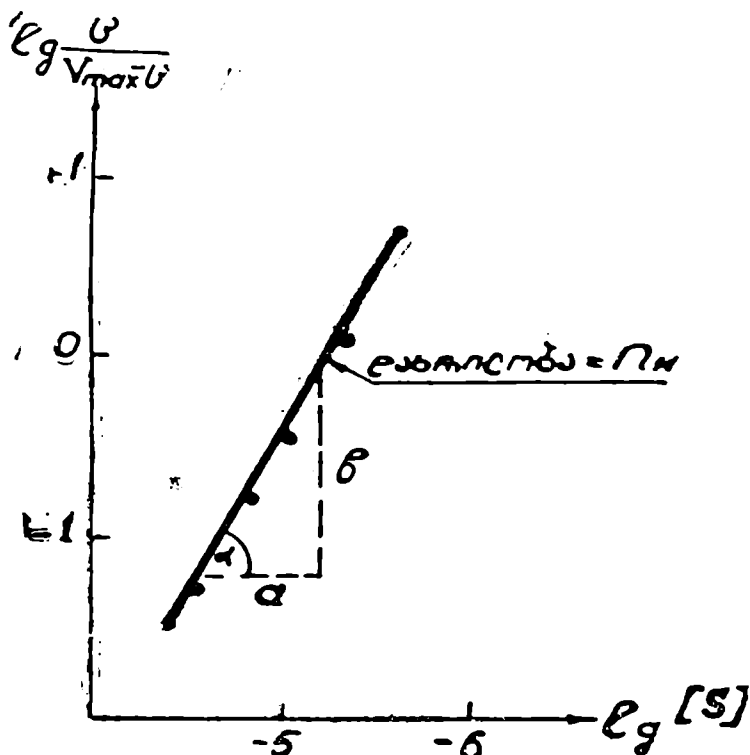
$$\lg \frac{v}{V_{\max} - v} \quad -1,45, \quad -1,34, \quad -0,79, \quad -0,50, \quad 0,06, \quad 0,71$$

$$\lg [S] \quad -5,62, \quad -5,49, \quad -5,19, \quad -5,02, \quad -4,72, \quad -4,42$$

როგორც მიღებული გრაფიკიდან (სურ. 45) ჩანს, წრფის დახ-
 რილობა — კოპერატიულობის კოეფიციენტი

$$n_{\infty} = \lg \alpha = \frac{b}{a} = \frac{1,2}{0,6} = 2$$

ამგვარად, მალატლექიდროგენაზის მოქმედება pH-ის არაოპტი-
მალურ მნიშვნელობებზე ხასიათდება კოოპერატიული კინეტიკით,
კოოპერატიულობის კოეფიციენტით: $n_H = 2,0$.



სურ. 45 ექსპერიმენტული მონაცემები გამოსახული ჰილის კოორდინატებში.

ლიტერატურა

1. Аллостерическая регуляция действия ферментов. Под ред. В. Л. Кретьевича, М., ВИНТИ, 1971.
2. Бернхард С. Структура и функция ферментов, «Мир», М., 1971.
3. Волькенштейн М. В. Физика ферментов, «Наука», М., 1967.
4. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии, пер. с англ., «Мир», М., 1972.
5. Жакоб Ф., Моно Ж. Биохимические и генетические механизмы регуляции в бактериальной клетке. В кн. «Молекулярная биология. Проблемы и перспективы». «Наука», М., 1964.
6. Кретьевич В. Л. Введение в энзимологию. «Наука», М., 1974.

7. Кошленд Д. Е. Молекулярные основы энзиматического катализа и регуляции ферментов. Журнал Всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева, 16, 2, 158, 1971.
 8. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке, «Наука», М., 1969.
 9. Уэстли Дж. Ферментативный катализ, «Мир», М., 1972.
 11. Ферментативная регуляция клеточного метаболизма по принципу обратной связи. Аллостерическая регуляция, София, 1968.
 12. Шанже Ж. П. Регуляция биохимических реакции. В сб. «Молекулы и клетки», «Мир», М., 1966.
-

თავი VIII

ფერმენტების ლოკალიზაცია

ამა თუ იმ ფერმენტის აღნაგობის, ფიზიკური და ქიმიური თვისებების, მოქმედების მექანიზმის, კინეტიკისა და სხვათა შესწავლისათვის საჭიროა ამ ფერმენტის ბიოლოგიური ობიექტიდან გამოყოფა და მისი მიღება პომოგენურ მდგომარეობაში.

პირველ რიგში სასურველია შერჩეულ იქნეს ისეთი ობიექტი, რომელიც მდიდარი იქნება საკვლევი ფერმენტით. თუმცა ხშირ შემთხვევაში ეს არაა აუცილებელი — მთავარია, თუ რა ამოცანას ისახავს მკვლევარი. ხშირად ფერმენტებს გამოყოფენ თვითობიექტის ენზიმოლოგიური დახასიათების მიზნით, სისტემატიკის ან ევოლუციის თვალსაზრისით.

არც ერთი უჯრედი არ შეიცავს ყველა ცნობილ ფერმენტს, მაგრამ ყველა უჯრედში ვხვდებით ძირითადი ფერმენტების პრაქტიკულად ერთსა და იმავე ანაკრებს. მნიშვნელოვნად იცვლება აგრეთვე ამა თუ იმ ფერმენტის რაოდენობა სხვადასხვა უჯრედში: ზოგიერთ უჯრედს უნარი აქვს გამოიმუშაოს გარკვეული ფერმენტი დიდი რაოდენობით, მაშინ როცა სხვა უჯრედში ის შეიძლება იყოს კვალის სახით. პრაქტიკულად თითოეული უჯრედისათვის დამახასიათებელია გარკვეული ფერმენტის როგორც აბსოლუტური რაოდენობა, ასევე მათი შეფარდებითი შემცველობა.

ცნობილია, რომ ესა თუ ის ფერმენტი მოიპოვება ე. ი. ლოკალიზებულია უჯრედის განსაზღვრულ ორგანოებში. მაგალითად, კრებსის ციკლში მონაწილე ფერმენტები ლოკალიზებულნი არიან ძირითადად მიტოქონდრიებში, ფოტოსინთეზში მონაწილე ფერმენტები ქლოროპლასტებში, ნუკლეინის მჟავების ბიოსინთეზში მონაწილე ფერმენტები — ბირთვებში და ა. შ. ამა თუ იმ ფერმენტის უჯრედში ლოკალიზაციის ცოდნა საჭიროა ჯერ ერთი ამ ფერმენტის მეტაბოლური ფუნქციის გარკვევისათვის და შემდეგ მისი გამოყოფისათვის.

ცხადია, უჯრედის ორგანელებში ფერმენტის ლოკალიზაციის შესწავლისათვის საჭიროა შეგვეძლოს ამ სტრუქტურების მორფოლოგიურად ნატიური და ბიოქიმიურად აქტიური სახით მიღება. უჯრედის ორგანელები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან ზომით, ფორმით, წონით და სიმკვრივით, სწორედ ამ თვისებებზეა დამყარებული ორგანელების გამოყოფისა და ერთმანეთისაგან მათი დაცილების მეთოდები. ესაა დიფერენციალური და გრადიენტული ცენტრიფუგირების მეთოდები.

დიფერენციალური ცენტრიფუგირება

ეს მეთოდი დამყარებულია ორგანელების ფრაქციონირებაზე მათ წონას შორის განსხვავების მიხედვით. ბაქტერიულ, მცენარეულ თუ ცხოველურ ქსოვილებს აქუცმაცებენ ჰომოგენიზატორებში. მასალის ჰომოგენიზირებას აწარმოებენ წყალში ან ბუფერულ ხსნარებში, სადაც აუცილებელი კომპონენტის სახით წარმოდგენილია 0,25—0,5 M საქაროზა. საქაროზა ქმნის არის იზოტონურობას და იცავს ორგანელებს დაშლისაგან და ამგვარად ხელს უწყობს მათი ნატიური სახით მიღებას. იმის მიხედვით თუ რომელი ორგანელის მიღება სურთ, საექსტრაქციო ხსნარში საჭიროების მიხედვით შეაქვთ ისეთი აგენტები, როგორიცაა ცისტეინი, β -მერკაპტოეთანოლი, დითიოტრეიტოლი, ეთილენდიამინტეტრააცეტატი (ედტა), ასკორბინის მჟავა და სხვა. ედტა კალციუმის იონების იმობილიზაციისათვის იხმარება, ხოლო დანარჩენები ფერმენტების თიოჯგუფების დაქანგვას აიცილებენ.

საკვლევი ქსოვილის ჰომოგენატი შეიცავს დაუშლელ უჯრედებს, ბირთვებს, პლასტიდებს, მიტოქონდრიებს, მიკროსომებს, პეროქსისომებს, მემბრანებს, სახამებლის მარცვლებს, ჰაგმენტებს, ხსნად ცილებს და ა. შ. ამის შემდეგ აწარმოებენ ჰომოგენატის დიფერენციალურ ცენტრიფუგირებას, ე. ი. ცენტრიფუგირებას სხვადასხვა მზარდ სიჩქარეებზე, რომლებსაც შეესაბამება გარკვეული აჩქარებები. ორგანელები ცენტრიფუგირებისას ერთიმეორეს ცილებიან მათი წონის მიხედვით. ასე მაგალითად, 300 გ-ზე ილექებიან ბირთვები და სახამებლის მარცვლები, 1000 გ-ზე ქლოროპლასტები, 10000 გ-ზე მიტოქონდრიები, 140000 გ-ზე პეროქსომები. აჩქარება ცენტრიფუგის სინჯარის სხვადასხვა სიმაღლეზე სხვადასხვაა, ამიტომ ყოველთვის უნდა მიეთითოს სინჯარის რომელ ადგილზეა, ნაგულისხმევი აჩქარება — ფსკერზე, შუაზე, თუ ზედაპირზე, ან მიეთითოს აჩქარების საშუალო მნიშვნელობა. უნდა გვახსოვდეს, რომ ერთი და იგივე სახის ორგანელები სხვადასხვა ობიექტებიდან

ილექციებიან სხვადასხვა აჩქარების დროს. ყოველი კონკრეტული ობიექტისათვის ექსპერიმენტულად უნდა დადგინდეს საჭირო აჩქარებები. პრაქტიკულად თითქმის შეუძლებელია ერთი დაცენტრირებული შედეგად სუფთა, სხვა სტრუქტურების მინარევებისაგან თავისუფალი ამა თუ იმ ორგანელის ფრაქციის მიღება. გასაგებია, რომ ზემოთ ჩამოთვლილი აჩქარებებიც ძალზე პირობითია, ის უბრალოდ გვიჩვენებს, რომ ამა თუ იმ აჩქარების შედეგად მიღებული ფრაქცია, სხვა ფრაქციებთან შედარებით, რომელი ორგანელებითაა მდიდარი.

გრადიენტული ცენტრიფუგირება

ორგანელების ფრაქციონირება წარმოებს არა მარტო იზოტონურ, არამედ ჰიპერტონულ ხსნარებშიც. უკანასკნელი საფუძვლად უდევს გრადიენტული ცენტრიფუგირების მეთოდს. გრადიენტული ცენტრიფუგირება, ანუ ცენტრიფუგირება რომელიმე ნივთიერების, მაგალითად საქაროზის სიმკვრივის გრადიენტში დამყარებულია ორგანელების სიმკვრივეებს შორის განსხვავებაზე. ამ მეთოდით აწარმოებენ უჯრედის ორგანელების გამოყოფას და აგრეთვე დიფერენციალური ცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული არა სუფთა ფრაქციის გაწმენდას.

იღებენ საქაროზის სხვადასხვა სიმკვრივის, ე. ი. სხვადასხვა კონცენტრაციების ხსნარებს და ძალიან ფრთხილად დააფენენ ერთმანეთზე ცენტრიფუგის სპეციალურ გამჭვირვალე სინჯარებში გარკვეული რაოდენობით ისე, რომ საქაროზის სიმკვრივე მცირდება სინჯარის ფსკერიდან ზედაპირისაკენ, ანუ ქმნიდეს საქაროზის გრადიენტს სიმკვრივის მიხედვით. გრადიენტი ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში შეირჩევა ექსპერიმენტულად. უნდა აღინიშნოს, რომ გრადიენტული ცენტრიფუგირების მეთოდში უმთავრესად გამოიყენება არა კუთხური, არამედ თავისუფლად დაკიდებული როტორები, რომლებიც ცენტრიფუგირების პროცესში ლებულობენ პორიზონტალურ მდგომარეობას. ასეთ პირობებში არ ხდება გრადიენტის შემქმნელი სხვადასხვა კონცენტრაციის საქაროზის ფენების ურთიერთშერევა.

ჰომოგენატს ან გარკვეული ორგანელების ფრაქციების სუსპენზიას ფრთხილად დააფენენ გრადიენტზე და აწარმოებენ ცენტრიფუგირებას გარკვეულ, მაგრამ მუდმივ სიჩქარეზე განსაზღვრული დროის განმავლობაში. ცენტრიფუგირების დრო და სიჩქარე დგინდება ექსპერიმენტულად. უჯრედის ორგანელები სხვადასხვა სიმკვრივის გამო ჩერდებიან საქაროზის სხვადასხვა სიმკვრივის ფენებ-

ში. თუ სიმკვრივის გრადიენტი, მათი მოცულობა, ცენტრიფუგირების სიჩქარე და დრო სწორად იყო შერჩეული, მიიღება ორგანელების კარგი და მკვეთრი დაყოფა. ორგანელები ნაწილდებიან სინჯარის ზედაპირიდან ფსკერისაკენ შემდეგი თანმიმდევრობით — ციტოზოლი, ქლოროპლასტები, მიტოქონდრიები, პეროქსისომები ბირთვები.

როგორც დიფერენციალური, ისე გრადიენტული ცენტრიფუგირების მეთოდებით მიღებული ფრაქციების სისუფთავე მოწმდება მიკროსკოპული მეთოდით და ფერმენტული ტესტით. გარკვეულ გალიდებზე მიკროსკოპი იძლევა შესაძლებლობას არა მარტო გავარჩიოთ ერთმანეთისაგან სუბუჯრედული ორგანელები, არამედ წარმოგვცა ვიქონიოთ ამა თუ იმ ფრაქციის გაქუჩყიანების ხარისხზე სხვა ფრაქციებით, ან უჯრედული არტეფაქტებით (უჯრედის გარსის, მემბრანის ნაგლეჯები და ა. შ.).

ფრაქციის სისუფთავის ხარისხი გამოისახება პროცენტებში, რომელიც გვიჩვენებს ყოველ ას სტრუქტურულ ნაწილაკში დაუზიანებელი ორგანელების რიცხვს.

მარკირული ფერმენტები

ზოგიერთი ფერმენტი ლოკალიზებულია უჯრედის მხოლოდ ერთ-ერთ განსაზღვრულ ორგანელაში. ასე მაგალითად, ციტოქრომ-ც-ოქსიდაზა და სუქცინატდეჰიდროგენაზა ლოკალიზებულნი არიან მხოლოდ მიტოქონდრიებში: კატალაზა, გლიკოლატოქსიდაზა და გლიოქსილატრედუქტაზა პეროქსისომებში და ა. შ. ასეთ ფერმენტებს მარკერული ფერმენტები ეწოდებათ და მათ მიხედვით შეიძლება ვიმსჯელოთ ფრაქციის ხასიათზე და მის შედარებით სისუფთავეზე.

ვთქვათ, გვაინტერესებს მიტოქონდრიებისაგან თავისუფალი ქლოროპლასტების ფრაქციის მიღება. მიღებულ ქლოროპლასტების ფრაქციაში (ფრაქცია მოწმდება ქლოროფილის შემცველობაზე) ვსაზღვრავთ ციტოქრომ-ც-ოქსიდაზის ან სუქცინატდეჰიდროგენაზის აქტივობას. თუ ფრაქციაში გამოძეღავნდა მათი აქტივობა, ეს ნიშნავს, რომ ქლოროპლასტების ფრაქცია არ არის სუფთა და შეიცავს მიტოქონდრიებს მინარევის სახით. საჭიროა ფრაქციის შემდგომი გასუფთავება და როდესაც მასში არ გამოძეღავნდება ციტოქრომ-ც-ოქსიდაზისა და სუქცინატდეჰიდროგენაზის აქტივობები, შეიძლება დარწმუნებული ვიყოთ, რომ ფრაქცია თავისუფალია მიტოქონდრიების მინარევებისაგან.

არის შემთხვევები, როდესაც ციტოზოლში (ციტოზოლი არის

უჯრედის ორგანელებისაგან თავისუფალი ფრაქცია) გამომჟღავნებული ამა თუ იმ ფერმენტის აქტივობა ჰომოგენიზაციის პერიოდში ორგანელების დახლეჩვის შედეგი ყოფილა და არა ამ ფერმენტის ციტოზოლში ლოკალიზაციისა.

დიფერენციალური და გრადიენტული ცენტრიფუგირების მე-
თოდებით მიღებულ ორგანელებში ისაზღვრება ცილის, ქლოროფი-
ლის, ნუკლეინის მჟავების, საკვლევი და მარკერული ფერმენტების
პროცენტული განაწილება და მიღებული მონაცემების საფუძველ-
ზე კეთდება დასკვნა უჯრედის ამა თუ იმ ორგანელაში ფერმენტის
ლოკალიზაციის შესახებ.

ლიტერატურა

1. Клетка и клеточные структуры, сб. под ред. Ю. Г. Молотковского, «Наука», М., 1968.
2. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. «Наука», М., 1974.
3. Лёвин А., Сикевич Ф. Структура и функции клетки. «Мир», М., 1971.
4. Цитология ферментов. Пер. с англ. под ред. А. А. Покровского, «Мир», М., 1971.

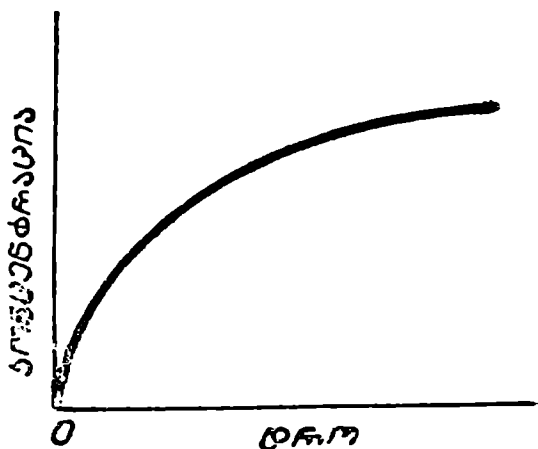
ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა აუცილებელია ბიოლოგიურ ობიექტებში ფერმენტების რაოდენობრივი აღრიცხვისათვის. ამა თუ იმ ფერმენტის აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი დამყარებულია რეაქციის იმ ტიპზე, რომელსაც ფერმენტი აკატალიზებს. ფერმენტის აქტივობა ისაზღვრება ფერმენტის მოქმედების ოპტიმალურ პირობებში იმ რეაქციის სიჩქარის მიხედვით, რომელსაც ეს ფერმენტი იწვევს. რეაქციის სიჩქარეზე კი მსჯელობენ დროის ერთეულში გარდაქმნილი სუბსტრატის ან წარმოქმნილი პროდუქტის რაოდენობის მიხედვით. მონაცემები გამოისახება გრაფიკულად, რისთვისაც ორდინატის ღერძზე გადაზომავენ გარდაქმნილი სუბსტრატის ან წარმოქმნილი პროდუქტის რაოდენობას, აბსცისთა ღერძზე კი დროს, რომლის განმავლობაში ხდება რეაქციის მიმდინარეობას აღრიცხვა (სურ. 46).

რეაქციის სიჩქარე გარკვეული დროის განმავლობაში დროის პროპორციულად იზრდება, რის შემდეგ პროპორციულობა იირღვევა. უნდა გვახსოვდეს, რომ ყოველი ფერმენტის აქტივობა, ე. ი. მის მიერ კატალიზებული რეაქციის სიჩქარე უნდა ისაზღვრებოდეს დროის იმ მონაკვეთში, სადაც დაცულია პირდაპირპროპორციული დამოკიდებულება რეაქციის სიჩქარესა და დროს შორის, ანუ უნდა განისაზღვროს რეაქციის საწყისი სიჩქარე (v₀). როგორც წესი რეაქციის საწყისი სიჩქარის განსაზღვრის სიზუსტე გაცილებით მეტია იმ შემთხვევაში, როდესაც ისაზღვრება წარმოქმნილი პროდუქტის და არა გარდაქმნილი სუბსტრატის რაოდენობა. რათა დარწმუნებული ვიყოთ, რომ რეაქციის სიჩქარე განპირობებულია მხოლოდ ფერმენტის მოქმედებით საჭიროა გავზარდოთ ან შევამციროთ ფერმენტის კონცენტრაცია, ვთქვათ ორჯერ. თუ ამ დროს რეაქციის სიჩქარე შესაბამისად გაიზრდება ან შემცირდება ორჯერ, მაშინ

ექვე არ არის, რომ რეაქციის სიჩქარეს მხოლოდ ფერმენტი განაპირობებს და ე. ი. ისაზღვრება ფერმენტის კემშიარიტი აქტივობა.

განვიხილოთ ფერმენტთა აქტივობის განსაზღვრის ძირითადი მეთოდები.



სურ. 46. რეაქციის სიჩქარის გრაფიკული გამოსახვა.

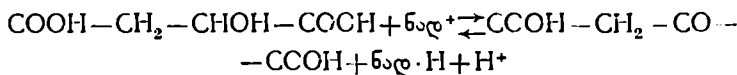
სპექტროფოტომეტრული მეთოდი

ეს მეთოდი ყველაზე მეტად მიღებული და გავრცელებულია სისწრაფისა და დიდი სიზუსტის გამო. სპექტროფოტომეტრი საშუალებას იძლევა განისაზღვროს ქიმიური ნაერთის მიერ სინათლის შთანთქმა სხვადასხვა სიგრძის ტალღაზე — სპექტრის ხილულ და ულტრაიისფერ უბანში. ქიმიური ნაერთები შეფერილი გვეჩვენება იმიტომ, რომ ისინი შთანთქავენ ხილულ სხივებს ტალღის სიგრძის განსაზღვრულ (მაგრამ ყოველი ნივთიერებისათვის სხვადასხვა) დიაპაზონში. რაც შეეხება უფერულ ხსნარებს, ისინი უფერულად გვეჩვენება იმის გამო, რომ ისინი არ შთანთქავენ ხილულ სხივებს. უფერული ხსნარების გამოკვლევა სპექტროფოტომეტრის საშუალებით ულტრაიისფერ არეში გვიჩვენებს, რომ ისინი შთანთქავენ, მაგრამ იხეთ გამოსხივებას, რომელიც უხილაგია ადამიანისათვის.

სპექტროფოტომეტრული მეთოდი ფართოდ გამოიყენება დამუშავებულ-აღმდგენელი ფერმენტების — ოქსიდორედუქტაზების აქტივობის განსაზღვრისათვის. მაგალითისათვის განვიხილოთ ერთ-

ერთი დეჰიდროგენაზის — მალატდეჰიდროგენაზის (მდჰ) აქტივობის განსაზღვრის სპექტროფოტომეტრული მეთოდი.

მდჰ-ს მოქმედების შედეგად ვაშლის მჟავა გადადის მჟაუნძმარ-მჟავაში და პირიქით. ამ რეაქციის წარმართვისათვის აუცილებელია კოფერმენტი ნიკოტინამიდადენინდინუკლეოტიდი (ნად-ი). ნად⁺-ი საჭიროა ვაშლის მჟავას დაქანგვისათვის და ნად-H₂—მჟაუნძმარმჟავას აღდგენისათვის.

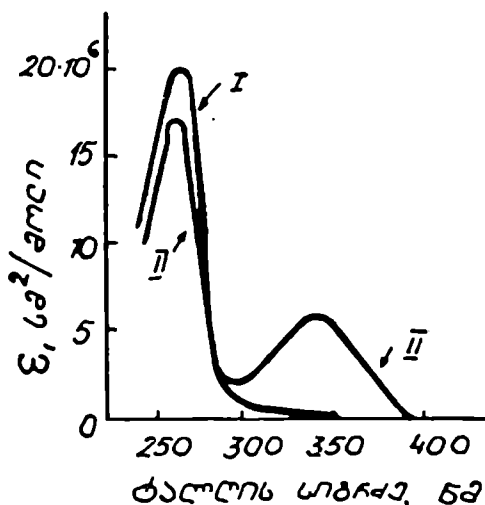


ვაშლის მჟავა
(მალატი)

მჟაუნძმარმჟავა
(ოქსალოაცეტატი)

რეაქციის სიჩქარე ისაზღვრება ულტრაიისფერ არეში 340 ნმ-ზე დროის ეოთეულში ნად-H₂ ქანგვის ხარისხის მიხედვით, რაც გამოიხატება სარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივის შემცირებაში.

საქმე იმაშია, რომ ნად-ისა და ნადფ-ის დაქანგული და აღდგენილი ფორმები მკვეთრად განსხვავდებიან თავიანთი შთანთქმის



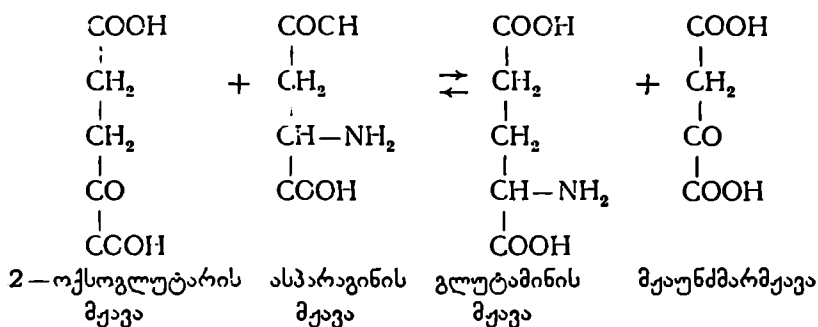
სურ. 47. ნად⁺-ისა (I) და ნად. H₂-ის შთანთქმის სპექტრი

სპექტრებით და განსაკუთრებით 340 ნმ-ზე (რაც თავის დროზე აჩვენა ო. ვარბურგმა) (სურ. 47).

როგორც სურათიდან ჩანს ნაღ- H_2 340 ნმ-ზე აქვს შთანთქმის პიკი, ნაღ $^+$ -ს კი არა.

როდესაც მიმდინარეობს ნაღ- H_2 ჟანგვა და ნაღ $^+$ -ის წარმოქმნა ბუნებრივია ადგილი აქვს ნაღ- H_2 -ის რაოდენობის შემცირებას, რასაც რა თქმა უნდა მოჰყვება შთანთქმის შემცირება და პირიქით, როდესაც ხდება ნაღ $^+$ -ის აღდგენა ნაღ- H_2 -ად ხდება შთანთქმის ზომატება. იმისდამიხედვით, თუ რა სიდიდით ხდება შთანთქმის შემცირება ან მომატება მსჯელობენ რეაქციის სიჩქარეზე და ე. ი. მღპ-ს აქტივობაზე.

სპექტროფოტომეტრული მეთოდი შეიძლება გამოყენებულ იქნას არა მარტო მაშინ, როდესაც შესასწავლი რეაქციის რომელიმე კომპონენტი იცვლის შთანთქმას, არამედ მაშინაც როდესაც შესასწავლი რეაქციის პროდუქტები წარმოადგენენ, ვთქვათ იმავე დეჰიდროგენაზების სუბსტრატებს. განვიხილოთ ისეთი მაგალითი, სადაც უკვე ჩვენთვის ნაცნობი მღპ-ს საშუალებით შეიძლება განსაზღვრული იქნას ასპარტატამინოტრანსფერაზის აქტივობა. რეაქცია, რომელსაც ეს ფერმენტი აკატალიზებს შემდეგია:



ამ ფერმენტის კოფერმენტი პირიდოქსალ-5-ფოსფატი. როგორც ჩანს რეაქციის ერთ-ერთი პროდუქტი, კერძოდ მეაუნძმარმეაუა წარმოადგენს მღპ-ს სუბსტრატს. თუ სარეაქციო ხსნარში, სადაც ეს რეაქცია მიმდინარეობს შევიტანთ ფერმენტ მღპ-ს და კოფერმენტს ნაღ- H_2 , მაშინ მღპ-ს მოქმედების შედეგად მოხდება მეაუნძმარმეაუას აღდგენა ნაღ- H_2 -ით, რასაც თან მოყვება 340 ნმ-ზე სარეაქციო ხსნარის ნაღ- H_2 -ით გამოწვეული შთანთქმის შემცირება. შთანთქმის შემცირების ხარისხი კი მაჩვენებელია ასპარტატამინოტრანსფერაზის აქტივობისა.

ცხადია, ნაღ- H_2 მით მეტი დაიჟანგება რაც მეტი მეაუნძმარმეაუა წარმოიქმნება ამინოტრანსფერაზის მოქმედების შედეგად.

აქ ყურადღება უნდა მივაქციოთ იმას, რომ ე. წ. შეუღლებული ფერმენტები (ჩვენს შემთხვევაში მდჰ) და სხვა კომპონენტები, რომლებიც საჭიროა პროცესის წარმართვისათვის, საკვლევ სისტემას უნდა დაემატოს ჰარბი რაოდენობით და რაც მთავარია სუფთა სახით (იგულისხმება ფერმენტული სისუფთავე). ე. წ. შეუღლებული ფერმენტის პრეპარატი არ უნდა შეიცავდეს თუნდაც მცირე მინარევის სახით ისეთ ფერმენტს, რომელსაც შეუძლია რეაქციის პროდუქტებზე მოქმედება.

მანომეტრული მეთოდი

მეთოდი გამოიყენება ფერმენტების შესასწავლად იმ შემთხვევაში. როდესაც რეაქციის პროცესში აღგილი აქვს გაზობრივი პროდუქტების შთანთქმას ან წარმოქმნას. მაგალითად, ჟანგვითი რეაქციებისას ხდება ჟანგბადის შთანთქმა, დეკარბოქსილირებისას კი CO_2 -ის გამოყოფა.

მანომეტრული გამოკვლევები ტარდება სპეციალურ აპარატში, რომელსაც ვარბურგის აპარატი ეწოდება. ვარბურგის აპარატის გარდა დიდი გამოყენება აქვს პოლაროგრაფულ აპარატს. მართალია, ამჟამად მანომეტრიულმა მეთოდებმა ნაწილობრივ დაკარგეს თავიანთი მნიშვნელობა, მაგრამ თავის დროზე სწორედ მანომეტრული მეთოდების საშუალებით მოხერხდა მაგალითად, ნახშირწყლების ჟანგვაში მონაწილე ფერმენტული რეაქციების თანმიმდევრობის შესწავლა.

კოლორიმეტრული მეთოდი

მეთოდს საფუძვლად უდევს ფოტოელექტროკოლორიმეტრული გაზომვა იმ შეფერვისა, რომელსაც იძლევა სუბსტრატი ან პროდუქტი რომელიმე სპეციფიკურ ქიმიურ რეაგენტთან, მაგალითად, ატფ-ანის (ადენოზინტრიფოსფატაზა) მოქმედების შედეგად წარმოქმნილი არაორგანული ფოსფორი ისაზღვრება ფისკეს და სუბაროუს ცნობილი მეთოდით. ამ გზით შეისწავლება ფოსფატაზები, ფოსფორილაზები და სხვა ფერმენტები.

კოლარიმეტრული მეთოდი

მეთოდს საფუძვლად უდევს სარეაქციო ხსნარის ხვედრითი ბრუნვის ცვლილების განსაზღვრა. მაგალითისათვის განვიხილოთ ფერმენტი საქარაზა (β-ფრუქტოფურანოზიდაზა). ამ ფერმენტის მოქმედების შედეგად საქაროზა იძლევა ფრუქტოზას და გლუკოზას.

საქაროზის ხსნარი პოლარიზებულ სხივს აბრუნებს მარჯვნივ და მისი ბრუნვა უდრის $+66.5^\circ$, ხოლო ფრუქტოზის ხსნარი სხივს აბრუნებს მარცხნივ (-92.4°). ოუ ჩვენ საქაროზის ხსნარზე ვიმოქმედებთ საქარაზით, მაშინ რეაქციის შედეგად წარმოიქმნება ფრუქტოზა და პოლარიმეტრში საწყისი ხსნარის მიერ პოლარიზებული სხივის ბრუნვა მარჯვნივ, ფერმენტის მოქმედებასთან (პიღროლიზთან) ერთად შემცირდება და ბოლოს გადავა მარცხნივ ბრუნვაში.

ვისკოზიმიტრული მეთოდი

ამ მეთოდით ძირითადად ისაზღვრება ის ფერმენტები, რომლებიც ზღუდენ ცილებს და პექტინურ ნაერთებს, ე. ი. პოტეინაზებს და პექტოლიზური ფერმენტები.

თუ საკვლევი ფერმენტული პრეპარატი შეიცავს პროტეინაზებს, მაშინ შესაბამის სუბსტრატებზე მოქმედებისას ხსნარის სიბლანტე უნდა შემცირდეს.

ჰრომატოგრაფიის მეთოდი

ამ მეთოდით ისაზღვრებიან ამინოტრანსფერაზები, დეკარბოქსილაზები და ა. შ. რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი ამინო-ან კეტომჟავები რაოდენობრივად ისაზღვრებიან მაგალითად ქაღალდას ქრომატოგრაფიებზე, უნდა აღინიშნოს, რომ ეს მეთოდი შრომატევადია და დიდ დროს მოითხოვს.

ნებისმიერი მეთოდით ფერმენტის აქტივობის განსაზღვრისას აუცილებელია საკონტროლო ცდების დაყენება, რათა მთლიანად განორიციხული იქნას ამა თუ იმ სუბსტრატის არაფერმენტული გზით გარდაქმნა.

ძირითადად მიმართავენ შემდეგ ორ საკონტროლო ცდას:

1. სუბსტრატის ან კოფაქტორის გარეშე (უმჯობესია სუბსტრატის გარეშე).
2. ინაქტივირებული ფერმენტის მონაწილეობით.

ფერმენტების აქტივობის გამოსახვა

ქვემოთ განიხილება, თუ როგორ ხდება ფერმენტების აქტივობის გამოსახვა და რა არის ფერმენტის ერთეული. ხსნარებში ფერმენტების პირდაპირი აღენტიფიცირება და მათი რაოდენობის განსაზღვრა პრაქტიკულად ძნელ ამოცანას წარმოადგენს. ეს შესაძლებელია მხოლოდ მაშინ, როდესაც ცნობილია ფერმენტის დამახასიათებელი ისეთი ქიმიური სტრუქტურები, რომლებიც შეიძლება განისაზღვროს ქიმიური ან სპექტროფოტომეტრული მეთოდებით. ამ-

ის გამო, როგორც უკვე ვთქვით, ფერმენტის არსებობის შესახებ მსჯელობენ მის მიერ კატალიზებული რეაქციის, ხოლო მის რაოდენობას განსაზღვრავენ რეაქციის სიჩქარის მიხედვით და გამოსახავენ პირობითად „ფერმენტის ერთეულებში“.

ფერმენტის სტანდარტულ, საერთაშორისო ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ის რაოდენობა, რომელიც მოცემულ პირობებში იწვევს ერთი მიკრომოლი სუბსტრატის გარდაქმნას ერთ წუთში. იმ შემთხვევაში, როდესაც ურთიერთქმედებს სუბსტრატის ორი იდენტური მოლეკულა ფერმენტის ერთეული შეესაბამება ფერმენტის იმ რაოდენობას, რომელიც აკატალიზებს ორი მიკრომოლის გარდაქმნას ერთ წუთში. რეკომენდებული ტემპერატურაა 25⁰-C, წინააღმდეგ შემთხვევაში მითითებულ უნდა იქნეს ის ტემპერატურა, რომელზედაც რეაქცია ტარდება. სხვა პირობები იგულისხმება, რომ ოპტიმალურია. მიღებული ფერმენტული პრეპარატის სისუფთავე ხასიათდება სიდიდით, რომელსაც ფერმენტის ხვედრითი აქტივობა ეწოდება. ფერმენტის ხვედრითი აქტივობა არის ფერმენტის ერთეულთა რიცხვი გადაანგარიშებული ერთ მილიგრამ ცილაზე. მაგალითად, თუ ფერმენტი მიღებულია სუფთა სახით, მაშინ შეიძლება განისაზღვროს მისი ხვედრითი აქტივობა და ამის საფუძველზე გაითვალისწინოს ფერმენტის აბსოლუტური შემცველობა გაუწმენდავ პრეპარატებში. ასე მაგალითად, თუ სუფთა ფერმენტის ხვედრითი აქტივობაა 10 ერთეული, ხოლო გაუწმენდავ პრეპარატში ისაზღვრება 100 ერთეული. მაშინ ცხადია, რომ ეს პრეპარატი შეიცავს 10 მილიგრამ ფერმენტს.

თუ ზუსტადაა ცნობილი ფერმენტის მოლეკულური მასა, მაშინ შეიძლება ვისარგებლოთ გაგებით „მოლეკულური აქტივობა“. მოლეკულური აქტივობა არის ერთ წუთში ერთი მოლეკულა ფერმენტის მიერ გარდაქმნილი სუბსტრატის მოლეკულის რიცხვი.

მოლეკულური აქტივობა ეს იგივე „ბრუნვათა რიცხვია“ რომელიც ენზიმოლოგიაში შენოტანილ იქნა ო. ვარბურგის მიერ. ვარბურგის მიხედვით ბრუნვათა რიცხვი ესაა ერთ წუთში ერთი მოლი ფერმენტის მიერ გარდაქმნილი სუბსტრატის მოლეკულის რიცხვი.

როდესაც ცნობილია ფერმენტის მოლეკულაში აქტიური (კატალიზური) ცენტრების რაოდენობა შეიძლება ვისარგებლოთ გაგებით „კატალიზური ცენტრის აქტივობა“. რომელიც არის ერთ წუთში გარდაქმნილი სუბსტრატის მოლეკულების რიცხვი ფერმენტის ერთ კატალიზურ ცენტრზე გადაანგარიშებით. თუ ფერმენტის მოლეკულაში არის მხოლოდ ერთი აქტიური ცენტრი, მაშინ „კატალიზური ცენტრის აქტივობა“ ემთხვევა „მოლეკულურ აქტივობას“.

ფერმენტის კონცენტრაცია ხსნარში მიზანშეწონილია გამოისახოს ერთეულების რიცხვით ერთ მილილიტრზე.

ლიტერატურა

1. Асатнани В. С. Ферментные методы анализа, «Наука», М., 1969.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. «Мир», М., 1966.
3. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. «Наука», М., 1974.
4. Номенклатура ферментов. Итоги науки. Серия биологическая химия. Пер. с англ. под ред. А. Е. Браунштейна, ВИНТИ, М., 1966.
5. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Д. Ф. Манометрические методы изучения тканевого обмена, ИЛ., М., 1951.
6. Ферменты. Сб. статей под ред. А. Е. Браунштейна. «Наука», М., 1964.
7. Methods in Enzymology. Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan. N. Y., Academic Press. vol. IV, special techniques for the enzymologist, 1957.

თავი X

ფერმენტების გამოყოფის, გაწმენდისა და დახასიათების მეთოდები

ფერმენტების დიდი უმრავლესობა ძალზე ლაბილურია, რის გამოც ისინი ადვილად განიცდიან ინაქტივაციას, ე. ი. კარგავენ ფერმენტულ აქტივობას. ამიტომ საჭიროა ფერმენტებზე მუშაობისას გარკვეული სიფრთხილის ზომების მიღება.

ფერმენტებთან მუშაობის ძირითადი პრინციპები

პირველ რიგში, როგორც წესი, საჭიროა გამოყოფისა და გაწმენდის ყველა პროცედურა ვაწარმოოთ $0-4^{\circ}\text{C}$ -ზე. არის გამონაკლისი შემთხვევები, როდესაც ფერმენტის გამოყოფა-გაწმენდა შეიძლება ხდებოდეს ოთახის ტემპერატურაზე, მაგალითად α -ამილაზის შემთხვევაში.

ორგანული გამხსნელებით ფრაქციონირებისას საჭიროა კიდევ უფრო დაბალი ტემპერატურები $-10-(-15)^{\circ}\text{C}$.

ფერმენტთა უმრავლესობა განიცდის ინაქტივირებას მჟავა და ტუტე არეში, კერძოდ ისეთ ხსნარებში, რომელთა pH ნაკლებია 5 ან მეტია 9, მაგრამ აქაც არის გამონაკლისები, მაგალითად α -ამილაზა, რომელიც გვხვდება ზოგიერთი ობის სოკოს შტამებში უძლებს pH-2, რის გამოც მას მჟავაგამძლე α -ამილაზა ეწოდება. pH-ის მიმართ ფერმენტთა დიდი მგრძნობიარობის გამო აუცილებელია გამოყოფისა და გაწმენდის ყველა საფეხურზე ფერმენტული ხსნარების pH-ის შემოწმება. საჭიროების შემთხვევაში მჟავას ან ტუტის დამატება ხდება ფრთხილად, კუროკლის კედელზე ჩაყოლებით, ფერმენტული ხსნარის მორევის პირობებში, რაც გამორიცხავს ფერმენტული ხსნარისა და მჟავას ან ტუტის შეხების საზღვარზე pH-ის მკვეთრ ცვლილებას.

ფერმენტების გამოყოფისა და გაწმენდის გარკვეულ საფეხურზე ზოგჯერ საჭირო ხდება ფერმენტული ხსნარის ენერგიული არე-

ვა. ამ დროს ადგილი აქვს ხსნარის აქაფებას, რაც ძალზე არასასურველია და უნდა ვერიდოთ. საქმე იმაშია, რომ გამყოფ ზედაპირზე ფერმენტები, როგორც წესი, განიცდიან დენატურაციას. აქაფების თავიდან აცილება შეიძლება სპეციალური სარეველების (დიდი ღრთის ქონე) ან მაგნიტური სარეველების გამოყენებით. სარეველა უნდა იყოს ხსნარში შეძლებისდაგვარად ღრმად ჩაშვებული. მარილებით ფრაქციონირებისას იშვიათად, მაგრამ მაინც ადგილი აქვს ჰაერის ბუშტუკის გამოყოფას, რაც იწვევს ფერმენტის დენატურაციას. ამიტომ საჭიროა მარილის წმინდად გაფხვიერება და მცირე უღუფებით, ან მისი ნაჯერი ხსნარის სახით დამატება.

ქიმიური რეაგენტები ხშირად შეიცავენ ისეთ მინარევებს, რომლებიც უარყოფითად მოქმედებენ ფერმენტების უმრავლესობაზე. ამიტომ საჭიროა მათი გაწმენდა. თხევადი რეაგენტების გაწმენდა ხორციელდება გადადენით, ხოლო მყარი რეაგენტების გადაკრისტალებით. ფერმენტებთან მუშაობისას სასურველია ორჯერ გადადენილი და ორჯერ გადაკრისტალებული რეაგენტების გამოყენება. რაც შეეხება წყალს, ისიც უნდა იყოს ორჯერ დისტილირებული (ბიდისტილატი).

ფერმენტები, როგორც წესი, მით უფრო ადვილად კარგავენ აქტივობას ე. ი. ინაქტივირდებიან, რაც უფრო სუფთა, ჰომოგენურ მდგომარეობაში იმყოფებიან. ეს აიხსნება იმით, რომ საწყის—გაუწმენდავ ან მცირედ გაწმენდილ ექსტრაქტებში არსებული სხვა, ბალასტი ცილები გარკვეულად იცავენ ფერმენტს ინაქტივირებისაგან ე. ი. შედარებით სტაბილურს ხდიან მას. ამიტომ ხშირად გაწმენდილ, ჰომოგენურ ფერმენტულ პრეპარატებს ინახავენ ღრმად გაყინულ მდგომარეობაში, ან ამონიუმის სულფატის ნაჯერ ხსნარში (თუ, რა თქმა უნდა, თვით ამონიუმის სულფატი არ იწვევს ფერმენტის ინაქტივირებას).

ფერმენტების მასტრახცია

ობიექტის შერჩევის, ფერმენტის ლოკალიზაციის დადგენისა და უჯრედის ამა თუ იმ ორგანელის გამოყოფის შემდეგ დგება საკითხი ამ ორგანელიდან ფერმენტის ექსტრაგირება-გამოყოფის ე. ი. ხსნარში გადაყვანის შესახებ. თუ ფერმენტი ლოკალიზებულია ციტოზოლში, მაშინ პირდაპირ იწყებენ ფერმენტის გაწმენდას, რადგან ციტოზოლში ფერმენტი უკვე ხსნად მდგომარეობაში იმყოფება.

ორგანელებიდან ფერმენტის ხსნად მდგომარეობაში გადასაყვანად, პირველ რიგში, საჭიროა ორგანელის გარსის დარღვევა. ზოგჯერ

ამის მიღწევა შესაძლოა უბრალო სუბპენდირებით. უფრო ხშირად კი აუცილებელია ენერგიული ზომების მიღება, რაც მდგომარეობს ამა თუ იმ ორგანელის ფრაქციის მექანიკურ დამუშავებაში, მაგალითად, კვარცის სილასთან ან შინის ფხვნილთან ერთად მოპარესვაში, მრავალჯერად გაყინვა-გაღებობაში, ულტრაბგერებით ან ორგანული გამხსნელებით დამუშავებაში. გავრცელებულ მეთოდს წარმოადგენს ლიზისი სპეციალური ფერმენტების ცონაწილეობით და ავტოლიზი. თითოეული ამ მეთოდთაგანი გამოიყენება ობიექტის შესაბამისად. მაგალითად, მიკროორგანიზმების, საფუვრების, ბაქტერიებისა და სოკოების შემთხვევაში უპირატესად გამოიყენება ავტოლიზი და ულტრაბგერებით დამუშავება; მცენარეული და ცხოველური ქსოვილების შემთხვევაში ფართოდ გამოიყენება აცეტონით დამუშავება. ეს მეთოდი იმათაა მნიშვნელოვანი, რომ იგი იძლევა ფერმენტული პრეპარატის მშრალი ფხვნილის სახით მიღების საშუალებას. ასეთი პრეპარატი. რომელსაც ფერმენტის აცეტონური პრეპარატი ეწოდება, ინახება ფერმენტული აქტივობის დაუკარგავად დიდი ხნის განმავლობაში და წარმოადგენს ძალზე მოხერხებულ საწყისს წყაროს, საიდანაც ფერმენტის ექსტრაქცია ხორციელდება უბრალო წყლის ან ბუფერის საშუალებით. მაგრამ ეს ყოველთვის ასე როდია. მაგალითად, ვაზის ფოთლების აცეტონური პრეპარატიდან ფერმენტების სრული ექსტრაქცია-ათვის საჭიროა მაღალი pH (9—10) და დეტერგენტის გამოყენება. საერთოდ დეტერგენტები, ე. ი. ზედაპირულად აქტიური ნივთიერებები. დიდ გამოყენებას პოულობენ ორგანელებიდან ცილების, ფერმენტებისა და სხვა ნივთიერებების სრული გამოყოფისათვის. აქ კარგად უნდა გვახსოვდეს, რომ ორგანელიდან ფერმენტის ამა თუ იმ დეტერგენტით გამოყოფის დროს წინასწარი ცდებით დადგენილი უნდა იქნეს, რომ ეს დეტერგენტი არ იწვევს ამ ფერმენტის ინაქტივირებას.

დეტერგენტები იყოფიან იონურ და არაიონურ დეტერგენტებად. ენზიმოლოგიაში ფართოდ გამოიყენება შემდეგი დეტერგენტები: ნატრიუმის დოდეცილსულფატი, დეზოქსიქოლატი, ტრინ-80 (პოლიოქსიეთილენ სორბიტანის მონოოლეატი), ტრიტონ X 100 (ალკილფენოქსიპოლიეთოქსიეთილენის ნაწარმი).

სიტყვა დეტერგენტი წარმოდგება ინგლისური ტერმინიდან detergent, რაც პირდაპირი მნიშვნელობით ნიშნავს „სარეცხი საშუალება“.

აცეტონური პრეპარატის მიღება ხდება შემდეგნაირად: ბიოლოგიურ მასალას ათავსებენ ჰომოგენიზატორში და რამდენჯერმე

ამუშავებენ ქარბი რაოდენობის ცივი აცეტონით 1—2 წთ-ის განმავლობაში. რამდენადაც აცეტონი იწვევს ფერმენტთა ინაქტივირებას, მას აცივებენ —15—(—20)°C-მდე, ხოლო მთელ ოპერაციას ატარებენ 0—4°C-ზე. მიღებულია პირველი დამუშავება ჩატარდეს 100%-იანი აცეტონით, მეორე 80%-იანით, მესამე ისევ 100%-იანით. ამის შემდეგ მიღებულ პომოგენატს სწრაფად ფილტრავენ ბიუხნერის ძაბრზე. ფილტრზე დარჩენილ ნალექს კიდეც ჩარეცხენ გარკვეული მოცულობა 100%-იანი აცეტონით. ამ გზით მიღებული სველი ნალექი გადააქვთ ფილტრის ქაღალდზე და აფხვიერებენ მინის წკირით. ოთახის ტემპერატურაზე აცეტონი სწრაფად ორთქლდება და 0,5—1 სთ-ის განმავლობაში მიიღება მშრალი აცეტონური პრეპარატი. უმჯობესია პრეპარატის დაბალ ტემპერატურაზე გაშრობა.

აცეტონით დამუშავება იმითაცაა კარგი, რომ გარდა ორგანელების დაშლისა წარმოებს ლიპიდების, პიგმენტების, ქლოროფილის, ფენოლური ნაერთებისა და სხვათა მოცილება, აცეტონში მათი კარგი ხსნადობის გამო. მშრალი აცეტონური პრეპარატი 0°C-ზე ინახება რამდენიმე თვის, ზოგჯერ რამდენიმე წლის განმავლობაშიაც. ასეთ შემთხვევაში ყურადღება უნდა მივაქციოთ იმას, რომ აცეტონურ პრეპარატში არ წარმოიშვას მიკროორგანიზმები. აცეტონური პრეპარატი კარგადაა მიღებული, თუ ის ფხვიერი და თეთრი ფერისაა.

ფერმენტულ ექსტრაქტებში საკვლევი ფერმენტის გარდა მრავლადაა სხვა ცილები, ფერმენტები ე. წ. ბალასტი ცილები, მაღალი თუ დაბალი მოლეკულური მასის მქონე სხვადასხვა ნივთიერებები. საჭიროა ფერმენტის მათგან განთავისუფლება, რაც ხორციელდება თანდათანობით, ფრაქციონირების სხვადასხვა მეთოდების გამოყენებით. ფრაქციონირების არსი იმაში მდგომარეობს, რომ სხვადასხვა ცილები განსხვავებულ დამოკიდებულებას იჩენენ ამა თუ იმ ზემოქმედების მიმართ.

შეფუთვა

მეთოდი დამყარებულია ცილების — ფერმენტების თვისებაზე დაილექოს pH-ის გარკვეულ მნიშვნელობაზე. ხშირად საწყისი ფერმენტული ექსტრაქტის შეფუთვებისას (სუსტი მჟავებით — ძმარმჟავით ან სხვა ორგანული მჟავებით) pH 4—5-მდე ილექებიან ბალასტი ცილები, ხოლო საკვლევი ფერმენტი ხსნარში რჩება. ასეთი ხსნარი ყოვნდება 10—15 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც ცენტრიფუგირდება და ცილდება დენატურირებული ცილები. მჟავას დამატება ხდება თანდათანობით, წვეთობით, ჰურჭლის კედელ-

ზე, რა თქმა უნდა სიცივეში, ენერგიული ნჯღრევის პირობებში. თუ ფერმენტი დალექვისას არ დენატურირდება, ამ მეთოდით შეიძლება თვით ფერმენტის დალექვა და მისი განთავისუფლება ბალასტი ცილებისაგან.

თერმული დამუშავება

მეთოდი დამყარებულია ცილების, ფერმენტების თერმოსტაბილურ თვისებაზე, ე. ი. მათ უნარზე გაუძლონ გარკვეულ ტემპერატურაზე დამუშავებას. სუბსტრატის დამატება, როგორც წესი, 100-ით ზრდის ფერმენტის სტაბილობას გაცხელების მიმართ. თერმულ დამუშავებას, ისე როგორც შექაჩვებას იყენებენ ფერმენტთა ფრაქციონირების საწყის სტადიებზე.

თერმული დამუშავების შემთხვევაში აქე იქცევიან: მომზადებული აქეთ მზარდი ტემპერატურის გქონე წყლის რამდენიმე აბაზანა. საკვლევ ხსნარს ათავსებენ მრგვალი კოლბაში და გამუდმებული წრიული ბრუნვის პირობებში ათავსებენ ყველაზე ცხელ აბაზანაში. როდესაც შემიმჩნევა ხსნარის ამღვრევა, რაც ცილების დალექვის დასაწყისის მაჩვენებელია, კოლბა გადააქვთ იმ ტემპერატურის მქონე აბაზანაში, რომელზედაც დაიწყო ამღვრევა. ამ ტემპერატურაზე აყოვნებენ 5—10 წთ-ის განმავლობაში ნალექის მოსაპოვებლად. რის შემდეგ სწრაფად გადააქვთ ცივ აბაზანაში ისევე წრიული ბრუნვის პირობებში სწრაფი გაცივების მიზნით. მიღებულ ნალექს აცილებენ ცენტრიფუგირებით.

უმჯობესია ფერმენტული ექსტრაქტის მცირე მოცულობაზე წინასწარ ექსპერიმენტულად იქნას დადგენილი ის ტემპერატურა, რომელზედაც საკვლევი ფერმენტი თვით იწყებს დალექვა-დენატურირებას.

ფრაქციონირება ორგანული გამხსნელებით

მეთოდი დამყარებულია ორგანული გამხსნელების თვისებაზე შდამცარონ წყლის დიელექტრიკული მუდმივა. რადგან ცილების ელექტროსტატიკური მიზიდვის ძალა უკუპროპორციული არის დიელექტრიკული მუდმივისა, ცილები წარმოქმნიან აგრეგატებს ე. ი. ილექებიან.

პირველ რიგში უნდა გვახსოვდეს, რომ ფრაქციონირების ხარისხზე მოქმედებს ელექტროლიტების კონცენტრაცია და ფერმენტული ექსტრაქტების pH. სასურველია ელექტროლიტის კონცენტრაცია იყოს დაბალი, 0,05 M-ზე ნაკლები. თუმცა მისი მთლიანი მოცულობის შემთხვევაში ძალზე გაძნელდება ნალექების დაცენტ-

აღფუფრება. მიზანშეწონილია ფერმენტული ექსტრაქტის pH იყოს 6,0—7,0.

სპეციალური მოწყობილობის საშუალებით ხდება აცეტონის წვეთობით (ყედეზე ჩაყოლებით) დამატება ფერმენტულ ექსტრაქტში, რომელიც გაბუდმებული მორევის პირობებში გამაციებელ ნარევეში (-15 , -20°C) იმყოფება. გაციებული აცეტონის დამატება უნდა დაიწყოს მაშინვე, როგორც კი ფერმენტული ექსტრაქტის ტემპერატურა 0°C მიაღწევს. საქმე იმაშია, რომ 0°C და უფრო ქვევით ფერმენტული ექსტრაქტი ჩვეულებრივ იყინება. აცეტონის დამატებისთანავე ტემპერატურა იწევს მაღლა რასაც შეიძლება მოჰყვეს ფერმენტის ინაქტივირება. ამიტომ საჭიროა პირველ მომენტში, აცეტონი მიეწოდოს ფრთხილად, წვეთობით, ხოლო მას შემდეგ რაც ფერმენტულ ექსტრაქტს დაემატება ცივი აცეტონის პიოველი წვეთები ფერმენტის გაყინვა გამოიწვევს, რადგან აცეტონის დამატების შემდეგ ხსნარის გაყინვას ტემპერატურა საგრძნობლად იწევს ქვევით. აცეტონის შემდგომი დაატება შესაძლებელია წარმოებდეს უფრო დაბალ ტემპერატურაზედაც კი. აცეტონის გარკვეული რაოდენობის დამატების შემდეგ წარმოიქმნება ნალექი, რომელსაც აცილებენ ცენტრიფუგირებით. სუპერნატანტს კვლავ უმატებენ აცეტონს გარკვეული რაოდენობით და აცენტრიფუგირებენ. ასე იმეორებენ რამდენჯერმე, ე. ი. აწარმოებენ აცეტონით ფრაქციულ დალექვას. მიღებულ ნალექებს მაშინვე, სწრაფად ხსნიან წყალში ან ბუფერულ ხსნარში, რათა განაზავონ აცეტონი, რომელსაც შეუძლია გამოიწვიოს ფერმენტის ინაქტივირება და ადიალიზებენ აცეტონისა და სხვა დაბალმოლეკულური ნაერთების მთლიანად მოცილების მიზნით. ამ გზით მიღებულ დიალიზებულ ფრაქციებში საზღვრავენ საკვლევი ფერმენტების აქტივობას.

ორგანული გამხსნელებით ფრაქციონირებისას უნდა გვახსოვდეს, რომ საჭიროა:

1. ფერმენტი მაქსიმალურად მცირე დროის განმავლობაში იყოს აცეტონთან კონტაქტში;
2. დაცული იქნას ტემპერატურული რეჟიმი;
3. ყურადღება მიექცეს ფერმენტულ ექსტრაქტში pH-ის შესაბამის მნიშვნელობას და ელექტროლიტის საჭირო კონცენტრაციას.

ფრაქციონირება არაორგანული მარილებით

მეთოდი დამყარებულია ცილების, ფერმენტების თვისებაზე დაილექონ—გამომარილდნენ ხსნარში მარილების სხვადასხვა კონ-

ცენტრაციებზე. გამომარილება დამოკიდებულია მარილით გამხსნელის ჩანაცვლების ხარისხზე, რაც იწვევს გამხსნელსა და გახსნილ ნივთიერებებს შორის ურთიერთქმედების შემცირებას. მარილს კონცენტრაციის თანდათანობით გაზრდით მიიღება ცალკეული ფრაქციები, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან ამა თუ იმ ფერმენტის უპირატესი შემცველობით. ცილის ხსნადობა დამოკიდებულია pH-ზე, ტემპერატურაზე და ელექტროლიტის—მარილის ტიპზე.

ცილა, მისი ამფოტერული ბუნების გამო, ყველაზე ნაკლებად მის იზოელექტრულ წერტილში იხსნება. ცილის იზოელექტრული წერტილი ეწოდება pH-ის იმ მნიშვნელობას, რომლის დროსაც დადებითი და უარყოფითი მუხტები ერთმანეთის ტოლია. ამიტომ იზოელექტრულ წერტილზე იქმნება ყველაზე ხელსაყრელი პირობები ცილის დასალექად. ცილების ხსნადობა ტემპერატურის გაზრდასთან ერთად იზრდება. ცილების ხსნადობა, როგორც ვთქვით, დამოკიდებულია აგრეთვე ელექტროლიტის ტიპზე. პოლივალენტურ ელექტროლიტებში უფრო ადვილად ხდება ცილების გამომარილება, ვიდრე მონოვალენტურ ელექტროლიტებში. რაც ელექტროლიტის იონური ძალითაა განპირობებული. ე. ი. ცილება უფრო კარგად ისეთ ელექტროლიტებში იხსნებიან, რომლებიც ხასიათდებიან დაბალი იონური ძალით.

ცილების ფრაქციონირებისათვის მარილებიდან ყველაზე ხშირად გამოიყენება ამონიუმის სულფატი. იგი ხასიათდება წყალში კარგი ხსნადობით (70 გ 100 მლ გამხსნელში). მისი ხსნადობა ტემპერატურაზე ნაკლებადაა დამოკიდებული. ამონიუმის სულფატის სისუფთავეზე დიდადაა დამოკიდებული ფრაქციონირების ხარისხი. ამიტომ, როგორც წესი, ამონიუმის სულფატს ამ მიზნებისათვის გადაკრისტალებენ ორჯერ მაინც. სპეციალურად ხდება, აგრეთვე ამონიუმის სულფატის პრეპარატიდან რკინის იონების მოცილება, რასაც შეუძლია არასასურველი გავლენა მოახდინოს ფერმენტის აქტივობაზე. ამისათვის ამონიუმის ნაჯერ ხანარს გადაკრისტალებამდე რამდენიმე დღის განმავლობაში აყოვნებენ მაღალ ცილინდრულ ჭურჭელში, რაც აადვილებს რკინის იონების ჭურჭლის ძირზე დალექვას, ეს თვალითაც კარგად შეინიშნება. ამონიუმის სულფატის დამატება ხდება მცირე ულუფებით მორევის პირობებში კარგად გაფხვიერებული მშრალი ფხვნილის სახით. ზოგიერთ შემთხვევაში ცილის ხსნარს უმატებენ ამონიუმის სულფატს მისი ნაჯერი ხსნარის სახით. ამას ის უპირატესობა აქვს, რომ ნაჯერი ხსნარის pH შეიძლება წინდაწინ მიყვანილ იქნეს საჭირო მნიშვნელობამდე.

ამონიუმის სულფატის სხვადასხვა რეაქტივები სხვადასხვა მკვლევარობით, ე. ი. pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობით ხასიათდებიან. ფრაქციონირების ნორმალური მიმდინარეობისათვის კი საჭიროა, რომ ფერმენტული ხსნარის pH ამონიუმის სულფატის დამატებისას მკვეთრად არ იცვლებოდეს. ამონიუმის სულფატის გარკვეული რაოდენობის დამატებისას წარმოიქმნება ნალექის გარკვეული რაოდენობა. რომელსაც აცილებენ ცენტრიფუგირებით, ხოლო ცილის და ნარჩენ ხსნარს კვლავ უმატებენ ამონიუმის სულფატის ახალ ულუფას. წარმოქმნილ ნალექს აცილებენ, სუპერნატანტს კი კვლავ უმატებენ ამონიუმის სულფატს, ე. ი. აწარმოებენ ფრაქციონირებას. მიღებულ ნალექს ხსნიან მცირე რაოდენობის წყალში ან ბუფერში და აღიალიზებენ ან ატარებენ სეფადექს G-25-ის სეეტზე ამონიუმის სულფატის მოცილების მიზნით. მხოლოდ ამის შემდეგ საზღვრავენ ნალექს ფრაქციაებში ფერმენტულ აქტივობას, რადგან ამონიუმის სულფატის მაღალი კონცენტრაციების დროს შეიძლება ფერმენტული აქტივობა საერთოდ არ გამოვლავლდეს. გახსნილი ნალექის წყლის წინააღმდეგ დიალიზის დროს ხშირად სადიალიზო პარკებში აღვიდა აქვს ცილის დალექვას, ხოლო ბუფერის წინააღმდეგ დიალიზისას კი არა. ეს აიხსნება იმ გარემოებით, რომ ბუფერის იონები აღსორბირდებიან რა ცილის მოლეკულებზე ქმნიან მის ზედაპირზე დამუხტულ შრეს, რომელიც იწვევს ცილის მოლეკულების ურთიერთ განზიდვას, რაც აძლიერებს ცილის ურთიერთქმედებას წყლის დიპოლებთან. სხვანაირად ეს ნიშნავს, რომ ცილა უფრო კარგად იხსნება ბუფერულ ხსარებში, ვიდრე წყალში.

ნალექები, რომლებიც წარმოიქმნებიან ამონიუმის სულფატით ცილების ფრაქციონირებისას, დაცენტრიფუგირებამდე ყოვნდებიან 0.5—1.0 სთ-ის განმავლობაში ნალექის სრული მომწიფებისათვის და ფრაქციების მკაფიო დაყოფისათვის.

დაცენტრიფუგირება შეიძლება შეიცვალოს გაფილტვრით, მაგრამ ეს მაშინ, როდესაც საქმე გვაქვს ღიდი რაოდენობის ნალექთან. მცირე რაოდენობის ნალექის გაფილტვრის დროს ცილის გარკვეული ნაწილი ფილტრზე იკარგება.

ხსნარში ამონიუმის სულფატის კონცენტრაციას ჩვეულებრივ გამოსახვენ ათწილადებით ან პროცენტებით. სრულ გაჯერებას შეესაბამება 1.0 და იგულისხმება, რომ ის გაჯერებულია 100%-ით. როგორც წესი, ფრაქციონირება ტარდება 0—4°C-ზე, მაგრამ 100%-იან გაჯერებაში იგულისხმება სრული გაჯერება ოთახის ტემპერატურაზე. მ. დიქსონსა და ე. უებს მოცემული აქვთ ნომოგრამა, რომელიც საშუალებას გვაძლევს გავითვალოთ ამონიუმის სულფატის

ის რაოდენობა, რომელიც საჭიროა დაემატოს 1 ლ ცილის ხსნარს, რომ მივიღოთ გაჯერების საჭირო პროცენტი. რაოდენობა ნაგულისხმებია ოთახის ტემპერატურისათვის. 0°C-ზე გარკვეული შესწორების შეტანა საჭირო. 0°C-ზე ფრაქციონირებისათვის საჭირო ამონიუმის სულფატის რაოდენობა, რომელიც უნდა დაემატოს 100 მლ ცილის ხსნარს, რომ მივიღოთ საჭირო გაჯერება, მოცემულია ცხრილ 4-ში. ცხრილი შედგენილია ზ. ბრონოვიცკაიასა და ვ. გორეტოვის მიერ.

ცხრილი 4

0°C-ზე ხსნარის 100 მლ-ზე დასამატებელი მშრალი ამონიუმის სულფატის რაოდენობა გრ.მე.ში.

საჭირო გაჯერება	საპრობო გაჯერება, %									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0	5,2	10,88	16,81	23,0	29,77	36,88	44,46	52,58	61,27	70,61
10	—	5,44	11,20	17,32	23,81	30,73	38,11	46,00	54,4	63,54
20	—	—	5,60	11,35	17,86	24,5	31,76	39,43	47,55	56,48
30	—	—	—	5,77	11,1	18,44	25,41	32,85	40,84	49,42
40	—	—	—	—	5,95	12,29	19,05	26,29	31,04	42,36
50	—	—	—	—	—	6,15	12,70	19,72	27,23	35,30
60	—	—	—	—	—	—	6,35	13,14	20,42	28,24
70	—	—	—	—	—	—	—	6,57	13,61	21,18
80	—	—	—	—	—	—	—	—	6,81	14,12
90	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7,06

აღსორბციული ქრომატოგრაფია

აღსორბციული ქრომატოგრაფია შედარებით ძველი მეთოდია. იგი დამუშავებულია აღსორბციის მოვლენებზე. განსაკუთრებით ხშირად იხმარება კალციუმის ფოსფატისა და ალუმინის ჰიდროქსიდის გელები. აღნიშნული აღსორბენტები ხასიათდებიან მაღალი აღსორბციული თვისებებით. აღსორბციული ქრომატოგრაფიის დროს განასხვავებენ ორ მოვლენას: 1. როდესაც ფერმენტული ხსნარიდან ხდება ფერმენტის აღსორბირება და 2. როდესაც ხდება ბალასტი ცილების აღსორბირება. უკანასკნელ შემთხვევაში ფერმენტი რჩება ხსნარში. ორივე გზით ვალწევთ ფერმენტის საკმაოდ მაღალი ხარისხით გაწმენდას. განსაკუთრებით კარგი შედეგები მიიღება, როდესაც შეხამებული იქნება ორივე მოვლენა. პრაქტიკულად ამას შემდეგნაირად ახორციელებენ. ფერმენტულ ხსნარს თავდაპირველად უმატებენ აღსორბენტს ისეთი რაოდენობით, რომ მან მოაზ-

ლინოს მხოლოდ ბალასტი ცილების აღსორბცია. ცენტრიფუგირებას შემდეგ დარჩენილ ხსნარს უმატებენ აღსორბენტის ახალ ულუფას და აწარმოებენ ფერმენტის აღსორბციას. იმ შემთხვევაში, თუ არ მოხდა ფერმენტის აღსორბცია, ხსნარს აცენტრიფუგირებენ და კვლავ უმატებენ აღსორბენტს. აღსორბირებული ფერმენტის ელუცია წარმოებს სუსტი ტუტე pH-ის მქონე ბუფერული სისტემით. რამდენადაც ცილები სხვადასხვა ძალებით არიან აღსორბირებული, ცხადია, რომ თვით ელუციის შედეგადაც ადგილი ექნება ფერმენტის დამატებით გაწმენდას. უნდა გვახსოვდეს, რომ მაელუირებელი ბუფერის მოცულობა არ უნდა იყოს დიდი, ყოველ შემთხვევაში არ უნდა აღემატებოდეს დაცენტრიფუგირებული გელის მოცულობას.

ფერმენტის მაქსიმალურად გაწმენდისათვის ფერმენტულ ხსნარს უმატებენ აღსორბენტის ისეთ რაოდენობას, რომ მან მოახდინოს ძირითადად ბალასტი ცილების აღსორბირება, ხოლო აღსორბირებული ფერმენტის რაოდენობა ამ დროს არ უნდა აღემატებოდეს 10%-ს. აღსორბენტის შემდეგი ულუფა ემატება ისეთი რაოდენობით, რომ მან მოახდინოს ფერმენტის აღსორბცია ისე, რომ ხსნარში დარჩეს ისევ 10% ფერმენტი. ასეთ შემთხვევაში მართალია ეკარგება (უფრო სწორად შეგნებულად ვკარგავთ) ფერმენტის გარკვეული რაოდენობა (20%), მაგრამ სამაგიეროდ ვალწევთ გაწმენდის მაღალ ხარისხს.

აღსორბციას, როგორც წესი, ატარებენ დაბალი იონური ძალის სუსტ მჟავე pH-ის მქონე (pH 5—6) ბუფერული სისტემებიდან. ცხადია, აღსორბციის ნორმალური მიმდინარეობისათვის აუცილებელია ფერმენტის ხსნარის წინასწარი დიალიზი ან გელფილტრაცია. აღსორბცია მიმდინარეობს სწრაფად, რამდენიმე წუთის განმავლობაში.

უნდა აღინიშნოს, რომ აღსორბციული ქრომატოგრაფიის მეოთხეში გამოყენებული აღსორბენტები, როგორც წესი, არ იხმარება სვეტში. მიუხედავად ამისა, სვეტის ქრომატოგრაფიაში დიდ გამოყენებას პოულობს კალციუმის ფოსფატის გელის საფუძველზე მიღებული აღსორბენტი ჰიდროქსილაპატიტი $[Ca_5(PO_4)_3OH]$, რომელიც ცნობილია „ბრუშიტის“ სახელწოდებითაც. ეს უკანასკნელი თავადება სვეტში რაიმე გრანულირებული მასალის გარეშე. ჰიდროქსილაპატიტი აშუშად ფართოდ გამოიყენება ფერმენტების გამოყოფისა და გაწმენდისათვის. ქვემოთ მოცემულია აღნიშნული აღსორბენტების მომზადების მეთოდიკები. ეს გელები, როგორც წესი, თვით ექსპერიმენტატორის მიერ მიიღება.

კალციუმის ფოსფატის გელის მომზადება

ქიმიურ ჰიქაში ათავსებენ 150 მლ კალციუმის ქლორიდის ხსნარს ($132 \text{ მგ } \text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 მლ-ში), ანზავებენ 1600 მლ-მდე (უმატებენ 1450 მლ გამოსდილ წყალს) და ენერგიული მორევის პირობებში (მექანიკური სარეველა) უმატებენ 150 მლ სამჰანაცვლებული ნატრიუმის ფოსფატის ხსნარს ($152 \text{ მგ } \text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ 1 მლ-ში). განზავებული ძმრის მქავით ხსნარის pH მიჰყავთ pH 7,4-მდე. წარმოქმნილ ნალექს 3—4-ჯერ რეცხენ დიდო რაოდენობის (15—20 ლ) გამოსდილი წყლით დეკანტაციის წესით. ამის შემდეგ სუსპენზიას აცენტრიფუგირებენ (5—10 წთ, 1000—2000 გ), ხსნარს გადაღვრიან, ნალექს ისევ უქეთებენ სუსპენდირებას გამოსდილი წყლით და კვლავ აცენტრიფუგირებენ. პროცედურას იმეორებენ 3—4-ჯერ. ამ გზით მიღებულ კალციუმის ფოსფატის ნალექს უმატებენ დიდი რაოდენობით გამოსდილ წყალს. გულდასმით ურევენ, გადაიტანენ მუქი მინის ჰურჰელში და აყოვნებენ რამდენიმე დღეს მაცივარში. შემდეგ ნალექზედა გამჰვირვალე სითხეს ღვრიან, მიღებულ გელს ინახავენ მაცივარში ფერად ჰურჰელში. ხმარების წინ გელს ურევენ, ერთგვაროვანი სუსპენზიის მისაღებად.

კალციუმის ფოსფატის გელის მშრალი წონის განსაზღვრა წარმოებს ჩვეულებრივი წესით, გარკვეული მოცულობა (0,5—1,0 მლ) სუსპენზიის მშრალ წონამდე დაყვანის გზით.

ალუმინის ჰიდროქსიდის გელის მომზადება

100 გ. ალუმინის სულფატს $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}]$ ენერგიული მორევის პირობებში (მექანიკური სარეველას დახმარებით) ხსნიან 1800 მლ გამოსდილ წყალში. მიღებულ ხსნარს, ასევე ენერგიული მორევის პირობებში, წრაფად უმატებენ 420 მლ ამონიაკის კონცენტრირებულ ხსნარს და შემდეგ 780 მლ გამოსდილ წყალს. მორევას აგრძელებენ კიდევ 5—10 წთ-ის განმავლობაში და აყოვნებენ 2 საათით ოთახის ტემპერატურაზე. ნალექზედა გამჰვირვალე სითხეს აცილებენ (ყველაფერი ეს კეთდება ამწოვ კარადაში). დარჩენილ სუსპენზიას აცენტრიფუგირებენ 2000 გ-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში. ნალექზედა სითხეს ღვრიან, ხოლო ნალექი სუსპენდირდება გამოსდილი წყლით და კვლავ ცენტრიფუგირდება. ნალექის გარეცხვას აწარმოებენ მანამ, სანამ ნალექზედა სითხის 100 მლ არ განეიტრალდება 0,1—0,2 მლ 0,1 N გოგირდმქავით (მეთილენის ლურჯის თანამყოფობისას). თუ ხსნარი მრავალჯერადი (8—10) გარეცხვის შემდეგ მაინც არ განეიტრალდება, საჭიროა გარეცხვის გაგრძელება.

ძლებს. ნალექის მრავალჯერადი რეცხვის შედეგად ხშირად შეინიშნება ნალექზედა სითხის ამღვრევა. ასეთ შემთხვევაში გატიტრის წინ აუცილებელია სითხის მაღალ ბრუნებზე დაცენტრიფუგირება (20000—30000 გ. 15—20 წთ). გარეცხილი ნალექი უდანაკარგოდ გადაიტანება 1500 მლ მოცულობის მქონე ქიმიურ ჰიქაში და გამოხდილი წყლით შეივსება 750 მლ-მდე, ფრთხილად ურევენ ერთგვაროვანი სუსპენზიის მიღებამდე და ათავსებენ მაღულარ წყლის აბაზანაში 4—5 სთ-ის განმავლობაში. შემდეგ აცივებენ ოთახის ტემპერატურაზე. სითხის ზედა ფენას ღვრიან, ისე, რომ მოცულობა დარჩეს 375 მლ-ის ტოლი. ამ გზით მიღებული გელი ნაზად არის გამოყენებისათვის. ხმარების წინ მას ურევენ, ერთგვაროვანი სუსპენზიის მიღებამდე.

კალციუმის ფოსფატისა და ალუმინის ჰიდროქსიდის ახლადმოზადებული გელები არამდგრადებია და რამდენიმე კვირის ან თვის შემდეგ განიცდიან ფიზიკური მდგომარეობის შეცვლას, დაძველებას. ხშირად ამჯობინებენ დაძველებულ გელებზე მუშაობას, თუმცა მათზე შედარებით ძნელად ხდება ცილების ადსორბირება და ელუირება.

მიდროქსილაპატიტის (ბრუშიტის) მომზადება

5 ლიტრიან ქიმიურ ჰიქაში მექანიკური სარეველათი მუდმივი მორევის პირობებში ერთდროულად და ერთნაირი სიჩქარით (15 მლ/წთ) ასხავენ ორ ლიტრ 0,5 M Na_2HPO_4 და 2,0 ლ 0,5 M CaCl_2 -ის ხსნარებს. ნალექზედა სითხეს ამოწოვენ, ხოლო ნალექს ოთხჯერადად რეცხავენ 3—3 ლიტრი გამოხდილი წყლით. შემდეგ ნალექს, რომელიც სუსპენდირებულია 3 ლიტრ გამოხდილ წყალში, უმატებენ 100 მლ 40%-იან NaOH და ადულებენ 1 სთ-ის განმავლობაში მორევის პირობებში. კარგი დალექვისათვის ხსნარს აყოვლებენ 5 წთ-ს რის შემდეგაც ნალექზედა სითხეს აცილებენ, ხოლო ნალექს 5 წთ-ის განმავლობაში ანჭლრევენ 4 ლიტრ წყალთან ერთად. ამ პროცედურას იმეორებენ სამჯერ. შემდეგ ნალექს უმატებენ 4 ლ 0,01 M ფოსფატის ბუფერს pH 6,8 და მუდმივი მორევის პირობებში აცხელებენ თითქმის დუღილამდე. ნალექს კვლავ აყოვნებენ 5 წთ და აცალბენ ნალექზედა სითხეს. ამ პროცედურას იმეორებენ ერთხელ 0,01 M და ორჯერ 0,001 M ფოსფატის ბუფერით 15 წთ-იანი დუღილის პირობებში. ამ გზით დამზადებული გელი 0,001 M ფოსფატის ბუფერში ინახება თითქმის ერთი წლის განმავლობაში.

არაორგანული მარილებითა და ორგანული გამხსნელებით ცილების ფრაქციონირება ხშირ შემთხვევაში არ იძლევა სრულ გაყოფას. მიზნის მიღწევისათვის მიმართავენ სხვა ხერხებს, რომელთაგან აღსანიშნავია იონცვლადი ქრომატოგრაფია. მეთოდი დამყარებულია ცილების ჯამურ მუხტებს შორის განსხვავებაზე და მდგომარეობს ცილებისა და იონცვლად ფისებს შორის იონთა ცვლაში.

სინთეზური იონცვლადი ფისები — პოლიმერებია, რომლებიც შეიცავენ მჟავურ (კატიონიტები) და ფუძე (ანიონიტები) ჯგუფებს.

ფერმენტებთან მუშაობისას ფართოდ გამოიყენებიან ცელულოზის საფუძველზე მიღებული ისეთი იონცვლადები, როგორიცაა: დიეთილამინოეთილ-ცელულოზა (დეაე-ცელულოზა) და კარბოქსიმეთილ-ცელულოზა (კმ-ცელულოზა). პირველი წარმოადგენს ანიონიტს, ე. ი. შეიცავს ფუძე თვისებების მქონე ჯგუფებს, მეორე კი კატიონიტს, ე. ი. შეიცავს მჟავური თვისებების მქონე ჯგუფებს.

როგორც დეაე- ისე კმ-ცელულოზა წარმოადგენენ ეთერებს, რომლებიც მიიღებიან ცელულოზის ჰიდროქსილის ჯგუფების ჰალოგენჩანაცვლებული ნაერთებით ეთერიფიკაციის რეაქციით. ცილის დამატებისას იონცვლადზე ხდება ცილის ადსორბცია ცილის და იონცვლადის ურთიერთსაწინააღმდეგო დამუხტული ჯგუფების ელექტროსტატიკური მიზიდულების ძალების საფუძველზე. თითოეული ცილის ადსორბციის ხარისხი დამოკიდებულია მისი მუხტის სიდიდეზე, რაც თავის მხრივ დამოკიდებულია ხსნარის pH-ზე და მარილის (ბუფერის) კონცენტრაციაზე. ცილების ელუირებისას ხდება იონცვლადიდან დესორბცია. დესორბცია ხორციელდება ორი გზით: მაელუირებელი ხსნარის pH-ის შეცვლით ან მისი იონური ძალის გადიდებით.

ანიონიტები (დეაე-ცელულოზა) გამოიყენება ე. წ. მჟავე ცილების (რომლებსაც გააჩნიათ ჯარბი კარბოქსილის არაიონიზირებული — COOH და N^+H_3 ჯგუფები) დასაყოფად. ასეთი ცილების ადსორბცია წარმოებს დაბალი იონური ძალის (დაბალი მოლარობის $0.005\text{--}0.01\text{M}$) მქონე ბუფერებიდან pH $7.5\text{--}8.5$ -ზე. კატიონიტებზე (კმ-ცელულოზა) ხდება ე. წ. ფუძე ცილების (რომლებსაც გააჩნიათ ჯარბი ამინო არაიონიზირებული NH_2 და COO^- ჯგუფები) დაყოფა. კატიონიტებზე ადსორბცია წარმოებს ასევე განზავებული ($0.005\text{--}0.01\text{M}$) ბუფერული ხსნარებიდან pH $4.5\text{--}6.5$ -ზე. იონცვლადის სვეტზე ცილის დამატებამდე აუცილებელია პრეპარატიდან არაორგანული მარილების (მაგალითად, ამონიუმის სულფატით ფრაქციონირების შემდეგ ჯარბი ამონიუმის სულფატის) მოცილება,

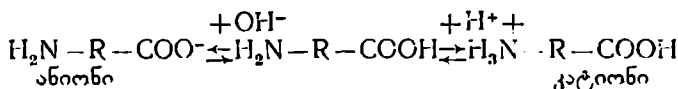
რაც დიალიზით ან G-25-ის სვეტზე გელფილტრაციით ხორციელდება. როდესაც ცილის ბუფერული ხსნარი დაიტანება იონცვლად სვეტზე ცილის დამუხტული ჯგუფები მიიზიდებიან იონცვლადის საწინააღმდეგოდ დამუხტული ჯგუფებისაკენ, ხოლო შემდეგ სხვა იონის (ე. ი. იმავე ნუტრის რაც ცილის მუხტია) დიდი კონცენტრაციით დამატებისას ხდება ამ იონით ცილის გამოძევება, ანუ დესორბცია. ცილის მოლეკულები ნაკლები ჯამური მუხტით შედარებით სუსტად ადსორბირდებიან იონცვლადებზე და ამიტომ ისინი უფრო ადრე გამოძევდებიან, მასთან მათეულირებელი იონის შედარებით ნაკლები კონცენტრაციის (იონური ძალის, მოლარობის) პირობებში. იმ ცილების დესორბციისათვის, რომლებიც ხასიათდებიან დიდი ჯამური მუხტით, საჭიროა მათეულირებელი იონების მაღალი კონცენტრაცია.

პრაქტიკულად ცილების შერჩევითი ფრაქციონირებისათვის საჭიროა ჩამნაცვლებელი იონის (მათეულირებელი ხსნარის იონების) კონცენტრაციების თანდათანობითი გაზრდა, ე. ი. საჭიროა შეიქმნას კონცენტრაციის გრადიენტი.

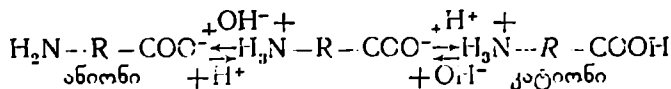
არჩევენ კონცენტრაციის უწყვეტ და წყვეტილ გრადიენტს. როდესაც ხდება დესორბცია, ე. ი. ცილის ელუირება სხვადასხვა მოლარობის ბუფერული ხსნარებით, ე. ი. როდესაც მათეულირებელი ხსნარის კონცენტრაცია ნახტომისებურად იზრდება, მაგალითად, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M და ა. შ. ადგილი აქვს საფეხურებრივ ფრაქციონირებას. როდესაც ელუირება ხდება მათეულირებელი ხსნარის კონცენტრაციის ნელი, თანდათანობითი გაზრდის საშუალებით, ადგილი აქვს ფრაქციონირებას უწყვეტი გრადიენტის მეთოდით. ამა თუ იმ მეთოდის გამოყენება ექსპერიმენტის საჭიროებისამებრ განისაზღვრება. უფრო ეფექტურ დაყოფას, რა თქმა უნდა, იძლევა უწყვეტი გრადიენტით ფრაქციონირების მეთოდი.

როგორც ვთქვით, ცილის ელუცია, ე. ი. დესორბცია შეიძლება განვახორციელოთ მათეულირებელი ხსნარის pII-ის შეცვლით. ამ შემთხვევაში ხდება მუხტის შეცვლა. მაგალითად, ანიონიტიდან (დეჟე-ელულოზა) ადსორბირებული ცილის ელუცია ხდება pH-ის შემცირებით, ხოლო კატიონიტიდან (კმ-ცელულოზა) პარიქით pH-ის გაზრდით. პირველ შემთხვევაში ხდება ცილის მუხტის ჯგუფების დისოციაციის შემცირება რასაც თან სდევს ცილასა და ანიონიტს შორის ბმის შესუსტება ან საერთოდ გაქრობა. მეორე შემთხვევაში კი ადგილი აქვს ფუძე ჯგუფის დისოციაციის შემცირებას, რის გამოც ცილასა და კატიონცვლადს შორის ბმა სუსტდება ან სრულიადაც ისპობა.

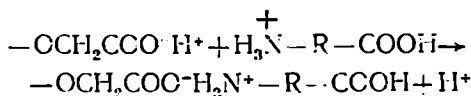
თუ როგორ ხდება იონცვლადზე ცილის ადსორბცია და დესორბცია, განვიხილოთ უფრო დეტალურად. ცნობილია, რომ ცილა (აღენიშნოთ იგი $\text{NH}_2\text{—R—COOH}$) მყავე და ტუტე არეში შემდეგნაირად დისოცირდება:



მაგრამ ცილა ყოველთვის გვხვდება დამუხტული მოლეკულის სახით. ამიტომ მყავე და ტუტე არეში გვექნება.

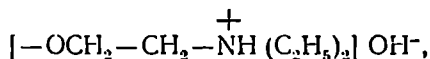


კატიონიტი (კმ-ცელულოზა) შეიცავს ფუნქციურ ჯგუფს — $\text{OCH}_2\text{CCO}^-\text{H}^+$ რომელიც დისოცირებულია მყავე არეში ($\text{pH} 4\text{—}6$). ცხადია, იგი მოახდენს ისეთი ცილის ადსორბირებას, რომელშიც მეტია ამინის და სხვა ფუძე თვისების მქონე ჯგუფები, ე. ი. ფუძე თვისების მქონე ცილის ადსორბირებას. კმ-ცელულოზაზე ცილა დაიტანება $\text{pH} 4\text{—}6$ -ის მქონე ბუფერით. ცხადია ფუძე თვისებების მქონე ცილა მყავე არეში გარდაიქმნება მყავე ცილად (კატიონალ — $\text{NH}_3^+\text{—R—COOH}$).



ე. ი. მოხდა კატიონების გაცვლა, ამიტომაც კმ-ცელულოზას უწოდებენ კატიონცვლადს. ცილას დესორბციისათვის pH -ით საჭიროა, როგორც ვთქვით. pH -ის გაზრდა. ამ დროს კლებულობს კმ-ცელულოზას ფუნქციური ჯგუფის დისოციაციის ხარისხი, რასაც მოსდევს ცილასა და კატიონიტს შორის ბმის შესუსტება.

ანიონიტი (დეაე-ცელულოზა) შეიცავს ფუნქციურ ჯგუფს — $\text{OCH}_2\text{—CH}_2\text{—N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, რომელიც გადაყავთ OH^- ფორმაში (ამუშავებენ 1%-იანი NaOH). შედეგად მიიღება



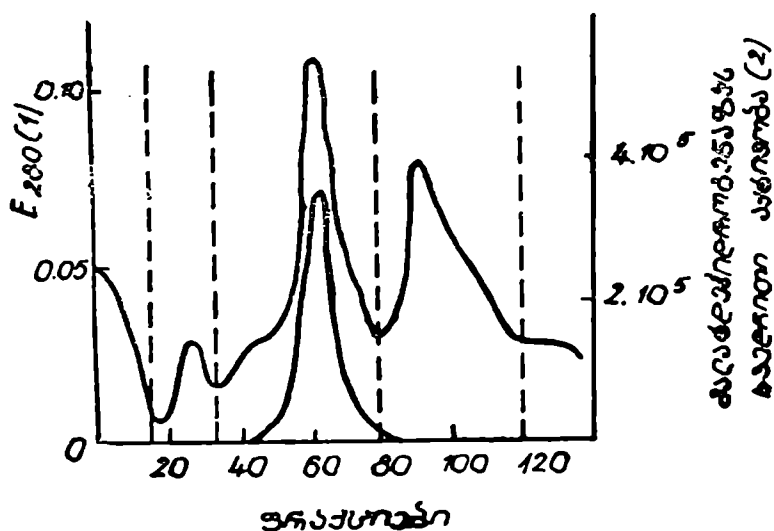
ასეთ ფორმაში ანიონიტი უპირატესად იკავშირებს მყავე ცილას, ე. ი. ისეთ ცილას, რომელშიც მეტია თავისუფალი კარ-

ბოქსილის COOH და NH_3^+ ჯგუფები. დეაე-ცელულოზაზე ცილა დაიტანება $\text{pH } 7,5-8,5$ -ის მქონე ბუფერით, რის გამოც იგი გარდაიქმნება ფუძე ცილად—ანიონად ($\text{NH}_2-\text{R}-\text{CCO}^-$)

$-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2^-\text{COC}-\text{R}-\text{NH}_2$ (გამოიყოფა H_2O)

ე. ი. მოხდა ანიონების გაცვლა, ამიტომაც დეაე-ცელულოზას ანიონცვლადი ეწოდება. ცილის დესორბციისათვის ამ შემთხვევაში აქტირებენ pH -ს. ამ დროს კლებულობს ანიონიტის ფუნქციური ჯგუფის დისოციაციის ხარისხი.

სპეციალური ავტომატური კოლექტორების საშუალებით ხდება კლურიებული ცილის გარკვეული რაოდენობებით (2—3 მლ) შეგროვება და მათში ცილისა და ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა. მონაცემები გამოისახება გრაფიკულად, რისთვისაც აბსცისთა ღერძზე გადაზომავენ ფრაქციების რიცხვს ან ცილის მოცულობას მლ-ში, ხოლო ორდინატის ღერძზე თითოეულ ფრაქციაში ცილის რაოდენობას და ფერმენტის აქტივობას (ნებისმიერ ერთეულებში) (სურ. 48).



სურ. 48. ცილისა (1) და მალტდეჰიდროგენაზის (2) საფეხურებრივი ელუციის პროფილი დეაე-ცელულოზის სვეტიდან.

უკანასკნელ ხანებში სულ უფრო ფართო გავრცელებას პოულობს ე. წ. აფინური პრომატოგრაფიის მეთოდი, რომლის არსი შემდეგში მდგომარეობს: სვეტი ივსება ისეთი პოლიმერული მასალით, რომელზეც წარმოებს მხოლოდ გარკვეული ფერმენტის სორბცია, დანარჩენი ცილები სვეტზე არ ადსორბირდებიან. მაღალი იონური ძალის ბუფერით ელუციის შედეგად მიიღება ფრაქცია, რომელიც შეიცავს მაღალი ხარისხით გასუფთავებულ საჭირო ფერმენტს.

მაგალითისათვის შეიძლება მოყვანილი იქნას E. coli-ის კულტურიდან აფინური პრომატოგრაფიის მეთოდით L-ასპარაგინაზის გაწენდა. აღნიშნული მეთოდით ამ ფერმენტის გასუფთავება 20—25-ჯერ უფრო ეფექტურია გაწმენდის სხვა დანარჩენ არსებულ მეთოდებთან შედარებით. აქვე უნდა ითქვას, რომ ფერმენტი L-ასპარაგინაზა მეტად ეფექტური საშუალება გამოდგა კიბოს ზოგიერთი ფორმების წინააღმდეგ ბრძოლაში, ამიტომ ამ ფერმენტის სუფთა სახით მიღებას დიდი ყურადღება ექცევა.

ბიოსპეციფიკურ პრომატოგრაფიას საფუძვლად უდევს გარკვეული ფერმენტის ინჰიბიტორის რომელიმე უსხნად პოლიმერთან ქიმიურად დაკავშირება (ყველაზე ხშირად ამ მიზნებისათვის იყენებენ აგაროზას); ინჰიბიტორით მოდიფიცირებული პოლიმერით ივსება სპეციალური სვეტი და ამ სვეტში ტარდება ფერმენტებისა და სხვა ცილების ექსტრაქტები. როგორც აღმოჩნდა, მთელი რიგი ფერმენტები პოლიმერთან დაკავშირებულ სპეციფიკურ ინჰიბიტორს საკმაოდ ეფექტურად უკავშირდებიან. დანარჩენი ცილები კი სვეტში არსებულ პოლიმერზე სორბციას არ განიცდიან და დატანილ ხსნართან ერთად გამოდიან. ამის შემდეგ საელუციო ხსნარის იონური ძალი იზრდება იქამდე, რომ აღემატებოდეს ფერმენტის და ინჰიბიტორის შეკავშირების ძალის დონეს. ამ პირობებში ფერმენტი შორდება ინჰიბიტორს და გამოდის სვეტიდან მაღალხარისხოვნად გასუფთავებული ცილის ფრაქციის სახით.

ზოგიერთი ფერმენტის შემთხვევაში შესაძლებელია ინჰიბიტორის ნაცვლად ისეთი ლიგანდების გამოყენება, როგორიცაა სუბსტრატი. ბაქტერიებიდან გამოყოფილი L-ტრეონინდეჰიდრატაზა დაყოფილი იქნა ორ ფრაქციად. ისინი სვეტიდან ელუირდებოდნენ განსხვავებული იონური ძალის ბუფერით. სვეტი შეიცავდა ცელულოზასთან კოვალენტური ბმით დაკავშირებულ ამ ფერმენტის სუბსტრატს.

ბიოსპეციფიკური პრომატოგრაფიის მეთოდი ეფექტურობითა

და ანალიზის ჩატარების სიმარტივით გაცილებით აღემატება ყველა იმ ცნობილ მეთოდს, რომელიც ფერმენტების გაწმენდის მიზნით გამოიყენება.

მიღებულია მონაცემები, რომ აფინური ქრომატოგრაფია მიმდინარეობს ფერმენტების აქტიური ცენტრების მონაწილეობით. ეს იმ ფაქტიდან ძტკიცდება, რომ როგორც წესი, ინჰიბიტორიან პოლიმერზე სორბირებულ ფერმენტს არ გააჩნია აქტივობა ე. ი. ფერმენტი აქტიური ცენტრით უკავშირდება ინჰიბიტორს და კარგავს კატალიზის უნარს. ფერმენტის დესორბციის შემდეგ აქტივობა 100%-ით აღდგება. ზოგიერთი ლაბილური ფერმენტის შემთხვევაში მზარდი იონური ძალის, ან მკავე ბუფერული სისტემების ნაცვლად ამკობინებენ ისეთ მაელურიებელ სისტემებს, რომლებიც შეიცავენ კონკურენციის თვალსაზრისით უფრო აქტიურ ინჰიბიტორებს და ფერმენტების დესორბცია წარმოებს კონკურენტული ინჰიბიტორების პრინციპით. აღმოჩნდა, რომ ამ მეთოდით გასუფთავებული ფერმენტები უკეთ ინარჩუნებენ ნატიურ მდგომარეობას.

დღეისათვის ცნობილია რამდენიმე ათეული ფერმენტი, რომლებიც ბიოსპეციფიკური ქრომატოგრაფიის მეთოდით მიღებულია მაღალი სისუფთავის მდგომარეობაში. ესენია L-ასპარაგინაზა, მგალაქტოზიდაზა. კარბოქსიპეპტიდაზა, რიბონუკლეაზა, ტრიპსინი, ქიმოტრიპსინი და სხვა. ამ შემთხვევაში მატარებლად იყენებენ ბიოქიმიურ კვლევაში ისეთ ცნობილ პოლიმერებს, როგორიცაა აგაროზა, ბიოგელი, ცელულოზა და მისი წარმოებულები, მალეინის ანჰიდრიდისა და ეთილენის თანაპოლიმერი, ხოლო მათზე დამაგრებულ სპეციფიკურ ლიგანდებად ინჰიბიტორებს, ან სხვა დაბალმოლეკულურ ნაერთებს.

ბიოსპეციფიკური ანუ აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდი სულ უფრო და უფრო ფართო გამოყენებას პოულობს ენზიმოლოგიაში. ამ მეთოდით დამუშავებულია ცალკეული ფერმენტების პრეპარატიული მიღება (შესაბამისი რეგენერაციის შემდეგ შეიძლება სვეტის ხელახალი გამოყენება). ასე მაგალითად, ადამიანის სისხლის პლაზმინოგენის გასუფთავება აგაროზაზე კოვალენტურად მიბმული ლიზინის საშუალებით წარმოებს. აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდით შესაძლებელია არა მარტო ინდივიდუალური ფერმენტის გასუფთავება, არამედ მთელი ცალკეული ფერმენტული კომპლექსების გამოყოფაც შესაბამისი ლიგანდების შერჩევით. მეტად ეფექტური გამოდგა ეს მეთოდი ფერმენტების თვისებების შესასწავლად. სვეტები, რომლებიც სპეციფიკური აღსორბენტებითაა შევსებული,

საშუალებას იძლევიან შევისწავლოთ ფერმენტისა და სუბსტრატის, ფერმენტისა და ინჰიბიტორების და სხვადასხვა კოფაქტორების ურთიერთქმედების ინტიმური მექანიზმები.

ბიოსპეციფიკური ქრომატოგრაფიის მეთოდი შედარებით ახალია და, მიუხედავად მიღწეული წარმატებებისა, ჯერ-ჯერობით ამ მეთოდის ყველა შესაძლებლობანი, რა თქმა უნდა, არ არის ამოწურული.

დისკ-ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გელში

ეს არის ცილების დაყოფის მეთოდი, რომელიც აგრეთვე ცილების მუხტებს შორის განსხვავებაზეა დამყარებული. იგი ამჟამად ფართოდ გამოიყენება თანამედროვე ენზიმოლოგიაში მრავალი ამოცანის გადასაწყვეტად, როგორცაა ფერმენტების გაყოფა, მათი პრეპარატიული მოღება, ჰომოგენობის დადგენა, მეოთხეული სტრუქტურისა და მოლეკულური მასების შესწავლა და ა. შ.

ჩვეულებრივ ელექტროფორეზის ქვეშ იგულისხმება ელექტრული ველის გავლენით ხსნარში დამუხტული ნაწილაკების მოძრაობა. ნაწილაკის ძვრადობაზე გავლენა აქვს ბუფერული ხსნარის pH-ს, იონურ ძალას, ტემპერატურას და სხვა.

ტერმინი „დისკ-ელექტროფორეზი“ წარმოდგება ინგლისური სიტყვიდან discontinuous-რაც წყვეტილს ნიშნავს. დისკ-ელექტროფორეზში გამოიყენება არაერთგვაროვანი (წყვეტილი) გამყოფი საბტემა, რომლის ძირითადი კომპონენტია პოლიაკრილამიდის გელი. ეს გელი პირველად გამოიყენა რაიმონდმა 1959 წელს. დისკ-ელექტროფორეზში გამოიყენება სხვადასხვა შედგენილობისა და pH-ის მქონე ორი ბუფერული სისტემა. თვით მყარი ფაზა შედგება ორი გელისაგან, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან ფორების ზომით. ზედა, მსხვილფორიან გელში ხდება ცილების კონცენტრირება და, თუ შეიძლება ასე ითქვას, სტარტზე ერთდროული გასვლა, რასაც დიდი მნიშვნელობა აქვს ქვედა გელში ცილების მკაფიო დაყოფისათვის. ქვედა, წვრილფორიან გელში ხდება ცილების დაყოფა. ამიტომ მას დამყოფ გელს უწოდებენ. აქ ცილები იყოფიან მოლეკულების სიდიდის, ფორმისა და მუხტის მიხედვით.

ამგვარად, დისკ-ელექტროფორეზით პოლიაკრილამიდის გელში ცილების დაყოფა დამყარებულია ორი ეფექტის — კონცენტრირებისა და მოლეკულური საცრის შეხამებაზე.

ცნობილია, რომ გელები ხასიათდებიან დიდი სიბლანტით და, აქედან გამომდინარე, ხახუნის მაღალი წინააღმდეგობით. სწორედ

ამ თვისებით ახსნება პოლიაკრილამიდის გელში ელექტროფორეზის დიდი ეფექტიანობა. გელში მოძრაობისას სხვადასხვა ზომის ნაწილაკები განიცდიან ხახუნის სხვადასხვა წინააღმდეგობას და, ე. ი. დაყოფა დამოკიდებულია არა მარტო მუხტზე, არამედ ზომასა და ფორმაზე.

დისკ-ელექტროფორეზს პოლიაკრილამიდის გელში, სხვა გელებთან, მაგალითად, სახამებლის გელთან შედარებით, ის უპირატესობა გააჩნია, რომ პოლიაკრილამიდის გელის ხარისხი არაა დამოკიდებული ობიექტზე, რადგან ის სინთეზური პოლიმერია, სახამებელს კი ღებულობენ ბუნებრივი წყაროდან და ამიტომ ის ყოველთვის სხვადასხვა თვისებისაა. გარდა ამისა პოლიაკრილამიდის გელი შეიძლება გამოყენებული იქნეს კონცენტრაციების დიდ საზღვრებში (2-დან 30%-მდე) გამკვირვალობისა და ელასტიურობის დაკარგვის გარეშე.

მოლეკულური საცრის (მოლეკულური საცრები ეს ისეთი ფოროვანი ადსორბენტებია, რომელთა ფორების სიდიდე მოლეკულებს ზომებს უახლოვდება) ეფექტი განსაკუთრებით ცხადად მჟღავნდება მაშინ, როდესაც ხდება ერთნაირი სადიდის მუხტის მქონე, მაგრამ განსხვავებული ზომის ცილების დაყოფა. ასეთი ცილები ცხადია არ დაიყოფიან ე. წ. თავისუფალი ელექტროფორეზის დროს.

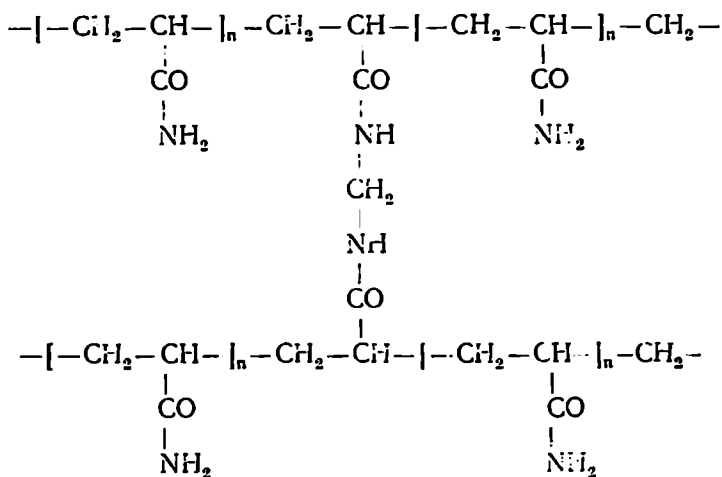
დისკ-ელექტროფორეზის დროს სარგებლობენ მინის პატარა მილებით (დიამეტრი 5 მმ, სიგრძე 8—15 სმ). ელექტროფორეზის მოწყობილობაში შედის აგრეთვე ელექტროდები (ნახშირის ან უმჯობესია პლატინის), დენის გამმართველი, ქვედა და ზედა ჭურჭლები ბუფერული ხსნარებისათვის. იონები, რომლებიც მოძრაობენ ერთი გარკვეული მიმართულებით და რომლებსაც, თუ შეიძლება ასე ითქვას, მიყავთ ცილის დამუხტული მოლეკულები, იყოფიან წამყვან და ჩამკეტ იონებად. ცილის დამუხტული მოლეკულები მოთავსებული არიან წამყვან და ჩამკეტ იონებს შორის და როდესაც ცილის ზონა მიაღწევს მაკონცენტრირებელი და დამყოფი გელების საზღვარს, ის წააწყდება უწყვეტობის ორმაგ დარღვევას. საქმე იმაშია, რომ დამყოფი გელის pH და ფორების სიდიდეები განსხვავდებიან მაკონცენტრირებელი გელის pH და ფორების სიდიდეებისაგან (ზედა გელის pH, როგორც წესი, ნაკლებია, ფორები კი უფრო მსხვილი). ცილების დამყოფ გელში შესვლისთანავე იწყება მათი დაყოფა, როგორც ვთქვით, მუხტის, ფორმისა და ზომის მიხედვით.

პოლიაკრილამიდის წვრილფოროვანი გელის კონცენტრაციის

გაზრდასთან ერთად ცილების შესვლა გელში ძნელდება, რადგან ამ დროს მცირდება ფორების დიამეტრი, ამიტომ ასეთ შემთხვევაში მოხდება იმ ცილების დაყოფა, რომლებიც ვერ იყოფოდნენ, ან ცუდად იყოფოდნენ შედარებით დაბალი კონცენტრაციის გელის შემთხვევაში.

ფორის სიდიდე განისაზღვრება აკრილამიდის პოლიმერიზაციისა და კავშირების რაოდენობის მიხედვით. ნაჩვენებია, რომ 7,5%-იან პოლიაკრილამიდის გელში ფორების საშუალო დიამეტრი უდრის $50 \text{ \AA}$, ხოლო 30%-იანში კი $20 \text{ \AA}$. ე.ი. გელის კონცენტრაციის შერჩევით შეიძლება სასურველი სიდიდის ფორების მქონე გელის მიღება.

პოლიაკრილამიდის გელის მისაღებად საჭიროა აკრილამიდი $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ და რომელიმე პოლიმერიზაციის გამომწვევი აგენტი, უფრო ხშირად $\text{N,N}'$ -მეთილენბისაკრილამიდი $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. ამ ორი ნაერთის დაკავშირების შედეგად, რისთვისაც კატალიზატორია საჭირო (მაგალითად, ამონიუმის პერსულფატი $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), მიიღება სამგანზომილებიანი სივრცითი ბადისებრი სტრუქტურა



მიღებული გელის სიბლანტე, ელასტიურობა და სიმტკიცე დამოკიდებულია როგორც პოლიმერიზაციის ხარისხზე, ე. ი. პოლიაკრილამიდის ჯაჭვის სიგრძეზე, ისე კავშირების, ე. ი. ჩართული $\text{N,N}'$ -მეთილენბისაკრილამიდის რაოდენობაზეც.

პოლიაკრილამიდის გელში დისკ-ელექტროფორეზის მეთოდით ცილების დაყოფა ხდება როგორც მჟავე ბუფერულ სისტემებში (pH 4,3), ისე ფუძე სისტემებში (pH—8,9).

ფუძებუფერული სისტემა ძირითადად გამოიყენება ნუკლეინის მჟავებზე და მჟავე თვისებების მქონე ცილებზე ანალიზების ჩასატარებლად, ხოლო მჟავებუფერული სისტემა ფუძეთვისებების მქონე ცილებზე მუშაობის დროს.

გელების მოსამზადებელ ძირითად ხსნარებს ინახავენ მაცივარში. შეფერილ ჭურჭელში არაუმეტეს ორი თვის განმავლობაში.

ფუძებუფერული სისტემის (pH—8,9) და 7%-იანი გელების მოსამზადებელი ძირითადი ხსნარებია:

1. 1 N NaCl—48 მლ

ტრისი — 36,6 გ

ტეტრამეტილენდიამინი — 0,23 მლ (ემატება ამწოვ კარადაში) შეივსება წყლით 100 მლ-მდე. pH უნდა იყოს 8,9.

2. 1 M H_3PO_4 —25,6 მლ

ტრისი — 5,7 გ

ტეტრამეტილენდიამინი — 0,23 მლ (ემატება ამწოვ კარადაში) შეივსება წყლით 100 მლ-მდე. pH უნდა იყოს 6,7

3. N,N'-მეთილენბისაკრილამიდი — 0,8 გ (ჯერ ეს იხსნება!)

აკრილამიდი — 28,0 გ

შეივსება წყლით 100 მლ-მდე.

4. N,N'-მეთილენბისაკრილამიდი — 2,5 გ (ჯერ ეს იხსნება!)

აკრილამიდი — 10,0 გ

შეივსება წყლით 100 მლ-მდე

5. რიბოფლავინი — 4,0 მგ შეივსება 100 მლ-მდე (მზადდება უშუალოდ ხმარების წინ)

6. $(NH_4)_2S_2O_8$ — 140 მგ —100 მლ-მდე

7. საქაროზა 40,0 გ 100 მლ-მდე, რომელსაც ემატება რამდენიმე წვეთი ბრომფენოლ ლურჯი

საპოლიმერიზაციო მილებში (მილები სპეციალურ სადგამზე მაგრდება ვერტიკალურ მდგომარეობაში) ქვედა წვრილფორიანი გელის მოსამზადებლად დაიტანება 1,4 მლ სამუშაო ხსნარი, რომელიც მზადდება შემდეგნაირად:

ხსნარი 1 — 1 მოცულობა

ხსნარი 3—2 მოცულობა

ხსნარი 6—4 მოცულობა

გამოხდილი წყალი — 1 მოცულობა

ნარევის საბოლოო $pH=8,9$

ხსნარის დატანა ხდება ფრთხილად რათა არ წარმოიქმნას ჰაერის ბუშტუკები; ზევიდან დაეფინება გამოხდილი წყალი, რათა გელის ზედაპირი იყოს სწორი და, რაც მთავარია, გამოირიცხოს იქნას ჟანგბადის შეღწევა, რაც ხელს უშლის გელის პოლიმერიზაციას. პოლიმერიზაცია მთავრდება 30—40 წთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. პოლიმერიზაციის დამთავრებაზე მეტყველებს გელისა და დაფენილ წყალს შორის მკვეთრი საზღვრის გაჩენა და მიღების სუბტი გათბობა. ამის შემდეგ წყალს ფრთხილად ამოაშრობენ ფილტრის ქაღალდით და დააქვთ ზედა მსხვილფორიანი გელის მონომერი 0.25 მლ-ის რაოდენობით, რომელიც შემდეგნაირად მზადდება:

ხსნარი 2—1 მოცულობა

ხსნარი 4—2 მოცულობა

ხსნარი 5—1 მოცულობა

გამოხდილი წყალი — 4 მოცულობა

ნარევის საბოლოო $pH=6,7$.

ეს ნარევიც დაიტანება ფრთხილად და ისევ დაეფინება გამოხდილი წყალი.

პოლიმერიზაცია ტარდება 30 წთ-ის განმავლობაში ულტრა-იისფერი ნათურის ქვეშ. ფოტოპოლიმერიზაციის დამთავრებისას ზედა გელი ღებულობს მოთეთრო რძის ფერს. ამის შემდეგ წყალს ისევ აცლიან ფილტრის ქაღალდით და გადააქვთ ჯერ საჭაროზის 40%-იანი შეფერილი ხსნარი, შემდეგ კი საცდელი ნიმუში 0.1—0.2 მლ-ის რაოდენობით (იმ ანგარიშით, რომ თითოეული საპოლიმერიზაციო მილში შეტანილ იქნეს ცილა 200—250 მკგ-ის რაოდენობით). მილის დარჩენილ ნაწილს ძალიან ფრთხილად ავსებენ ელექტროდული ბუფერით, რომელიც შემდეგნაირად მზადდება:

ტრისი — 1,2, გ

გლიცინი — 5,76 გ

შეივსება გამოხდილი წყლით ორ ლიტრამდე, $pH=8,3$.

შევეთ ბუფერული სისტემის ($pH 4,3$) და 15%-იანი გელების მოსამზადებელი ძირითადი ხსნარებია:

1. 1 N AOH — 48,0 მლ

ყინულოვანი ძმარმევა — 17,2 მლ

ტეტრაჰეთილენდიამინი — 4,0 მლ (ემატება ამწოვ კარადაში)
შეივსება გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე

2. 1 N KOH — 48,0 მლ

ყინულოვანი ძმარჟავა — 2,87 მლ.

ტეტრაჰეთილენდიამინი — 0,46 მლ (ემატება ამწოვ კარადაში)
შეივსება გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე

3. აკრილამიდი — 60,0 გ

N.N'—მეთილენბისაკრილამიდი — 0,4 გ (ჯერ ეს იხსნება!)

შეივსება გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე

4. აკრილამიდი — 10,0 გ

N.N'—მეთილენბისაკრილამიდი — 2,5 გ (ჯერ ეს იხსნება!)

შეივსება გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე

5. რიბოფლავინი — 4,0 მგ (მზადდება უშუალოდ ხმარების წინ)

შეივსება გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე

6. საქაროზა — 40,0 გ

შეივსება გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე

7. ამონიუმის პერსულფატი — 0,28 გ

შეივსება გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე

ამ ძირითადი ხსნარებიდან ქვედა წვრილფორიანი გელების პო-
ლიმერიზაციისათვის სამუშაო ხსნარი მზადდება შემდეგნაირად:

ხსნარი 1—1 მოცულობა

ხსნარი 3—2 მოცულობა

ხსნარი 7—4 მოცულობა

გამოხდილი წყალი — 1 მოცულობა

ნარევის საბოლოო pH=4,3

დაიტანება ისევე და იმავე რაოდენობით, როგორც ფუძე ბუ-
ფერული სისტემის შემთხვევაში.

ზედა მსხვილფორიანი გელების დასაპოლიმერიზებელი სამუ-
შაო ხსნარი ასეთნაირად მზადდება;

ხსნარი 2—1 მოცულობა

ხსნარი 4—2 მოცულობა

ხსნარი 5—1 მოცულობა

ხსნარი 6—4 მოცულობა

ნარევის საბოლოო pH=6,8

ელექტროდული ბუფერი კი მზადდება შემდეგნაირად:

ბ—ალანინი—31,2 გ

ყინულოვანი ძმარჟავა — 8,0 მლ

შეივსება გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე, pH=4,5.

ხმარების წინ უნდა განზავდეს 10-ჯერ.

მიღებს ამაგრებენ ელექტროფორეზის აპარატის ზედა რე-
ზერვუარში, რომელშიც ფრთხილად ასხამენ ელექტროდულ ბუფერს
იკეთნაირად, რომ მილის ბოლოები დაფარული იყოს ბუფერით და
უერთებენ იმავე ბუფერით ავსებულ ქვედა რეზერვუარს. თუ ამ
დროს საპოლიმერიზაციო მილების ბოლოს წარმოიქმნა ჰაერის
ბუშტუკები საჭიროა მათი გამოდევნა ფრთხილად, ვინაიდან ისი-
ნი ხელს უშლიან დენის გატარებას.

ზედა და ქვედა რეზერვუარებში ჩამაგრებულია ელექტრო-
დები, რომლებსაც უერთებენ დენის გამმართველს. მიერთებისას
მსგედველობაში უნდა ვიქონიოთ საცდელი ცილების იზოელექტრუ-
ლი წერტილები. თუ ცილის იზოელექტრული წერტილი უფრო და-
ბალია, ვიდრე ბუფერული სისტემის pH, მაშინ ცილები გადაადგი-
ლდებიან კათოდიდან ანოდისაკენ, ხოლო თუ ცილას იზოელექტ-
რული წერტილი უფრო მაღალია, ცილები გადაადგილდებიან ანო-
დიდან კათოდისაკენ.

მოდებული დენის სიდიდე პირველი ნახევარი საათის განმავ-
ლობაში ერთ მილზე ტოლი უნდა იყოს 2—2,5. შემდეგ კი 5,0 მილი-
ამპერისა ელექტროფორეზი ტარდება ცივ პირობებში (0—4°C).

ელექტროფორეზის დამთავრებას ვიგებთ საქაროზის შეფერი-
ლი ზოლის მიხედვით. ელექტროფორეზი დამთავრებულად ჩაითვ-
ლება მაშინ, როდესაც საქაროზის შეფერილ ზოლს გელის ბოლომ-
დე გასასვლელად დარჩება 3—5 მმ მანძილი. დამთავრების შემ-
დეგ საპოლიმერიზაციო მილებიდან გელების გამოღებისათვის
ფრთხილად, შპრიცის საშუალებით შეგვყავს გამოხდილი წყალი
გელის ზედაპირსა და მილის კედელს შორის. გელების გამოღება
ხდება ასევე ცივ პირობებში.

გელებს, იმისდამხედვით, ამელავენებენ ცილაზე თუ ფერმენ-
ტულ აქტივობაზე, ათავსებენ შესაბამის საინკუბაციო ხსნარში.

ცილებზე გამელავენების შემთხვევაში გელებს ცილების დაფიქ-
სირების მიზნით 20 წუთის განმავლობაში ათავსებენ 5—10%-იან
სამქლორძმარმეაში და ამის შემდეგ ღებავენ სპეციალური საღება-
ვებით (კუმასი ლურჯით ან ამიდოშავით).

შეღებვის ხანგრძლივობა დამოკიდებულია გელის სიდიდეზე
(სიგრძესა და სიგანეზე); მის კონცენტრაციაზე, აგრეთვე ცილის
რაოდენობაზე და მის მოლეკულურ მასაზე. ჩვეულებრივ, შეღებ-
ვისათვის საკმარისია 0,5—2,0 საათი.

ამ გზით შეღებილ გელში ჯერ არ ჩანს ცილების შეფერილი
ზოლები, რადგან თვით გელიც მთლიანად შეღებილია. საჭიროა გე-
ლის გაუფერულება, ე. ი. ჰარბი საღებავის მოცილება. გაუფერუ-

ლებისათვის იყენებენ 7—10%-იან ძმარმჟავას. გელის გაუფერულების შემდეგ ჩნდება ცილის შეფერილი ზოლები. აქ სითრთხილეა საჭირო, რათა ცილის სუსტად შეფერილი ზოლები არ გამოირეცხოს.

ფერმენტულ აქტივობაზე გამჟღავნების შემთხვევაში, ელექტროფორეზის დამთავრების შემდეგ ამოღებულ გელებს რეცხავენ ცოტა წყალში ან ნეიტრალურ pH-ის მქონე ბუფერში და ათავსებენ სპეციალურ სარეაქციო ხსნარში, რომელიც შეიცავს ამ ფერმენტის სუბსტრატს. ფერმენტის არსებობაზე მსჯელობენ იმ სპეციფიკური შეფერილი ზოლების წარმოქმნის საფუძველზე, რაც ამ ფერმენტისათვისაა დამახასიათებელი. შეფერილი ზოლები წარმოიქმნებიან გელის იმ ადგილებში, სადაც ეს ფერმენტია ლოკალიზებული. სათანადო საკონტროლო ცდების დაყენება აუცილებელია. ფერმენტის გამომჟღავნება შეიძლება სხვაგვარადაც. გელს მილიდან ამოღების შემდეგ კრიან გარკვეული ზომის ნაჭრებად. აწარმოებენ ჰომოგენიზაციას და მიღებულ ექსტრაქტებში საზღვრავენ ფერმენტულ აქტივობას. ხშირად გელს შუაზე კრიან ღოღოლ სიგრძეზე — ერთ ნახევარს ამჟღავნებენ ფერმენტულ აქტივობაზე, მეორე ნახევრიდან კი ამოჭრიან აქტივობის შესაბამის უბანს, აწარმოებენ ჰომოგენიზაციას და საზღვრავენ მასში ფერმენტულ აქტივობას, მაგრამ უკვე სხვა მეთოდით, მაგალითად, დეჰიდროგენაზების შემთხვევაში — სპექტროფოტომეტრული მეთოდით. პრაქტიკულად სასურველია ფერმენტის არსებობა-არარსებობის დასამტკიცებლად ამ ორივე მეთოდის ერთდროული გამოყენება.

როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, ელექტროფორეზის მეთოდით შეიძლება ცილის, ფერმენტის ჰომოგენობისა და მოლეკულური მასის განსაზღვრა. განვიხილოთ თითოეული მათგანის არსი. თუ ცილა გაწმენდის შედეგად მიღებულია ჰომოგენური მდგომარეობაში, მაშინ მან ელექტროფორეზის შედეგად უნდა მოგვცეს ცილის ერთი ზოლი და აქტივობის ერთი ხაზი, თუ ეს ცილა ფერმენტია. თუ ცილა არაჰომოგენურია მიიღება არა ერთი, არამედ რამდენიმე ცილის ხაზი. თუ აქტივობაზე გამჟღავნების შემთხვევაში მიიღება რამდენიმე აქტიური, შეფერილი ზოლი, ეს უნდა ნიშნავდეს იმას, რომ პრეპარატი შეიცავს იზოფერმენტებს. თუ ფერმენტი გაწმენდის შედეგად მიღებულია სუფთა, ჰომოგენური სახით, მაშინ მან ცილაზე გამჟღავნებისას უნდა მოგვცეს მხოლოდ და მხოლოდ ერთი ცილის ზოლი.

ბოლო ხანებში დადგენილ იქნა, რომ ცილების ელექტროფორეზულ ძვრადობასა (რომელიც განისაზღვრება ცილის მიერ განვლილი მანძილის შეფარდებით ფრონტის მიერ განვლილ მანძილ-

თან) და მათ მოლეკულურ მასებს შორის არსებობს გარკვეული დამოკიდებულება. შესაბამისი საკალიბრო მრუდის აგების შემდეგ (საკალიბრო მრუდი აიგება ცნობილი მოლეკულური მასის მქონე ცილებისათვის) შესაძლებელია განისაზღვროს უცნობი ცილის მოლეკულური მასა. ამჟამად ამ მეთოდით მოლეკულური მასის დადგენა ფართოდაა გავრცელებული.

იზოელექტრული ფოკუსირება

იზოელექტრული ფოკუსირება ახალი მეთოდია, რომელიც საშუალებას იძლევა გაზარდოს ცილების დაყოფის ეფექტურობა. მეთოდს საფუძვლად უდევს ცილების იზოელექტრულ წერტილებს შორის განსხვავება. იზოელექტრული ფოკუსირების მეთოდით დაყოფა ხდება pH -ის ბუნებრივ გრადიენტში, რომელიც იქმნება ელექტრული ველის გავლენით. pH -ის გრადიენტს ქმნიან სპეციალური ამფოლიტები, რომლებიც წარმოადგენენ ალიფატურ პოლიამინოპოლიმარბონ მჟავებს (მოლეკულური მასებით 1000 და უფრო მცირე). ამფოლიტებს აქვთ განსხვავებული იზოელექტრული წერტილები pH -ის გარკვეულ დიაპაზონში. ამფოლიტებს უშვებს შეედური ფირმა „LKB“-სახელწოდებით — ამფოლინი. რაიმე ინერტულ გელში ელექტრული ველის გავლენით თითოეული ამფოლინი გადაინაცვლებს მისი იზოელექტრული წერტილის შესატყვის ზონაში. რადგან ამ წერტილში ამფოლინი ელექტრონეიტრალურია, ის წყვეტს გადაადგილებას და თითქმის ფოკუსირდება ამ ზონაში. რამდენადაც ამ სისტემაში იმყოფება, ასე ვთქვათ, დაფოკუსირებული ამფოლიტების დიდი რიცხვი (რომლებსაც გააჩნიათ მნიშვნელოვანი ბუფერული ტევადობა) და ამავე დროს ძალზე მცირედ განსხვავდებიან თავიანთი იზოელექტრული წერტილებით, ხდება pH -ის თითქმის უწყვეტი გრადიენტის წარმოქმნა. ცილება, რომლებიც წარმოდგენილი არიან ასეთ გელში ამფოლიტებთან ერთად, ისე იქცევიან, როგორც ამფოლიტები, ე. ი. იყოფიან და ფოკუსირდებიან თავიანთი იზოელექტრული წერტილების მიხედვით. ამ მეთოდით შეიძლება ისეთი ორი ცილის დაყოფა რომელთა იზოელექტრული წერტილები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან pH -ის 0,02 ერთეულით. თუ განვსაზღვრავთ იმ ზონის pH -ს, სადაც დაფოკუსირდება ცილა, ზუსტად დავადგენთ თვით ცილის იზოელექტრულ წერტილს. ანალიზური იზოელექტრული ფოკუსირებისათვის ამჟამად ფართოდ გამოიყენება პოლიაკრილამიდის გელი. ცილების დაყოფა იზოელექტრული ფოკუსირების მეთოდით პოლიაკრილამიდის გელში დისკ-ელექტროფორეზის ანალოგიურია. მა-

გალითად. ამ მეთოდით ნაჩვენები იქნა, რომ ელექტროფორეზულად და ულტრაცენტრიფუგირების მეთოდის მიხედვით ჰომოგენური L-ამინოოქსიდაზა *Croialus adamanteus*-ის შხამიდან იძლეოდა ფერმენტული აქტივობის მქონე 18 ზონას.

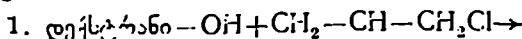
გელ-ჰრომატოგრაფია

ცილების დაყოფის ეს მეთოდი დამყარებულია სხვა პრინციპზე, ხახელდობრ. ცილის მოლეკულებს შორის მოლეკულური მასის, ზომისა და ფორმის სხვაობაზე. ამჟამად მეთოდი ფართოდ გამოიყენება ცილების, ფერმენტების მოლეკულური მასის დასადგენად, ხსნარების კონცენტრირებისა და მათი გაუმარილოებისათვის, ცილების პრეპარატიული მიღებისათვის, მეოთხეული სტრუქტურის შენსწავლისათვის და ა. შ. ხშირად მოლეკულური მასა გვევლინება ისეთ ერთადერთ ნიშანთვისებად, რომელიც საშუალებას იძლევა განვასხვაოთ ერთი ნივთიერება მეორისაგან.

ფერმენტის გელ-ჰრომატოგრაფია (ზოგჯერ მას გელ-ფილტრაციასაც უწოდებენ) დამყარებულია მოლეკულური საცრის პრინციპზე. თუ გელის გრანულებს მოვათავსებთ გამხსნელთან ერთად ევრტიკალურად დამაგრებულ სვეტში და მასზე გადავიტანთ ცილის ხსნარს, სხვადასხვა ცილის მოლეკულები ე. ი. სხვადასხვა მასის მქონე ცილის მოლეკულები დაიწყებენ დაყოფას სუფთა გამხსნელის სვეტში გატარების შედეგად. დიდი ზომის, და ბუნებრივია, მაღალი მოლეკულური მასის მქონე ცილის მოლეკულები მოძრაობენ უფრო სწრაფად, რადგან ისინი ვერ შედიან გელის გრანულებში, მცირე ზომის მოლეკულები კი ადვილად დიფუნდირებენ გელის გრანულებში და ამის გამო მათი მოძრაობის სიჩქარე გაცილებით ნაკლებია.

ამგვარად, გრანულირებული გელის სვეტიდან ცილის მოლეკულების ელუირების სიჩქარე მოლეკულური მასის ზრდის მიხედვით მატულობს, ანუ გელ-ჰრომატოგრაფიის პრინციპი სამზარეულო საცრის პრინციპის საწინააღმდეგოა.

გელ-ჰრომატოგრაფიაში ყველაზე გავრცელებულ გელად ითვლება გელი ფირმული სახელწოდებით — სეფადექსი. სეფადექსი წარმოადგენს ტუტე არეში დექსტრანისა და ეპიქლორჰიდრინის $(\text{C}_6\text{H}_2-\text{CH}-\text{CH}_2\text{Cl})$ ურთიერთქმედების პროდუქტს.



→დექსტრანი—O—C₆H₅—C₆H₄OH—C₆H₄Cl

2. დექსტრანი—O—C₆H₅—CHOH—C₆H₄Cl + NaOH→

→დექსტრანი—O—C₆H₅—CH—C₆H₄ + NaCl→ $\begin{matrix} \diagup & \diagdown \\ & O \end{matrix}$

3. დექსტრანი—O—C₆H₅—CH—C₆H₅ + H₂O→დექსტრანი→

→დექსტრანი—O—C₆H₅—C₆H₄OH—C₆H₅—O—დექსტრანი

დექსტრანი მაღალმოლეკულური პოლისაქარიდია, რომლის მოლეკულური მასა მილიონს აღემატება და რომელსაც გამოიშუშავენ ზოგიერთი მიკროორგანიზმები (*Leconostoc mesenteroides*). დექსტრანის მოლეკულა შედგება გლუკოზის ნაშთებისაგან აშენებული ჯაჭვებისაგან (90%-ზე მეტი გლუკოზის ნაშთი უკავშირდება ერთმანეთს α—1,6 გლიკოზიდური ბმებით, დანარჩენი კი 1,3 ბმებით), ჯაჭვები კი ერთმანეთთან დაკავშირებული არიან განივი ბმებით. დექსტრანი ძალზე ჰიდროფილურია, რადგან დიდი რაოდენობით შეიცავს ჰიდროქსილის ჯგუფებს. სეფადექსის გელი შეიცავს სუბმიკროსკოპულ ფორებს, რომელთა ზომა დამოკიდებულია განივი ბმების რაოდენობაზე. ამგვარად, გელს გააჩნია სამგანზომილებიანი ბადისებრი სტრუქტურა. განივი ბმების რიცხვი შეიძლება შეიცვალოს ქიმიური გზით, რაც საშუალებას იძლევა ვარეგულიროთ ფორების ზომა ამ ბადეში, ე. ი. მივიღოთ სხვადასხვა ტიპის გელები. შვედური ფორმა Pharmacia უშვებს გელის სხვადასხვა ზომის მქონე გრანულებს, რომლებიც ხასიათდებიან განივი ბმების სხვადასხვა რაოდენობით. არჩევენ წვრილ-და მსხვილფორიან სეფადექსებს. წვრილფორიანი ნიშნავს, რომ ბევრია განივი ბმების რაოდენობა და ე. ი. მცირეა ფორების ზომა; მსხვილ ფორიანებში კი პირიქით, ფორების ზომა მეტია, რადგან ნაკლებია განივი ბმების რაოდენობა. წვრილფორიანი სეფადექსებია: G—10, G—15, G—25; მსხვილფორიანებია: G—100, G—150 და G—200; არის შუალედური ფორმებიც: G—50 და G—75.

სეფადექსებში არჩევენ შემდეგ ფრაქციებს: უხეშ, საშუალო, წმინდა და ზეწმინდა სეფადექსებს. სეფადექსებისათვის დამახასიათებელი სიდიდეები წარმოდგენილია მე-5 ცხრილში. როგორც ცხრილიდან ჩანს, სეფადექსები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან ნაწილაკების დიამეტრით, გაჭირვების ხარისხით. გაჭირვებული გელის ფორების დიამეტრი და სრული მოცულობა განაპირობებს სხვა-

სეფადექსების ზოგიერთი თვისება

სეფადექსის ტიპი	ნაწილაკის დიამეტრი მიკრონებში	გაჭირჩქვების ხარისხი მლ-ში 1 გ სუფ დექსზე	საერთო მოცულობა გაჭირჩქვების შემდეგ (მლ-ში 1 გ სუფ დექსზე)	პეტელებისა და გლობულარული ცილების ფრაქციონირების სიზღვრები მოლეკულური მასების სიდიდის მიხედვით	გაჭირჩქვების მინიმალური რაოდენობა	
					ოთახის ტემპ-რატურაზე	წყლის მაღალ-აბაზაში
G-10	40-120	1 ± 0.1	2-3	—700	3	1
G-15	40-120	1.5 ± 0.2	2.5-3.5	—1500	3	1
G-25 უხეში	100-300	2.5 ± 0.2	4-6	1000-5000	3	1
G-25 საშუალო	50-150	2.5 ± 0.2	4-6	1000-5000	3	1
G-25 წმინდა	20-80	2.5 ± 0.2	4-6	1000-5000	3	1
G-25 ზეწმინდა	10-40	2.5 ± 0.2	4-6	1000-5000	3	1
G-50 უხეში	100-300	5.0 ± 0.3	9-11	1500-30000	3	1
G-50 საშუალო	50-150	5.0 ± 0.3	9-11	1500-30000	3	1
G-50 წმინდა	20-80	5.0 ± 0.3	9-11	1500-30000	3	1
G-50 ზეწმინდა	10-40	5.0 ± 0.3	9-11	1500-30000	3	1
G-75	40-120	7.5 ± 0.5	12-15	3000-70000	24	3
G-75 ზეწმინდა	10-40	7.5 ± 0.5	12-15	3000-70000	24	3
G-100	40-120	10.0 ± 1.0	15-20	4000-150000	72	5
G-100 ზეწმინდა	10-40	10.0 ± 1.0	15-20	4000-150000	72	5
G-150	40-120	15.0 ± 1.5	20-30	5000-400000	72	5
G-150 ზეწმინდა	10-40	15.0 ± 1.5	20-30	5000-400000	72	5
G-200	40-120	20.0 ± 2.0	30-40	5000-800000	72	5
G-200 ზეწმინდა	10-40	20.0 ± 2.0	30-40	5000-800000	72	5

დასხვა მოლეკულური მასის მქონე ცილების ფრაქციონირების უნარს. სეფადექსები მდგრადია ტუტისა და სუსტი მჟავების მიმართ, მაგრამ მათზე უარყოფითად მოქმედებენ ძლიერი დამჟანგველები.

ორიოდე სიტყვა სეფადექსებთან მუშაობის ტექნიკის შესახებ: მაღალ ცილინდრში, რომელშიც წინასწარ მოთავსებულია გამხსნელი, ნაწილ-ნაწილ, მორევის პირობებში უმატებენ სეფადექსის ფხენილის (გრანულების) გარკვეულ რაოდენობას. გარკვეული ზომის მქონე სვეტის მისაღებად საჭირო სეფადექსის რაოდენობა შეიძლება მიახლოებით გამოანგარიშებულ იქნას შემდეგი ფორმულით

$\pi r^2 h$ / გაჭირვებული გელის სრული მოცულობა,
სადაც r სვეტის რადიუსია, h სვეტის სიმაღლე

სხვადასხვა ტიპის სეფადექსებისათვის გაჭირვებული გელის მოცულობა სხვადასხვაა და მოცემულია მე-5 ცხრილში. მაგალითად, სეფადექს G-50-ის 2×50 სმ სიდიდის სვეტის მისაღებად საჭირო იქნება $\frac{3,14 \cdot 1^2 \cdot 50}{10} = 16,7$ გ მშრალი სეფადექსი. პრაქტიკულად იღებენ

ოღნავ მეტს. ამ ფორმულით გაანგარიშებული სეფადექსის რაოდენობა, რა თქმა უნდა, არ იქნება ზუსტი, რადგან, როგორც ცხრილიდან ჩანს, ერთი და იგივე ტიპის სეფადექსებისათვის გაჭირვებული გელის მოცულობა მერყეობს გარკვეულ ფარგლებში, მაგალითად G—200—თვის 30—40 მლ-ის ფარგლებში. სეფადექსებთან მუშაობის დროს პირველ რიგში საჭიროა მათი სრული გაჭირვება (გაჭირვების ხარისხი პრაქტიკულად არ არის დამოკიდებული გამხსნელის იონურ ძალაზე). სრული გაჭირვებისათვის სეფადექსს აყოვნებენ გარკვეულ დროის განმავლობაში და დეკანტაციით აცილებენ მსუბუქ ნაწილაკებს. დეკანტაციას იმეორებენ მანამ, სანამ მაქსიმალურად არ იქნება მოცილებული მსუბუქი ნაწილაკები. საქმე იმაშია, რომ სვეტის ეფექტურობა სხვა ფაქტორებთან ერთად იმაზედაცაა დამოკიდებული თუ რამდენად ერთგვაროვანია გელის გრანულები. გაჭირვებული სეფადექსის სვეტში მოთავსების წინ სასურველია რამდენიმე წუთით მისი წამოდულება. ამ დროს გელი თავისუფლდება ჰაერისაგან და სტერილდება.

სვეტში გაჭირვებული გელი შეიტანება ისეთი სუსპენზიის სახით. რომელშიც ჰაერის ბუშტუკები თავისუფლად გადის. სვეტის ზომებს ჩვეულებრივ ისე არჩევენ, რომ სიმაღლის შეფარდება დიამეტრთან იყოს 10:1, 20:1 (სპეციალური მიზნებისათვის შეიძლება იყოს 100:1).

სვეტის ეფექტურობა დადასტავებული იმაზე, თუ რამდენად მკვირვად და თანაბრადაა მომზადებული სვეტი.

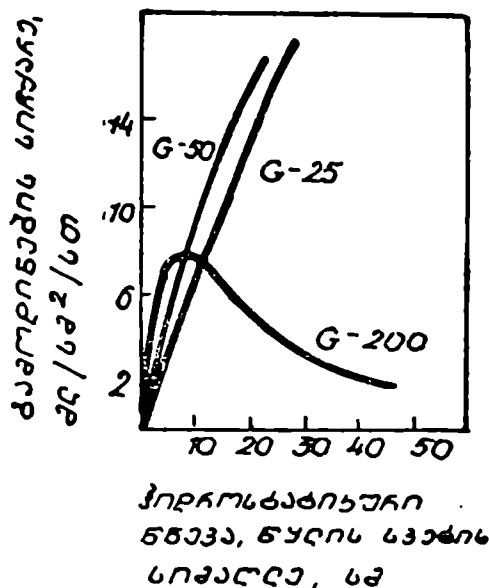
მინის მილი მაგრდება ვერტიკალურ მდგომარეობაში და იკეტება ქვედა ონკანი. მილის ძირზე წინასწარ მოთავსებულია მინის ბამბის თხელი ფენა და მის ზემოთ მცირეოდენი კვარცის სილა ან მინის წვრილი ბურთულები (დიამეტრი 0,5 მმ) ან კიდევ ორგანული მინის ნასვრეტებიანი დისკი. სვეტში ქვედა ონკანიდან შეყავთ გამხსნელი 5—10 სმ-ზე რაბათა სვეტის გამოსასვლელ ნაწილში არ დარ-

ჩეს ჰაერი. სეფადექსის სუსპენზიის შეტანა ხდება ორი გზით: სუსპენზიას უმატებენ ნაწილ-ნაწილ, ან სვეტს აგრძელებენ იმავე ზომის სვეტით და სუსპენზიას ასხამენ ერთბაშად. როდესაც სვეტის ძირზე წარმოიშვება 3—5 სმ სეფადექსის დამჭდარი ფენა, ონკანს გახსნიან. უნდა გვახსოვდეს, რომ სეფადექსების G—100, G—150 და G—200 სვეტების მომზადებისას უნდა ვერიდოთ მაღალ ჰიდროსტატიკურ წნევას, რადგან ამ დროს ხდება სეფადექსების დატკეპვნა ზომაზე მეტად, რის შედეგადაც გამხსნელის გატარების სიჩქარე მკვეთრად მცირდება. ამის თავიდან აპაცილებლად სვეტის გამოასვლელს უნდა გავუკეთოთ ელასტიკური წვრილი მილი და მისი ბოლო ავწიოთ ისეთ სიმაღლეზე, რომ მასსა და სვეტში მყოფი გამხსნელის ზედაპირს შორის მანძილი იყოს 10—15 სმ.

სვეტი მზადდება ოთახის ტემპერატურაზე და შემდეგ გადაიტანება ცივ ოთახში. გელის ზედაპირზე, როგორც წესი ათავსებენ ზუსტად სვეტის შიდა დიამეტრის მქონე ფილტრის დისკს. სვეტი ჩაითვლება კარგად მომზადებულად, თუ მასში შეტანილი შიგთხერილი მაღალმოლეკულური ნივთაერება იმოძრაავებს თანაბრად, ვიწრო ფენის სახით. სვეტზე ცილის დატანის რამდენიმე საშუალება არსებობს: გამხსნელს სვეტიდან აცილებენ თითქმის მთლიანად და ნიმუშში გადააქვთ სწრაფად მაგრამ ფრთხილად. როდესაც ნიმუშში მთლიანად შევა გელში, უმატებენ გამხსნელის მცირე რაოდენობას ზედაპირის ჩასარეცხად და ამის შემდეგ იწყებენ ელუირებას. ნიმუშის დატანა შეიძლება გამხსნელის მოუცილებლადაც. ამისათვის შპრიცის ან კაპილარის საშუალებით გამხსნელის შიგნით გელის ზედაპირზე დააფენენ ნიმუშს. ამ გზით უპირატესად გადააქვთ შედარებით ბლანტი ნიმუშები.

ანალიზური მიზნებისათვის დატანილი ნიმუშების მოცულობა სასურველია იყოს შეძლებისდაგვარად მცირე, დაახლოებით სვეტის მოცულობის 1—2%, პრეპარატული მიზნებისათვის კი 30%-მდე. საქმე იმაშია, რომ სეფადექსის სვეტები დამაკმაყოფილებელ დაყოფას იძლევიან მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როდესაც ნიმუშში დატანილია სვეტის შესაძლებლობის შესაბამისი რაოდენობით. ნიმუშში სეფადექსზე გატარებისას, რა თქმა უნდა, ზავდება და მით მეტად. რაც ნაკლებია ნიმუში (დაახლოებით 1—5 ჯერ). ელუირება შეიძლება წყლითაც, მაგრამ უკეთესია ბუფერული ხსნარებით ან მარილებით, რომელთა მოლარობაა 0,01—0,1; ელუირების სიჩქარე რეგულირდება როგორც ქვედა ონკანის საშუალებით, ისე ჰიდროსტატიკური წნევის ცვლილებით. სეფადექსებზე G-25 და G-50 წნე-

ვა შეიძლება იყოს 100 სმ-ზე მეტი, ხოლო სეფადექსებზე G-150 და G-200 არა უმეტეს 10—15 სმ-ისა (სურ. 49).



სურ. 49. პოლიმერის ხარისხი და ქიმიკატის ხარისხი
სმ²/სთ

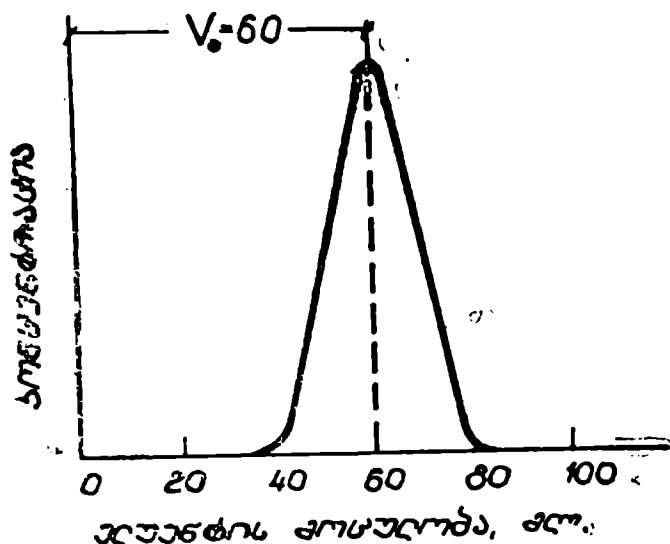
სეფადექსის სვეტები გამოიყენება რამდენჯერმე, მაგრამ ყოველი ხმარების შემდეგ საჭიროა დიდი რაოდენობა გამხსნელის გატარება. დროთა განმავლობაში ელუირების სიჩქარე ეცემა. სეფადექსი ინახება გაფრთხილებულ მდგომარეობაში რომელიმე ანტისეპტიკთან (ნატრიუმის აზიდი—0.02%, ქლოროფორმი) ერთად. სეფადექსის გამოშრობა შეიძლება 60—80°C და ისე შენახვა. ამისათვის გელს რეცხენ ბუფერით, წყლით და შემდეგ სპირტით.

როგორც ვთქვით, გელ-ქრომატოგრაფია წარმოადგენს ფრაქციონირების ისეთ მეთოდს, რომელიც დამყარებულია ცილების მოლეკულურ მასებს შორის განსხვავებაზე და არაა დამოკიდებული მუხტის სიდიდეზე და ხსნადობაზე. სხვა მეთოდებისაგან განსხვავებით, სვეტზე ცილის ყოფაქცევაზე გავლენას არ ახდენენ მინარევები.

გელ-ქრომატოგრაფიის შედეგების რაოდენობითი შეფასებისათვის საჭიროა წარმოდგენა ვიქონიით გელში მოცულობით თანადარობებზე. სეფადექსის სვეტი შედგება ორი ფაზისაგან „თავისუ-

ფალი“ გამხსნელისა და „დაკავშირებული“ გამხსნელისაგან. „დაკავშირებული“ გამხსნელი ეს არის გელის გრანულებში მყოფი გამხსნელის მოცულობა და იწოდება „შიგნით“ მოცულობად (V_2). „თავისუფალი“ გამხსნელი, ე. ი. გელის გრანულებს შორის მყოფი გამხსნელის მოცულობა იწოდება „გარეგანი“ მოცულობად (V_3). რუსულ და უცხოურ ლიტერატურაში „გარეგანი“ მოცულობა აღინიშნება V_0 -ით. თვით მშრალი გელის მიერ დაკავებული მოცულობა იწოდება მატრიცის მოცულობად (V_4). ამგვარად, სვეტის საერთო მოცულობა $V_6 = V_2 + V_3 + V_4$.

სვეტში გელის საერთო მოცულობის დასადგენად საჭიროა განისაზღვროს სვეტის მოცულობა ფსკერიდან ზედაპირამდე.



სურ. 50. გარეგანი მოცულობის, V_0 -ის განსაზღვრა

გარეგანი მოცულობის, V_3 -ის (V_0) განსაზღვრისათვის საჭიროა სვეტზე ისეთი მაღალმოლეკულური ნაერთის გატარება, რომელიც არ შედის გელის გრანულებში. ელუენტის მოცულობა, რომელიც ჩამოდის სვეტიდან გელზე ნიმუშის დატანის მომენტიდან ელუენტში მისი მაქსიმალური რაოდენობით ჩამოსვლამდე (რაც პიკის მაქსიმუმს შეესაბამება) ზუსტად შეესაბამება გამხსნელის რაოდენობას გრანულებს შორის, ე. ი. V_0 -ს (სურ. 50). ამ მიზნისათვის ხშირად იყენებენ მაღალმოლეკულურ პოლისაქარიდს — ცისფერ დექსტრანს (მოლეკულური მასა ტოლია 2000000).

შინაგანი მოცულობა (V_a) მჭიდროდაა დაკავშირებული გელის ფორიანობასთან. ის გაიანგარიშება ფორმულით:

$$V_a = aN.$$

სადაც a —მშრალი გელის წონაა, M —გაჭირჩვების ხარისხი. თუ მშრალი გელის წონა უცნობია, მაშინ

$$V_a = (V_0 - V_g) \frac{Md}{1 + M}$$

სადაც d — გაჭირჩვებული გელის სიმკვრივეა. ყველა გელისათვის ცნობილია d გაჭირჩვების მდგომარეობაში (ცხრილი 6).

ცხრილი 6

სეფადექსების ზოგიერთი მახასიათებლები*

გელის ტიპი	გელის საერთო მოცულობა, V_0 , მლ	შინაგანი მოცულობა, V_a , მლ	გარეგანი მოცულობა, V_g , (V_0), მლ	გაჭირჩვებული გელის სიმკვრივე, d , გოაბი/ლ
G-10	2	1,0	0,8	1,24
G-15	3	1,5	1,1	1,19
G-25	5	2,5	2,0	1,13
G-50	10	5,0	4,0	1,07
G-75	13	7,0	5,0	1,05
G-100	17	10,0	6,0	1,04
G-150	24	15,0	8,0	1,03
G-200	30	20,0	9,0	1,02

ყოველი ცილის გამოსვლის მოცულობა ლიტერატურაში აღინიშნება V_0 -ით და ის არის მოცულობა, რომელიც ჩამოდის სვეტიდან გელზე მისი დატანის მომენტიდან ელუენტში მისი მაქსიმალური კონცენტრაციის მიღწევამდე. მოცემული სვეტიდან კონცენტრირებული ცილა ყოველთვის ელუირდება ერთსა და იმავე მოცულობაში. ცილაფერი დექსტრანის $V_0 = V_a$, რადგან დექსტრანის მოლეკულები არ შედიან გელის გრანულებში.

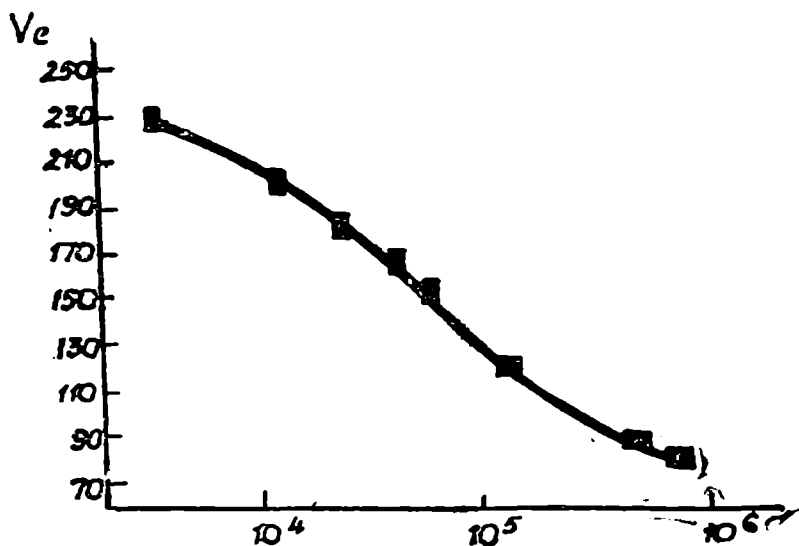
ნივთიერების გამოსვლის მოცულობა განისაზღვრება ამ ნივთიერების მხოლოდ მოლეკულის სიდიდით და თითქმის არაა დამოკიდებული ელუირების სიჩქარესა და ნივთიერების კონცენტრაციაზე. გამოსვლის მოცულობა აგრეთვე არაა დამოკიდებული ტემპე-

ცხრილში მოყვანილი მონაცემები ნაანგარიშებია 1 გ მშრალ გელზე.

რატურაზე. მრავალრიცხოვანი ექსპერიმენტებით დადგენილია, რომ გამოსვლის მოცულობა მოლეკულური მასის ლოგარითმის პირდაპირპროპორციულია. სწორედ ამ პრინციპზეა დამყარებული ცილების, ფერმენტების მოლეკულური მასების განსაზღვრა გელ-ქრომატოგრაფიის მეთოდით.

ამ მეთოდით მოლეკულური მასის განსაზღვრისათვის საჭიროა შერჩეული იქნეს სეფადექსის შეაფერისი ტიპი და სვეტის ზომა. მოლეკულური მასის განსაზღვრისათვის უპირატესად გამოიყენებიან სეფადექსები G—100 და G—200.

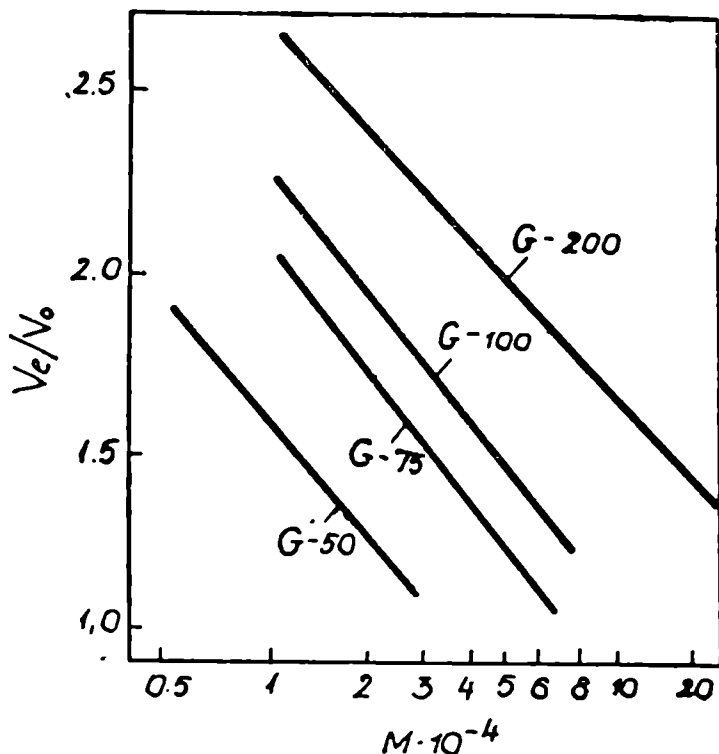
პირველ რიგში აწარმოებენ სვეტის დაკალიბრებას ცნობილი მოლეკულური მასის მქონე ცილების (რომლებსაც ხშირად ცილა-მოწეებს უწოდებენ) საშუალებით, ე. ი. აკავშირებენ ცილა-მოწეების გამოსვლის მოცულობებს — V_e მათი მოლეკულური მასების ლოგარითმთან (სურ. 51). მოლეკულური მასების გარკვე-



სურ. 51. გამოსვლის მოცულობის (V_e) დამოკიდებულება ცილების მოლეკულურ მასებთან (სეფადექსი G—200 ($2,5 \times 50$ სმ), pH 7,5

ულ ღიაპაზონში ეს დამოკიდებულება ხაზობრივია. ამის შემდეგ სვეტზე ატარებენ საკვლევი ცილის ხსნარს, განსაზღვრავენ მისი გამოსვლის მოცულობას და საკალიბრო მრუდის საშუალებით საზღვრავენ მის მოლეკულურ მასას.

რამდენადაც V_e/V_0 არ არის დამოკიდებული სვეტის გეომეტრიაზე და ერთი და იგივე სეფადექსებისათვის წარმოადგენს მუდმივ სიდიდეს, შესაძლებელია ცილის მოლეკულური მასა განვსაზღვროთ საკალიბრო მრუდის აუგებლადაც. საქმე იმაშია, რომ სხვადასხვა სეფადექსებისათვის მოცემულია დამოკიდებულება V_e/V_0



სურ. 52. დამოკიდებულება V_e/V_0 და ცილების მოლეკულურ მასებს შორის სხვადასხვა სეფადექსებისათვის.

ცილების მოლეკულური მასებისაგან (სურ. 52). ამ გრაფიკის საშუალებით შესაძლებელია მოლეკულური მასის გამოთვლა. ამ წრფეებისათვის მოცემულია განტოლებებიც, რომელთა საფუძველზედაც ასევე შეიძლება მოლეკულური მასის გაანგარიშება (ცხრილი 7).

ამგვარად გრაფიკულად ან ფორმულის საშუალებით ცილის მოლეკულური მასის განსაზღვრისათვის საჭიროა განისაზღვროს საკვლევი ცილის V_e და მოცემული სვეტის V_0 .

ფორმულები ცილის მოლეკულური მასის განსაზღვრისათვის

ტიპა	გ ა ნ ტ ო ლ ე ბ ა
G-75	$\lg M = 5,624 - 0,752 \cdot (v_e/v_0)$
G-100	$\lg M = 5,941 - 0,847 \cdot (v_e/v_0)$
G-200	$\lg M = 6,698 - 0,587 \cdot (v_e/v_0)$

გელ-ქრომატოგრაფიის მეთოდით მოლეკულური მასების განსაზღვრისას დიდი ყურადღება უნდა მიექცეს v_e და v_0 -ის ზუსტ აღრიცხვას. v_e და v_0 განსაზღვრის სიზუსტე მით მეტია, რაც მეტია სვეტის მოცულობა (გელის რაოდენობა). გარდა ამისა უმჯობესია სეფადექს G-100-ით განსაზღვროს 150000-ზე ნაკლები, ხოლო G-200-ით 150000-ზე მეტი მოლეკულური მასის მქონე ცილები.

გელ-ქრომატოგრაფიის მეთოდით შესაძლებელია ფერმენტის მოლეკულური მასის განსაზღვრა გაუწმენდავ, საწყის ექსტრაქტებშიც. რაც ამ მეთოდს კიდევ უფრო დიდ მნიშვნელობას ანიჭებს ფერმენტთა ქიმიად. ამ მეთოდით განსაზღვრული მოლეკულური მასები კარგად ემთხვევა სხვა მეთოდებით განსაზღვრულ მოლეკულურ მასებს. ზოგჯერ აღმოჩნდება განსხვავება, მაგრამ იგი უმნიშვნელოა.

რამდენადაც ამ მეთოდით შესაძლებელია ფერმენტების მოლეკულური მასების განსაზღვრა, ცხადია, რომ ეს მეთოდი გამოდგება ფერმენტების მეოთხეული სტრუქტურის, მათი ასოციაციადისოციაციის პირობების შესასწავლადაც. სეფადექსები დიდ გამოყენებას პოულობენ ავთვისარ, გაუქმებისათვისაც, ძირითადად სეფადექსები G-25 და G-50 (ესეში ფრაქციები). სვეტის ზომა შერჩეული უნდა იქნეს იმის მიხედვით თუ რა რაოდენობის ცილის პრეპარატის რა რაოდენობა ნაოილისაგან განთავისუფლება სურთ. დიალიზთან შედარებით გელ-ფილტრაცია სწრაფია და ნაკლები დანაჯარგებიცაა, მაგრამ ხდება ცილის ხსნარის საგრძნობი განზავება. თუ ცილის ხსნარს დავუმატებთ მშრალ სეფადექსს, იგი გაჯირჭდება — შეიწოვს წყალს ან ბუფერს, ცილა კი დარჩება გრანულებს გარეთ. თუ ასეთ ხსნარს დავაცენტრიფუგირებთ და მოვაცილებთ გაჯირჭებულ გელს, მაშინ მიღებულ სუპერნატანტში ცილის კონცენტრაცია მოიმატებს. თუ კონცენტრირება არ იქნება საკმარისი, კიდევ დავმატება მშრალი სეფადექსი და ა. შ. ამ მიზნისათვის იყე-

ნებენ G-25 და G-50. თუ ცილის მოლეკულური მასა საკმარისად დიდია შეიძლება G-75, G-100 და G-200-ის გამოყენებაც.

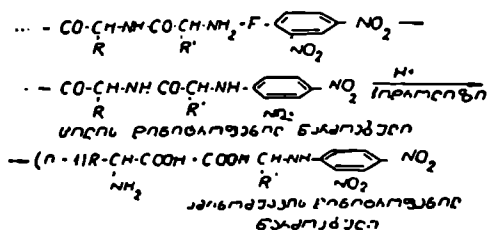
სეფადექსებით ცილების დაყოფა, რა თქმა უნდა, ვერ შეცვლის სხვა მეთოდებს, მაგრამ იგი სხვა მეთოდებთან ერთად იძლევა კარგ შედეგებს. ამ მეთოდით მოხერხდა ბევრი ცილის ერთმანეთისაგან განცალკევება. როგორც წესი, ანალიზური მიზნებისათვის გამოიყენებენ წმინდა და ზეწმინდა, ხოლო პრეპარატიული მიზნებისათვის საშუალო და უხეშ სეფადექსებს. რაც უფრო წმინდაა სეფადექსი, მით უფრო ნაკლებია ელუირების სიჩქარე და პირიქით.

ცილის N-და C-ბოლო ამინომჟავების განსაზღვრა

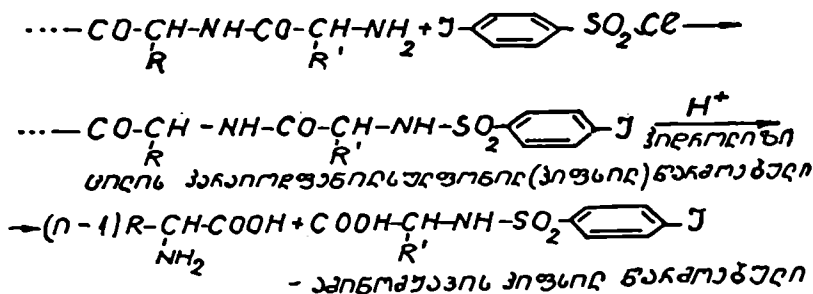
ცილის, ფერმენტის მოლეკულაში წარმოდგენილია N-ბოლო ამინომჟავა, რომელიც შეიცავს თავისუფალ NH_2 ჯგუფს, და C-ბოლო ამინომჟავა, რომელიც შეიცავს თავისუფალ COOH ჯგუფს. თუ ფერმენტს არა აქვს მეოთხეული სტრუქტურა და იგი მიღებულია სუფთა, ჰომოგენური სახით. მაშინ ცხადია, მისი N-და C-ბოლო ამინომჟავების განსაზღვრისათვის მიიღება შესაბამისად ერთი გარკვეული ამინომჟავა. თუ მიიღება ორი ან მეტი ამინომჟავა ფერმენტი არა-ჰომოგენურია. თუ ფერმენტი მეოთხეული სტრუქტურის მქონეა შესაძლებელია N-ან C-ბოლო ამინომჟავები იყოს განსხვავებული.

N-ბოლო ამინომჟავების განსაზღვრის მეთოდებია:

1. სენჯერის რეაქცია. ცილას ამუშავებენ 2.4 დინიტროფტორბენზოლით, მიიღება ცილის დინიტროფენილ წარმოებული. მისი სრული მჟავე ჰიდროლიზით პეპტიდური ბმები გაწყდება, მიიღება (H^+ —1) თავისუფალი ამინომჟავა და N-ბოლო ამინომჟავა დინიტროფენილწარმოებულის სახით:

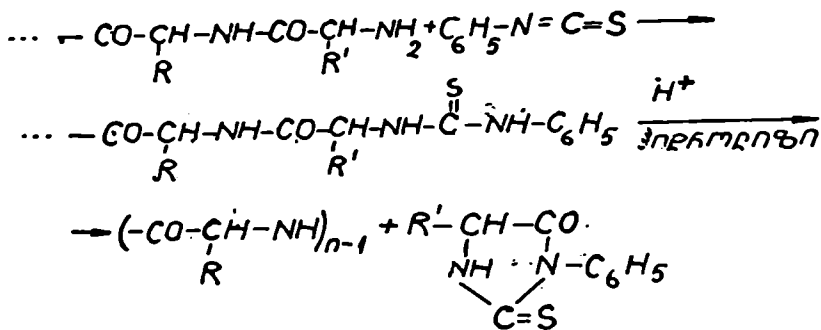


2. რეაქცია პარაიოდფენილსულფონილქლორიდთან.



ორივე შემთხვევაში მიმართავენ ჰიდროლიზატის ისეთ ადსორბენტებზე გატარებას, რომლებიც განსხვავებით თავისუფალი ამინომჟავებისაგან, შერჩევითად ადსორბირებენ მხოლოდ ამინომჟავის დინიტროფენილ—ან პიფსილწარმოებულებს. შემდეგ ახდენენ მათ დესორბციას. ამინომჟავის იდენტიფიცირებას ახდენენ მაგალითად, ქაღალდის ქრომატოგრაფიით. ქაღალდზე საკონტროლოდ აწვეთებენ შესაბამისად ყველა ცნობილი ამინომჟავის დინიტროფენილ—ან პიფსილწარმოებულებს და R_F-ით საზღვრავენ უცნობ ამინომჟავას, ან ახდენენ დესორბირებული ამინომჟავის წარმოებულის ჰიდროლიზს და თავისუფალ ამინომჟავებს იმავე ქაღალდის ქრომატოგრაფიული მეთოდით ადარებენ სხვა ამინომჟავებს.

3. ედმანის რეაქცია. ცილას (ფერმენტს) ამუშავებენ ფენილიზოციანატით $C_6H_5N=C=O$ ან ფენილიზოთიოციანატით $C_6H_5N=C=S$.

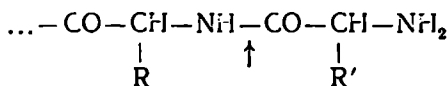


ფანდოტორობიანტონი

ამ შემთხვევაში ჰიდროლიზით მოწყდება მხოლოდ N-ბოლო ამინომჟავა ფენილთიოგიდანტოინის სახით და რჩება (n-1) ამინო-

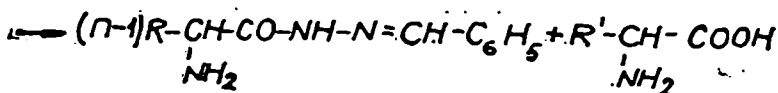
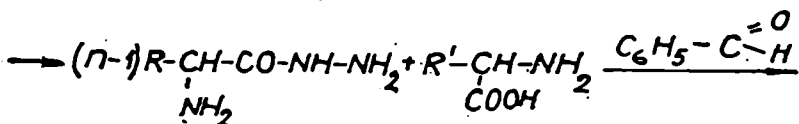
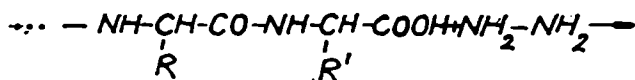
შეავისაგან შემდგარი პოლიპეპტიდი. ამინომჟავის იდენტიფიცირება ხდება ისევე, როგორც წინა შემთხვევებში.

4. ფერმენტული რეაქცია. ისეთი პროტეოლიზური ფერმენტები, როგორიცაა ამინოპეპტიდაზები ახდენენ პოლიპეპტიდური ჯაჭვის N-ბოლო ამინომჟავის მოხლეჩას. ამ მიზნით ყველაზე ხშირად გამოიყენება ფერმენტი ლეიციनाმინოპეპტიდაზა, რომელიც ხლეჩს N-ბოლოდან პირველ ამინომჟავას:



C-ბოლო ამინომჟავის განსაზღვრის მეთოდები.

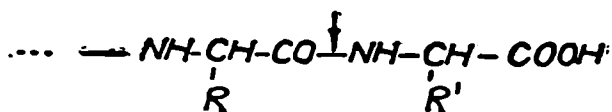
1. ჰიდრაზინოლიზის რეაქცია. ცილის გახლეჩა ხდება უწყლო ჰიდრაზინით NH_2-NH_2 , რომელიც მოქმედებს პეპტიდური ბმის წარმომქმნელ ყველა CO ჯგუფთან და არ მოქმედებს თავისუფალ COOH -ზე, ამიტომ უკანასკნელი ამინომჟავა გამოიყოფა თავისუფალი სახით. ნარევის ამუშავებენ ბენზალდეჰიდით. მიიღება ($n-1$) ამინომჟავის შიფის ფუძე და C-ბოლო ამინომჟავა თავისუფალი სახით:



შიფის ფუძე

შიფის ფუძე ამინომჟავებისაგან განსხვავებით წყალში უხსნადია. ამ გზით ხდება მათი დაცილება და შემდეგ ამინომჟავის იდენტიფიცირება.

2. ფერმენტული რეაქცია. ფერმენტი კარბოქსიპეპტიდაზა ხლეჩს C-ბოლოდან პირველ პეპტიდურ ბმას:



ცილის, ფერმენტის ჰომოგენობის შემოწმებისათვის N-და C-ბოლო ამინომჟავების განსაზღვრის მეთოდები საკმაოდ შრომატევადია და ნაკლებად გამოიყენებიან მეოთხეული სტრუქტურის მქონე ფერმენტების შემთხვევაში, რადგან მათ შენებაში მონაწილე სუბერთეულების N ან C-ბოლო ამინომჟავები უმეტეს შემთხვევაში განსხვავებულია. მიუხედავად ამისა განხილული მეთოდები ფართოდ გამოიყენებიან ფერმენტების დახასიათების მიზნით, და განსაკუთრებით, პირველადი სტრუქტურის შესწავლისათვის.

კრისტალიზაცია

კარგად გაწმენდილ ფერმენტებს უნარი აქვთ გამოკრისტალდნენ. კრისტალიზაციას უმეტეს შემთხვევაში აწარმოებენ ამონიუმის სულფატის ხსნარიდან. ფერმენტის გამოკრისტალება საკმაოდ ფაქიზი საქმეა და დიდ შრომას მოითხოვს. პირველ რიგში უნდა შეირჩეს გამოკრისტალების ოპტიმალური პირობები, გამხსნელი, ამონიუმის სულფატის კონცენტრაცია, ხსნარში ფერმენტის კონცენტრაცია, pH, ტემპერატურა და ა. შ.

ფერმენტულ ხსნარს ნჯღრევის პირობებში უმატებენ ამონიუმის სულფატის ნაჯერ ხსნარს უმნიშვნელო შემდგრევამდე. ამის შედეგად ამონიუმის სულფატს უმატებენ ძალიან ნელა და მცირე ზაოდენობით. ამდგრევისთანავე ფერმენტულ ხსნარს ათავსებენ მაცივარში რამდენიმე დღით. ზოგიერთ ფერმენტს გამოკრისტალებისათვის რამდენიმე თვეც კი ჰკირდება. თუ ფერმენტის ხსნადობა ტემპერატურის აწევისას მცირდება, მაშინ ფერმენტის გამოკრისტალება უმჯობესია ჩატარდეს არა 0°C, არამედ ოთახის ტემპერატურაზე. ზოგიერთი ფერმენტი კრისტალდება ორგანული გამხსნელების თანამყოფობისას, მაგალითად, ურეაზა კრისტალდება აცეტონიდან, ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა კი სპირტიდან. უმეტეს შემთხვევაში კი მიმართავენ ორჯერად გადაკრისტალებას. თვით ფაქტი იმისა, რომ ფერმენტი კრისტალდება, ჯერ კიდევ არ მოწმობს იმას, რომ იგი ჰომოგენურია, სუფთაა. რამდენადაც კრისტალიზაციის შედეგად ხდება ხვედრითი აქტივობის მატება, კრისტალიზაცია შეიძლება განხილული იქნეს როგორც გაწმენდის ერთ-ერთი საშუალება.

ფერმენტის გამოყოფისა და გაწმენდის სხვადასხვა მეთოდების შეხამებითა და გამოყენებით საბოლოოდ მიიღება ფერმენტული პრეპარატი, რომლის სისუფთავის ხარისხის დადგენა ხდება შემდეგი მეთოდებით: ელექტროფორეზით, იზოელექტრული ფოკუსირებით, ულტრაცენტრიფუგირებით, სხვადასხვა, ფერმენტის N-და C-ბოლო ამინომჟავების განსაზღვრით, იმუნოელექტროფორეზით და სხვა. თითოეული ამ მეთოდებიდან ცალ-ცალკე არ იძლევა ზუსტ პასუხს ცალის სისუფთავეზე, ამიტომ ფერმენტული პრეპარატის სისუფთავეზე მსჯელობენ რამდენიმე მეთოდის შედეგად მიღებული მონაცემების საფუძველზე.

ულტრაცენტრიფუგირების მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს იმაში, რომ ფერმენტულ ხსნარს აცენტრიფუგირებენ მაღალ ბრუნვებზე. ამ დროს ხდება გამხსნელსა და გახსნილ ნივთიერებას შორის გაყოფი საზღვრის წარმოქმნა და მისი გადაადგილება სინჯარის ფსკერისაკენ, რის შედეგადაც პირველად დაილექებოდა შედარებით მთავარი მოლეკულები, შემდეგ შედარებით მსუბუქი და ა. შ., ე. ი. ხდება ფერმენტულ ხსნარში მყოფი ცილების დაყოფა მოლეკულური მასების მიხედვით. ულტრაცენტრიფუგის სინჯარები, რომელშიც მოთავსებულია საცვლევი ხსნარი, დაკავშირებულია სპეციალურ ოპტიკურ მოწყობილობასთან, რომელიც აწარმოებს ანალიზის შედეგების ფოტოგრაფირებას მრუდების სახით. თუ ცილა ერთგვაროვანია, ე. ი. არ შეიცავს განსხვავებული მასის მქონე სხვა ცილის წინარეებს, მაშინ მრუდზე აიასება ერთი სიმეტრიული პიკი. თუ სედიმენტაციის დიაგრამაზე გამოჩნდება ორი პიკი, ეს იმის მაჩვენებელი იქნება, რომ ფერმენტულ ხსნარში არის სხვადასხვა სახის ცილა, არა ნაკლებ ორისა. გასაგები უნდა იყოს, რომ თუ ცილა არაა პომოგენური, მაგრამ მასში შემავალი კომპონენტების მოლეკულური მასები ახლოს დგანან ერთმანეთთან, დიაგრამაზე გამოჩნდება ერთი პიკი. ცხადია უკანასკნელი არ იქნება ცილის სისუფთავის, პომოგენობის დამადასტურებელი.

ულტრაცენტრიფუგირების მეთოდი გამოიყენება ხშირად დადილი წარმატებით ცილების, ფერმენტების მოლეკულური მასების განსაზღვრავად.

მოლეკულური მასა ისაზღვრება შემდეგი ფორმულის საფუძველზე

$$M = \frac{RTS}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

სადაც D —დიფუზიის კოეფიციენტი, R — გაზის მუდმივა, T —აბსოლუტური ტემპერატურა, $\bar{v}$ —ცილის პარციალური ხვედრითი მოცულობა. p — გამხსნელის სიმკვრივე, S — სედიმენტაციის კონსტანტა (განზომილებაა წმ). 10^{-13} წმ = 1 სვედბერგის ერთეულს (1S).

ცილა-ფერმენტის მოლეკულური მასის განსაზღვრის ტექნიკას ულტრაცენტრიფუგირების მეთოდის გამოყენებით შეიძლება გაეცნოთ სპეციალურ ლიტერატურაში.

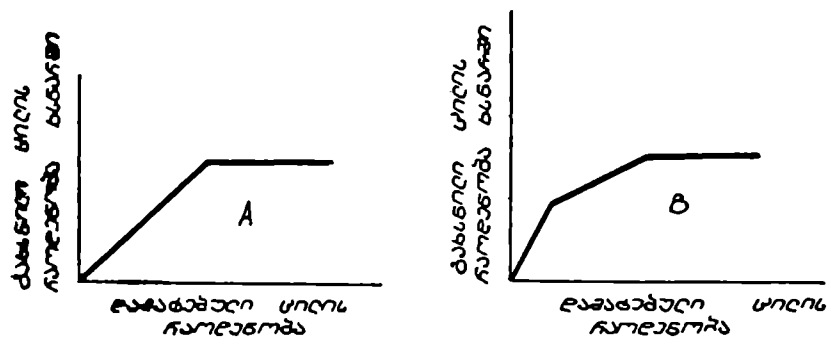
ელექტროფორეზის საშუალებით, ულტრაცენტრიფუგირებას მეთოდთან შედარებით, მიიღება უფრო მკაფიო სურათი ცილის ეთოვაროვნების შესახებ. ამ მეთოდზე ვილაპარაკეთ ადრე და ვთქვით, რომ ჰომოგენური ფერმენტული პრეპარატი ელექტროფორეზის შედეგად იძლევა ცილისა და აქტივობის ერთ ზოლს, მაგრამ ხშირად ხდება, რომ ელექტროფორეზის შედეგად მიღებული ცილის ერთი ზოლი მაინც არ მიუთითებს მის ინდივიდუალურ ხასიათზე.

იზოელექტრული ფოკუსირების მეთოდის (ამაზეც ზემოთ იყო ლაპარაკი) გამოყენებით შეიძლება აღმოჩნდეს, რომ ცილის ერთი ზოლი შეიცავს ორი ცილის ფრაქციას, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან იზოელექტრული წერტილებით და ამდენად არ წარმოადგენენ ერთსა და იმავე ცილასა, თუ ფერმენტს. იზოელექტრული ფოკუსირების მეთოდი ძალზე მგრძნობიარეა და მისი საშუალებით ბევრი ფერმენტის ჰომოგენობის საკითხი გადაისინჯა.

ჰომოგენობის დადგენის ე. წ. ხსნადობის განსაზღვრის მეთოდი ასევე ცილის ფიზიკურ თვისებებზეა დაფუძნებული. მეთოდის პრინციპი შემდეგში მდგომარეობს: თუ გამხსნელის გარკვეულ რაოდენობას თანდათანობით დაემატება საკვლევი ცილა-ფერმენტი, მაშინ ის ჯერ მთლიანად გაიხსნება და ხსნარში მყოფი ცილის რაოდენობა დამატებული რაოდენობის ტოლი იქნება. როგორც კი ხსნარი გაჯერდება ცილით, ხსნადობა შეწყდება და ხსნარში მყოფი გახსნილი ცილის რაოდენობა არ შეიცვლება. გრაფიკულად ეს გამოისახება ტეხილი მრუდით, გარდატეხის ერთი წერტილით (სურ. 53A).

თუ საკვლევი ხსნარი შედგება ორი ცილისაგან, მაშინ ხსნარში მყოფი გახსნილი ცილისა და დამატებული ცილის რაოდენობა ჯერ ტოლი იქნება. შემდეგ კი დადგება მომენტი, როდესაც შედარებით ნაკლებად ხსნადი ცილა არ გაიხსნება, მაგრამ გრაფიკზე მრუდი არ იქნება აბსცისთა ღერძის პარალელური, რადგან ამ დროს

გრძელდება შედარებით კარგად ხსნადი ცილის გახსნა. როდესაც შეწყდება ამ ცილის გახსნა, ე. ი. მიიღწევა გაჯერება, ხსნადობის მრუდი მიიღებს პორიზონტალურ მდგომარეობას. ასეთ შემთხვევაში ხსნადობის მრუდზე მიიღება გარდატეხის ორი წერტილი (სურ. 53B).



სურ. 53. ცილის ხსნადობის განსაზღვრის გრაფიკული გამოსახვა.

პრაქტიკულად ეს შემდეგნაირად ხორციელდება: ორ სინჯარაში ათავსებენ გამხსნელის ერთსა და იმავე რაოდენობას, ერთში დაუმატებენ საკვლევ ცილას სუსტად შემღვრევამდე, მეორეში კი აოჯერ მეტ რაოდენობას. სინჯარის შიგთავსებს აცენტრიფუგირებენ და სუპერნატანტში საზღვრავენ ცილის რაოდენობას. ცხადია, თუ ცილა ჰომოგენურია ცილის რაოდენობა ორივე სუპერნატანტში უნდა იყოს ერთნაირი, ხოლო თუ მეორეში აღმოჩნდა ცილის მეტი რაოდენობა, მაშინ ცილის პრეპარატი არაჰომოგენურია.

ფერმენტის გამოყოფის, გაწმენდისა და მისი ჰომოგენობის დადგენის შემდეგ დღის წესრიგში დგება ფერმენტთა შენახვის საკითხი. ადრე აღენიშნეთ, რომ ფერმენტები კარგად ინახებიან ამონიუმის სულფატის ნაჯერ ხსნარში 0°C -ის პირობებში. ასე მაგალითად, კომერციული ლაქტატდეჰიდროგენაზა იყიდება ამონიუმის სულფატის ნაჯერი ხსნარის სახით. მრავალი ფერმენტი კარგად ინახება ღრმად გაყინულ მდგომარეობაში (-20°C), მაგრამ რადგან გაყინვა-გაღომა მოქმედებს ფერმენტთა აქტივობაზე, ამიტომ ასეთ დროს ფერმენტს ნაწილ-ნაწილ ათავსებენ ცალკეულ სინჯარებში და ისე ინახავენ. ცხადია, ფერმენტის თითოეული ნაწილი მხოლოდ ერთხელ გალღვება, რაც შესამჩნევად არ იმოქმედებს ფერმენტის აქტივობაზე.

ხშირად მიმართავენ ფერმენტული პრეპარატის ლიოფილურ

შრობას, ე. ი. ლიოფილიზაციას, რაც მდგომარეობს ვაკუუმის პირობებში გაყინული მდგომარეობიდან ფერმენტის გაუწყლოებაში. უმეტეს შემთხვევაში ლიოფილურად გამშრალი ფერმენტული პრეპარატები კარგად ინარჩუნებენ თავიანთ თვისებებს. ლიოფილურად გამშრალ პრეპარატებს ინახავენ, რა თქმა უნდა, 0°C-ზე.

ლიტერატურა

1. Аналитические методы белковой химии. Пер. с англ. М., ИЛ., 1963.
2. Ашмарин И. П., Мюльберг А. А., Садикова Н. В., Сытинский И. А., Химия белка. Часть I., Изд. Ленинградского университета, 1963.
3. Биохимические методы в физиологии растений, под ред. О. А. Павлиновой М., «Наука», 1971.
4. Бэли Дж., Методы химии белков, М., «Мир», 1965.
5. Гауронц Ф., Химия и функция белков, М., «Мир», 1965.
6. Детерман Г., Гель-хроматографии, М. «Мир», 1970.
7. Диксон М., Уэбб Э., Ферменты, М., «Мир», 1966.
8. Кретонович В. Л., Введение в энзимологию, М., «Наука», 1974.
9. Мауер Г., Диск-электрофорез, М., «Мир», 1971.
10. Орехович В. Н., Хохлова О. С., Черников М. П., Биохимия, 24, 353, 1959.
11. Современные методы в биохимии. Сб. статей, т. I, под ред. В. Н. Ореховича, М., «Медицина», 1969.
12. Ферменты. Под ред. А. Е. Браунштейна, М., «Наука», 1964.
13. Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров. Сб. статей под ред, Г. В. Самсонова, М., «Наука», 1966.
14. Электрофорез в полиакриламидном геле и его применение в биологии, сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности. Труды Всесоюзного семинара, 1971, под ред. В. Л. Кретоновича, М., 1973.
15. Gordon A. H. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. Amsterdam, London, 1967.
16. Methods in Enzymology. Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan. N. Y., Academic Press. vol. I. preparation and assay of enzymes, 1959.

იმობილიზებული ფერმენტები

ფერმენტების დიდი ნაწილი ლოკალიზებულია უჯრედის ორგანულ ნაწილებში და დაკავშირებულია მათთან გარკვეული ფიზიკო-ქიმიური ძალებით. იმისათვის, რომ ფერმენტის ფუნქციური აქტივობა შევისწავლოთ საჭიროა ფერმენტის გამოყოფა და მისი ფიზიკო-ქიმიური და კინეტიკური თვისებების დადგენა. უჯრედიდან ფერმენტის გამოყოფის დროს ხდება უჯრედში არსებული სტრუქტურების დარღვევა, ე. ი. გასუფთავებულ ფერმენტს ჩვენ აღარ ვიღებთ იმ სახით, როგორც იგი მოქმედებს ორგანიზმში. რა თქმა უნდა გასუფთავებული ცილა, ფერმენტი მაინც იძლევა საჭირო ინფორმაციას ფერმენტის აღნაგობაზე, მის კონფორმაციულ მდგომარეობაზე, სუბსტრატულ სპეციფიკურობაზე, კინეტიკურ და სხვა თვისებებზე. აღმოჩნდა, რომ ნატიურ მდგომარეობასთან შედარებით გაწმენდილი ფერმენტის მთელი რიგი თვისებები მაინც იცვლება: როგორც წესი მცირდება ფერმენტის სტაბილურობა მაღალი ტემპერატურის მიმართ, ვიწროვდება pH-ის მოქმედების დიაპაზონი, ხშირად იცვლება კინეტიკური თვისებები და სუბსტრატული სპეციფიკურობაც კი. ყველაფერი ეს იმაზე ლაპარაკობს, რომ ფერმენტი მოქმედებისათვის საჭიროებს „საყრდენ ჯოხს“ — რაიმე სახის მატარებელს, როდესაც ფერმენტის მოქმედება გაცილებით უფრო ეფექტური და ხანგრძლივი იქნებოდა.

ფერმენტების მოქმედების ინტიმური მექანიზმების უკეთესად შესწავლისათვის, ფერმენტებს-ს პრაქტიკულად უფრო ხელსაყრელ ფორმებში მისაღებად და მათი მოქმედების გახანგრძლივებისათვის უკანასკნელ ხანებში უპირატესობა ენიჭება ე. წ. იმობილიზებულ ფერმენტების მიღებას.

დღეისათვის ცნობილია რამდენიმე ათეული უხსნად ფორმაში გადაყვანილი ე. ი. იმობილიზებული ფერმენტი. არსებობს სამი სხვადასხვა სახის იმობილიზაციის მეთოდი, ესენია:

1. ფერმენტის ფიზიკური აღსორბცია უხსნად მასალაზე.
2. ფერმენტის მოთავსება პოლიმერული გელის სტრუქტურაში.
3. ფერმენტების კოვალენტური მიბმა უხსნად მატარებელთან.

ფერმენტების ფიზიკური აღსორბცია დამოკიდებულია სორბენტის და ხსნარში მყოფი დისოცირებული ფერმენტის საწინააღმდეგო მუხტების სიდიდეზე, რომლის ხარჯზეც ხდება ფერმენტის შეკავება სორბენტზე. ამ თვალსაზრისით საუკეთესოა აღმოჩნდნენ ცელულოზის წარმოებულები დეაე-, ტეაე- და კმ-ცელულოზები, რომლებზედაც სორბირდებიან მკავე და ნეიტრალური ცილები. ამ ფორმით იმობილიზებული ფერმენტები ლიოფილიზაციის შემდეგ არ კარგავენ აქტივობას. აღნიშნული ფორმების გარდა, სორბენტებზედ იხმარება სილიკაგელი, ჰიდროქსილაპატიტი, პოლისტიროლი და სხვა.

ფერმენტების ფიზიკური აღსორბციის ძირითადი ნაკლი იმაში მდგომარეობს, რომ ისინი ადვილად განიცდიან დესორბციას, მაგალითად, სარეაქციო ხსნარის pH-ის, ან სარეაქციო ხსნარის იონური ძალის ცვლილებით. ცილების იონცვლად ქრომატოგრაფიის მეთოდს საფუძვლად უდევს აღსორბცია, ხოლო იმობილიზაციის თვალსაზრისით, სხვა მეთოდებთან შედარებით, ეს უკანასკნელი გაცილებით უფრო ნაკლებად გამოიყენება.

ფერმენტების მოთავსება პოლიმერული გელის სტრუქტურაში იძლევა საშუალებას ფერმენტი მოვითავსოთ გელის სტრუქტურაში იმგვარად, რომ ფერმენტი გელში არსებული ფორებათ ეხებოდეს სუბსტრატს. ასეთი სახის იმობილიზაცია მეტად ეფექტურია, ვინაიდან ფერმენტის არც ერთი ფუნქციური ჯგუფი ბლოკირებული არ არის. იმისათვის, რომ ფერმენტი ამგვარად იქნას იმობილიზებული საჭიროა პოლიმერიზაციის პროცესი რბილ პირობებში მიმდინარეობდეს, ე. ი. არ უნდა იქმნებოდეს ძლიერ მკავე ან ძლიერ ტუტე არე, მაღალი ტემპერატურა, ორგანულ გამხსნელებთან ხანგრძლივი კონტაქტი და სხვ., რომლებმაც შეიძლება გამოიწვიოს ფერმენტების მთლიანი, ან ნაწილობრივი უკუქცევადი დენატურაცია. სწორედ ასეთი თვისებების მქონე პოლიმერია პოლიაკრილამიდი, რომელიც ფართოდ გამოიყენება ბიოქიმიურ კვლევაში.

პოლიაკრილამიდზე იმობილიზებული სახით მიღებულია შემდეგი ფერმენტების უხსნადი ფორმები: ტრიპსინი, ქიმოტრიპსინი, ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა, ქოლინესთერაზა, რიბონუკლეაზა და სხვა.

პოლიაკრილამიდზე ფერმენტების იმობილიზაციის ეფექტურობა დამოკიდებულია აკრილამიდის და N,N'-მეთილენბისაკრილამი-

დის კონცენტრაციაზე, ფერმენტ-სუბსტრატული კომპლექსის წარმოქმნის პირობებზე, მიკრომოცულობის გავლენაზე, ფერმენტის აქტივობაზე და სხვა ფაქტორებზე. თუ სუბსტრატის მოლეკულა დიდი ზომისაა და ვერ ხდება კონტაქტი პოლიმერის გელში მოთავსებულ ფერმენტთან, ცხადია, რომ ფერმენტული რეაქცია ამ შემთხვევაში არ ჩატარდება. ასევე დიდი მნიშვნელობა აქვს რეაქციის პროდუქტების მოშორების სიჩქარეს ფერმენტის მიკრომოცულობიდან, რადგან ზოგიერთ შემთხვევაში ფერმენტული რეაქციის პროდუქტმა შეიძლება გამოიწვიოს ფერმენტის ნაწილობრივი ინჰიბირება.

პოლიაკრილამიდის გელის სტრუქტურაში ფერმენტის ჩართვის ორი მეთოდია დღეისათვის ცნობილი. პირველი მეთოდი ითვალისწინებს ფერმენტული ხსნარის მონომერებთან ერთად პოლიმერიზაციას. საჭიროებისას იმობილიზებული ფერმენტი ჰომოგენიზირდება და ისე იხმარება. ამგვარად იმობილიზებული ფერმენტები შენახვისას აქტივობას არ კარგავენ. ამ მეთოდის ნაკლად უნდა ჩაითვალოს ის გარემოება, რომ კომპლექსის ჰომოგენიზაციის დროს პოლიმერის სტრუქტურა ნაწილობრივად ირღვევა და ფერმენტი გამოდის პოლიმერის სტრუქტურიდან, ამიტომ ამ მეთოდით დამზადებული უხსნადი ფერმენტები შედარებით დაბალი აქტივობით ხასიათდებიან.

იმობილიზაციის მეორე მეთოდს უწოდებენ ბურთულიანი პოლიმერიზაციის მეთოდს, რომლის არსი შემდეგში მდგომარეობს: ინტენსიური მორევის პირობებში ფერმენტი მონომერებთან ერთად შეაქვთ ორგანულ ფაზაში. ამ დროს წარმოიქმნება ბურთულის ტიპის პოლიმერები, სადაც მოთავსებულია ფერმენტი. პოლიაკრილამიდის ბურთულების მოცულობები რაც უფრო მეტია, მით მეტია მათი ფერმენტული აქტივობა. ეს იმით აიხსნება, რომ ზედაპირითი ზედაპირის გადიდების გამო ფერმენტის უფრო მეტი რაოდენობა იღებს მონაწილეობას კატალიზში. ამ მეთოდით მიღებული უხსნადი ფერმენტები არ^ა საჭიროებენ ჰომოგენიზაციას და ამით ეს მეთოდი უფრო მისაღებად შეიძლება ჩაითვალოს. მაგრამ ამ მეთოდის ნაკლი იმაში მდგომარეობს, რომ ყველა ფერმენტი ვერ იტანს ორგანულ ფაზასთან კონტაქტს და კარგავს აქტივობას. ამიტომ ზოგიერთ შემთხვევაში ბურთულიანი პოლიმერიზაციის მეთოდი მიუღებელია და საჭიროა გამოინახოს სხვა, უფრო რბილი იმო-ბილიზაციის საშუალება.

იმობილიზაციის მესამე და ძირითადი მეთოდი მდგომარეობს კოვალენტური ბმის წარმოქმნაში ფერმენტსა და მატარებელს შორის. შესაძლებელია აგრეთვე თვით ფერმენტებს შორის კოვალენ-

ტური ბმების წარმოქმნა. რაც დაკავშირებულია უხსნადი ფერმენტული პოლიმერული აგრეგატების წარმოქმნასთან. იმისათვის, რომ წარმოქმნას კოვალენტური ბმა ფერმენტსა და მატარებელს შორის აუცილებელია შესაბამისი ქიმიური ჯგუფების არსებობა, როგორც მატარებელზე, ასევე ცილა-ფერმენტში. ფერმენტების ფუნქციურ ჯგუფებს შეადგენენ α და ϵ ამინოჯგუფები და ცისტეინის SH ჯგუფები. ამ ჯგუფებს გააჩნიათ კოვალენტური ბმის წარმოქმნის ყველაზე დიდი უნარი. ასევე აქტიურად შედიან რეაქციაში α , β , γ კარბოქსილისა და სერინის OH ჯგუფები (ნაშთები). შედარებით დაბალი რეაქციის უნარით ხასიათდებიან ჰისტიდინის იმიდაზოლური და ტიროზინის ფენოლური ჯგუფები. ყველა ამ ჯგუფების საშუალებით შესაძლებელია უხსნადი, კოვალენტურად მიმაგრებული ფერმენტების მიღება. უფრო ხშირად ამ მიზნებისათვის იყენებენ ლიზინის ϵ ამინო ჯგუფებს. კოვალენტური ბმის წარმოქმნელი რეაქცია, როგორც წესი მიმდინარეობს ერთ ან ორ სტადიად. პირველი იმაში მდგომარეობს, რომ მატარებელი უნდა გააქტიურდეს მასში რეაქციისუნარიანი ჯგუფის ჩანაცვლებით; მეორე სტადიაში კი ფერმენტის უშუალო მიერთება წარმოებს ჩანაცვლებული ჯგუფების საშუალებით. თუ იმობილიზაციაში მონაწილე ფერმენტის ესა თუ ის ფუნქციური ჯგუფი მონაწილეობას იღებს კატალიზის პროცესში, ამ შემთხვევაში მოსალოდნელია ფერმენტის ნაწილობრივი ან მთლიანი აქტივობის დაკარგვა. იმისათვის, რომ ადგილი არ ქონდეს აღნიშნულ მოვლენას, შემდეგნაირად იქცევიან: აწარმოებენ ფერმენტის აქტიურ ცენტრში შემავალი ფუნქციური ჯგუფების ბლოკირებას ინჰიბიტორებით, ხოლო მატარებელთან კოვალენტურად დაკავშირებას შემდეგ აქტიური ცენტრის ბლოკდას ხსნიან. უნდა აღინიშნოს, რომ ბლოკირებისათვის საჭიროა განსაკუთრებული თვისებების მქონე ინჰიბიტორების შერჩევა, რაც ძალზე მცირე ფერმენტებისათვის არის მოხერხებული. ამიტომ აქტიური ცენტრის ფუნქციური ჯგუფების ბლოკირების მეტად ეფექტური მეთოდი ჯერ-ჯერობით ფართოდ ვერ გამოიყენება.

იმობილიზებული ფერმენტების მატარებლად ჩვეულებრივად იხმარება ორგანული პოლიმერები და არაორგანული ტიპის მატარებლები, როგორიცაა: ბენტონიტი, ჰიდროქსილაპატიტი, სილიკა-გელი და სხვა. არაორგანული ტიპის მატარებლებს, ორგანულთან შედარებით მთელი რიგი უპირატესობანი გააჩნიათ: ჯერ ერთი, არაორგანული ტიპის მატარებლები არ განიცდიან კონფორმაციულ ცვლილებებს, ისინი მდგრადობას იჩენენ მიკრობული დაავადებების მიმართ. და ბოლოს, როგორც ირკვევა არაორგანულ მატარებ-

ლებზე იმობილიზებული ფერმენტები უფრო დიდხანს ინარჩუნებენ აქტივობას.

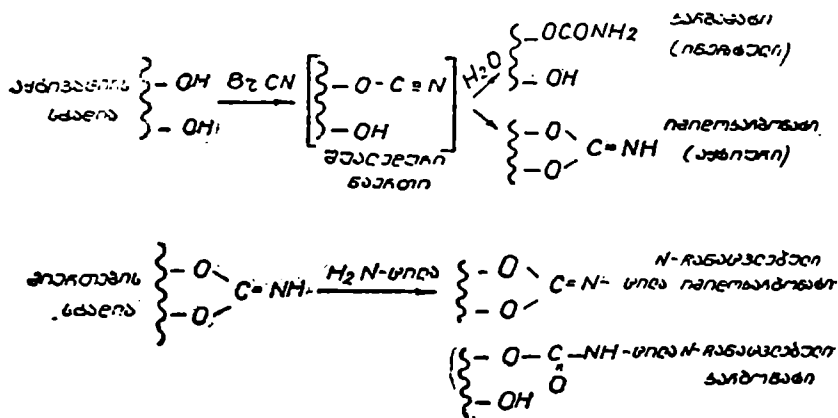
მიუხედავად არაორგანული მატარებლების ყველა ჩამოთვლილი დადებითი მხარეებისა, ორგანული პოლიმერებით ფერმენტების იმობილიზაცია უფრო ფართოდ გამოიყენება, იმიტომ, რომ ამ ფორმით იმობილიზებული ფერმენტების მიღება ტექნიკურად უფრო ადვილია და საწარმოო დანიშნულებისათვის მიზანშეწონილი.

იმობილიზაციისათვის გათვალისწინებული ორგანული პოლიმერები უნდა აკმაყოფილებდნენ მთელ რიგ აუცილებელ პირობებს: მათ უნდა ქონდეთ დაბალი ხსნადობა, გამძლეობა ქიმიური და ბიოქიმიური ზემოქმედებების მიმართ, არ უნდა ხდებოდეს იმობილიზებული ფერმენტების ინაქტივაცია და სხვა.

იმობილიზაციის მიზნებისათვის განკუთვნილი პოლიმერები, როგორც წესი, ჰიდროფილური ბუნებისაა. ჰიდროფობური პოლიმერები იწვევენ იმობილიზებული ფერმენტების ინჰიბირებას. ფერმენტული რეაქციები, როგორც წესი, წყალხსნარებში მიმდინარეობს, ჰიდროფობურ პოლიმერებს კი წყალთან შეკავშირების უნარი არ გააჩნიათ. ფერმენტების მატარებლებად გამოიყენება სხვადასხვა ბუნების მქონე ორგანული პოლიმერები, როგორცაა: პოლიპეპტიდები, სტიროლის, მალეინისა და მეტაკრილის მჟავის პოლიმერები, ცელულოზის წარმოებულები, ნეილონი, დექსტრანი, აგაროზა და სხვა.

ფერმენტის პოლიმერთან მიბმის პროცესი შეიძლება ერთ სტადიად მიმდინარეობდეს, თუ პოლიმერს გააჩნია ისეთი ქიმიური ჯგუფი, რომლითაც ის უშუალოდ შედის რეაქციაში ფერმენტის რომელიმე ფუნქციურ ჯგუფთან (მაგალითად განაპირა პოლიპეპტიდურ ჯაჭვზე მდებარე ამინო ჯგუფთან). ასეთი ტიპის პოლიმერია მალეინის ანჰიდრიდისა და ეთილენის თანაპოლიმერი. ამ ტიპის რეაქციაში მონაწილეობას იღებენ ფერმენტის ლიზინის ε-ამინო ჯგუფები, რომელთა საშუალებით ფერმენტი უკავშირდება პოლიმერს. განსაკუთრებით ხშირად ამ ტიპის იმობილიზაციას მიმართავენ პროტეოლიზური ფერმენტების შემთხვევაში. უფრო ხშირად უხსნადი ფერმენტის მისაღებად საჭიროა პოლიმერის გააქტივება მასში რეაქციისუნარიანი ჯგუფის შეყვანით. კარგი შედეგებია მიღებული, როდესაც იმობილიზაციისათვის განკუთვნილი ფერმენტი ბისდიზოზენზიდინით და გლუტარის ალდეჰიდით დაამუშავეს. სწორედ ამ გზითაა მიღებული პაპაინის, ქიმოტრიპსინის, ლიზოციმის, გლუკოამილაზის, კატალაზისა და გლუკოოქსიდაზის იმობილიზებული ფორმები.

ფერმენტების უხსნადი ფორმების მისაღებად ყველაზე გავრცელებულ მეთოდად მიჩნეულია პოლისაქარიდების დამუშავება ციანპალოდებით ტუტე არეში, განსაკუთრებით BrCN -ით. ამ დროს წარმოიქმნება იმიდოკარბონატები და კარბამინის მჟავას ეთერები. ისინი ხასიათდებიან სტაბილობით და ამავე დროს ინერტულობით. ტუტე არეში იმიდოკარბონატები სწრაფად შედიან რეაქციაში ცილების თავისუფალ ამინოჯგუფებთან. ასეთი გზით მიღებულია იმობილიზებული β -გალაქტოზიდაზა, პექსოკინაზა, დეზოქსირიბონუკლეაზა, რენინი, რიბონუკლეაზა, პაპაინი და ქიმოტრიპსინი. 54 სურათზე წარმოდგენილია პოლისაქარიდების აქტივაცია ბრომციანის საშუალებით.



სურ. 54. პოლისაქარიდების აქტივაცია ბრომციანის საშუალებით.

ჰიდროქსილის ჯგუფების შემცველ პოლიმერების გასააქტივებელ აგენტად ხშირად იყენებენ ქლოროვან ციანურს (2,4,6 სამ-ქლორ-S-ტრიზინი) და მის ზოგიერთ წარმოებულს. განსაკუთრებით მოხერხებული გამოდგა 2-ამინო-4.6-დიქლორ-S-ტრიზინი. ამ რეაგენტებით ცელულოზაზე და მის ზოგიერთ ფორმაზე ზემოქმედებით წარმოიქმნება α -ამილაზის, პენიცილინაზის, გიალურონიდაზის და ტრიპსინის უხსნადი ფორმები.

იმობილიზებული ფერმენტების მიღების ერთ-ერთ ძირითად მეთოდად აღიარებულია აგრეთვე ცილების ქიმიური დაკავშირება გზავე აზიდებთან და პოლიმერების პოლიდიზონურ წარმოებულებთან. გარდა ამისა უკანასკნელ ხანებში ფართოდ გამოიყენება უხსნადი ფერმენტების მიღება გლუტარის ალდეჰიდით, კარბოდიმიდით და დიაზოშეუღლების მეთოდებით.

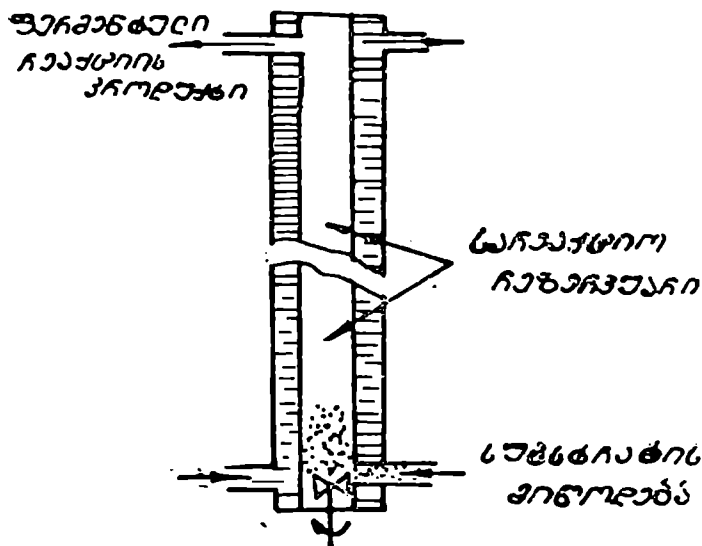
ზემოთ განხილული იმობილიზაციის მეთოდების გარდა, არსებობს კიდევ უხსნადი ფერმენტების მიღების მთელი რიგი შედარებით ნაკლებად მნიშვნელოვანი ხერხები. არსებული მეთოდების ასეთი სიმრავლე იმით აიხსნება, რომ თითოეული ფერმენტი მოითხოვს ინდივიდუალურ მიდგომას, იმობილიზაციის გარკვეულ რეჟიმს: ტემპერატურის, pH-ის, ორგანული გამხსნელის შერჩევას და ზევრ სხვადასხვა ურთიერთგანსხვავებულ პირობებს. ხშირად იმობილიზაციისათვის ხელსაყრელი წყალბადიონთა კონცენტრაცია ცილის იზოელექტრულ წერტილს ემთხვევა, ზოგჯერ კი, ფერმენტის მოქმედების pH-ოპტიმუმს შეადგენს. ფერმენტების კონფორმაციული და სტერიული სირთულით განიმარტება უხსნადი ფერმენტების ეფექტური ფორმების მიღების მეთოდების სიმრავლე და არაერთგვაროვნება. ყველა ზემოთ აღნიშნული ხერხით იმობილიზებულ ფერმენტს გააჩნია შედარებით დაბალი ხვედრითი აქტივობა, რაც აიხსნება იმით, რომ პოლიმერი უკავშირდება ცილის რომელიმე ფუნქციურ ჯგუფს ქიმიური ბმით და თუ ეს ჯგუფი რამენაირად დაკავშირებულია კატალიზის აქტთან, ფერმენტის აქტივობა მცირდება. დღეისათვის ცნობილ პოლიმერებზე იმობილიზებული ფერმენტების აქტივობა შეადგენს 4,0—5,0%-დან (ფიცინი), 70,0%-მდე (პაპაინი), ნატიურ ცილასთან შედარებით.

უხსნადი ფერმენტების აქტივობის შემცირების მიზეზებად შეიძლება აგრეთვე ჩაითვალოს პოლიმერთან ქიმიურად დაკავშირებული ფერმენტების ურთიერთქმედებები, სუბსტრატის აქტიურ ცენტრთან მიდგომის სტერიული სიძნელეები და სხვა. მაგრამ ფერმენტების აქტივობის ნაწილობრივი დაკარგვა მთლიანად კომპენსირდება მათი მდგრადობის გაზრდით, გარეგანი პირობების შეცვლასთან დაკავშირებით. ასე მაგალითად, უხსნადი ფერმენტები, როგორც წესი, მეტ მდგრადობას იჩენენ ტემპერატურისა და pH-ის ცვლილებების მიმართ, გაცილებით უფრო დიდხანს ინარჩუნებენ აქტივობას, იზრდება იმობილიზებული ფერმენტების მდგრადობა დეტერგენტების მიმართ, მაგალითად აგაროზაზე იმობილიზებული ტრიპსინი არ კარგავს აქტივობას 8 M შარღოვანასთან ინკუბაციის შემდეგაც კი.

უხსნადი ფერმენტების მდგრადობის გაზრდა და მათი მყარ პოლიმერებთან დაკავშირება საშუალებას იძლევა გაიზარდოს ფერმენტების გამოყენების დიაპაზონი როგორც მედიცინაში, ასევე მრეწველობის სხვადასხვა დარგებში. ძირითადი უპირატესობა იმობილიზებული ფერმენტებისა იმაში მდგომარეობს, რომ მათი მრავალჯერადი გამოყენების საშუალებას იძლევა, რის შედეგადაც პო-

ლიმერთან დაკავშირებული ფერმენტების აქტივობა არ იკარგება. სუბსტრატთან მოქმედების შემდეგ, როდესაც სასურველი ფერმენტული გარდაქმნა მომხდარია, ხსნარი იფილტრება და მიღებული ნალექი იმობილიზებული ფერმენტების სახით შეიძლება კვლავ იქნეს გამოყენებული.

როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული ფერმენტების იმობილიზებული ფორმები ფართო გამოყენებას პოულობენ მედიცინაში და კვების მრეწველობაში. განსაკუთრებით ფართოდ შეისწავლება იმობილიზებული α -და გლუკოამილაზის საშუალებით სახამებლის ჰიდროლიზი გლუკოზამდე. იმობილიზებული პროტეაზები გამოიყენება ლუდის სტაბილიზაციისათვის, ინვერტაზა საკონდიტრო წარმოებაში. ხოლო იმობილიზებული პექტინაზები ხილეულის წვენი-საგან ღვინოების წარმოების დროს. 55 სურათზე ასახულია იმობილიზებული ფერმენტებისათვის განკუთვნილი უწყვეტი მოქმედების რეაქტორი.



სურ. 55. იმობილიზებული ფერმენტებისათვის განკუთვნილი უწყვეტი მოქმედების რეაქტორის სქემა.

სამედიცინო მრეწველობაში იმობილიზებული ფერმენტების საშუალებით წარმოებს რაცემული ნაერთების დაყოფა ცალკეულ ოპტიკურ იზომერებად. ამ მეთოდით მიიღება L-რიგის ამინომჟ-

ვები, ეფედრინი, მენტოლი, ბიოტინი, ვიტამინები და ზოგიერთი სხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთი.

ჩამოთვლილი თვისებების გარდა აღმოჩნდა, რომ იმობილიზებულ ფერმენტებს გაცილებით დაქვეითებული აქვთ ანტიგენური თვისებები. ინტენაიურად შეისწავლება იმობილიზებული ფერმენტების გამოყენების პრინციპი ორგანიზმში ზოგიერთი ფერმენტების მოქმედების გაძლიერების თვალსაზრისით.

ყველაფერი ზემოთ აღნიშნული მიუთითებს იმაზე, რომ იმობილიზებული ფერმენტების გამოყენებას მეტად ფართო პერსპექტივა აქვს. ჭერკერობით ამ ფორმით ფერმენტების მიღება შედარებით ახალი მიმართულებაა და მომავალში ალბათ იმობილიზებული ფერმენტი იქნება ფერმენტების ის ძირითადი ფორმა, რომლითაც ეს უკანასკნელნი იქნებიან გამოყენებულნი.

ლიტერატურა

1. Квеситадзе Г. И., Тохадзе З. В., Двали М. Ш., Брегвадзе Ц. Р., Фрайкина Т. Я. Известия АН ГССР, «Серия биологическая», т. 1, № 2, 1975, 154—159.
 2. Николаев А. Я., Биохимия, 1962, 27, 843.
 3. Мосолов В. В., Лушиикова Е. А., Успехи биологической химии, том XIV, стр. 146—171, 1974.
 4. Immobilized Enzymes, by Oskar Zahorsky. CRC. Press Cleveland, Ohio, 1974.
-

ცილის რაოდენობის განსაზღვრა

ფერმენტების გამოყოფისა და გაწმენდის პროცესში, აუცილებელია წარმოდგენა ვიქონიოთ ფერმენტების სისუფთავის ხარისხზე, ანუ ფერმენტის ხვედრით აქტივობაზე. ამიტომ საჭიროა გაწმენდის ყოველ საფეხურზე ფერმენტულ პრეპარატში ისაზღვრებოდეს ცილის რაოდენობა. ამჟამად, ცილის რაოდენობის განსაზღვრის მიღებული და გავრცელებული მეთოდებია ლოურისა და თანავტორების, ბიურეტის, ვარბურგისა და კრისტიანის, კელდალისა და სხვა მეთოდები.

მათოდო ბიურეტის რეაქტივის გამოყენებით

ცილის ხსნარზე სპილენძის ტუტე ხსნარის დამატებისას წარმოიქმნება იისფერი შეფერვა, რომლის ინტენსივობა ცილის კონცენტრაციის პროპორციულია. შეფერვა განპირობებულია ცილის მოლეკულაში პეპტიდური ბმების არსებობით. ბიურეტის რეაქციას იძლევიან პოლიპეტიდებიც. რეაქციის წარმართვისათვის საჭიროა არანაკლებ ორი პეპტიდური ბმის არსებობა.

ბიურეტის რეაქტივი მზადდება შემდეგნაირად: 250 მლ გამოხდილ წყალს უმატებენ 0.75 გ სპილენძის სულფატს ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) და 3.0 გ ღვინის მჟავა Na, K-ს ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). შემდეგ ენერგიული მორევის პირობებში უმატებენ 150 მლ 10%-იან NaOH (Na_2CO_3 -გან თავისუფალს) და 1 გ KJ. საერთო მოცულობა მიყავთ 1 ლ-მდე. რეაქტივი ინახება პოლიეთილენის ჭურჭელში ან კოლბაში. რომელიც შიგნიდან დაფარულია პარაფინით.

წინასწარ აგებენ საკალიბრო მრუდს. ცილის განსაზღვრა ხდება შემდეგნაირად: 1 მლ საკვლევი ცილის ხსნარს უმატებენ 4 მლ ბიურეტის რეაქტივს, კარგად ურევენ და აყოვნებენ 30 წთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. წარმოქმნილი შეფერვის ინ-

ტენსიობას საზღვრავენ სპექტროფოტომეტრზე 540—550 ნმ დიაპაზონის ნებისმიერ ტალღაზე ან ფოტოელექტროკოლორიმეტრზე შესაფერისი ფილტრის გამოყენებით. ათვლა ხდება იმ საკონტროლო ხსნარის მიმართ, რომელიც შეიცავს ყველა კომპონენტის ცილის გარდა. საკალიბრო მრუდის საშუალებით ისაზღვრება ცილის რაოდენობა საკვლევ ნიმუშში. საკვლევი ცილის ხსნარი თავისუფალი უნდა იყოს ამონიუმის მარილებისაგან, რადგან მათი თანამყოფობის შემთხვევაში წარმოიქმნება შეფერილი სილენდ-ამონიაკური კომპლექსები. მეთოდი კარგ შედეგს იძლევა, როდესაც საკვლევ ნიმუშში ცილის რაოდენობა მერყეობს 1—10 მგ-ის ფარგლებში. ცნობილია ამ მეთოდის მიკროვარიანტები, რომლებიც საშუალებას იძლევიან განვსაზღვროთ ცილები 0,1 მგ/მლ კონცენტრაციაში.

ლოურის და თანაავტორების მეთოდი

ყველაზე მგრძნობიარე, სპეციფიკური, ზუსტი და მოხერხებული მეთოდია. ამ მეთოდში შესაბამებელია ბიურეტისა და ფოლინის რეაქციები. პირველი, როგორც ვთქვით, პეპტიდურ ბმებზეა დამოკიდებული, მეორე კი ცილის მოლეკულაში არსებული არომატული ამინომჟავების — ტიროზინისა და ტრიპტოფანის შემცველობაზე. ამ მეთოდით შესაძლებელია განისაზღვროს 0,01 მგ/მლ და ნაკლები ცილა. აქაც, ისევე როგორც ბიურეტის მეთოდის შემთხვევაში, წინასწარ რომელიმე ცილა-ალბუმინზე აგებენ საკალიბრო მრუდს.

მეთოდში გამოიყენება შემდეგი რეაქტივები:

- ა) 2%-იანი Na_2CO_3 0,1 M NaOH-ის ხსნარში
- ბ) 0,5%-იანი $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%-იანი ნატრიუმის ციტრატში
- გ) 50 მლ „ა“-ს ემატება 1 მლ „ბ“. ნარევი მზადდება უშუალოდ ზმარების წინ.

დ) ფოლინის რეაქტივი. 1 ლიტრიდან მრგვალიძირა კოლბაში ათავსებენ 350 მლ გამოხდილ წყალს, უმატებენ 50 გ ნატრიუმის ვოლფრამატს ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 12,5 გ ნატრიუმის მოლიბდატს ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) და კარგად შეურევენ სრულ გახსნამდე. მიღებულ ხსნარს უმატებენ 25 მლ 85%-იან ორთოფოსფორის მჟავას და 50 მლ კონცენტრირებულ მარილმჟავას. ნარევის აღულებენ უკუმაკერით 10 საათის განმავლობაში. შემდეგ უმატებენ 75 გ ლითიუმის სულფატს, 25 მლ გამოხდილ წყალს და სამ წვეთ ბრომს. აღულებენ მაკივრის გარეშე 15 წუთის განმავლობაში (ამწოვ კარადაში) ქარბი ბრომის მოსაცილებლად. აცივებენ ოთახის ტემპერატურამ-

დე და გამოხდილი წყლით შეავსებენ 500 მლ-მდე. კარგად ურევენ და ფილტრავენ. მიღებულ ხსნარს ანზავებენ ისეთნაირად, რომ ზედა კონცენტრაცია ხსნარში იყოს 1 N. პრაქტიკულად ამისათვის ფოლინის რეაქტივს ანზავებენ ორჯერ. რეაქტივი ინახება შეფერილ მინის ჭურჭელში.

ცილის განსაზღვრას აწარმოებენ შემდეგნაირად: საკვლევი ცილის ხსნარს ანზავებენ ისეთნაირად, რომ მისი 0,4 მლ შეიცავდეს 10—100 მიკროგრამ ცილას. უმატებენ 2 მლ რეაქტივ „გ“-ს და აუოვნებენ ზუსტად 10 წთ-ის განმავლობაში (ოთახის ტემპერატურაზე). შემდეგ უმატებენ 0,2 მლ ფოლინის რეაქტივს, კარგად აურევენ და აუოვნებენ ისევ ოთახის ტემპერატურაზე 0,5 სთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც საზღვრავენ ოპტიკურ სიმკვრივეს სპექტროფოტომეტრზე 750 ნმ ან ფოტოელექტრულ კოლორიმეტრზე შესაბამისი ფილტრის გამოყენებით. საკონტროლოა ვარიანტი, რომელიც შეიცავს ყველა კომპონენტს ცილის გამოკლებით.

ზოგიერთი ნივთიერება, როგორიცაა ამინომჟავები, ფენოლური ნაერთები ნუკლეინის მჟავები და სხვა, დაბალმოლეკულური ნაერთები ხელს უშლიან ამ მეთოდით ცილის განსაზღვრას. საქმე იმაშია, რომ ისინი ფოლინის რეაქტივთან იძლევიან შეფერვას. ამიტომ ამ მეთოდით ცილის განსაზღვრის დროს აუცილებელია ცილის ხსნარის მაქსიმალური განთავისუფლება ყველა იმ ნივთიერებებისაგან, რომლებიც იძლევიან. დადებით შეფერვას ფოლინის რეაქტივთან. ამისათვის მიმართავენ დიალიზს ან გელფილტრაციას. ზოგჯერ ცილის ხსნარში საზღვრავენ შეფერვის ინტენსივობას, შემდეგ ცილას ლექავენ (მაგალითად, 10%-იანი სამქლორმმარმჟავით), აცილებენ ცენტრიფუგირებით და დარჩენილ ხსნარში კვლავ საზღვრავენ შეფერვის ინტენსივობას. პირველ შემთხვევაში შეფერვა განპირობებულია როგორც ცილით, ისე ფოლინის რეაქტივზე სხვა დადებითი ნაერთებით, მეორე შემთხვევაში კი მარტო ფოლინზე დადებითი ნაერთებით. ცხადია, რომ მათი ინტენსივობების სხვაობა შეესაბამება ხსნარში მყოფ ცილის რაოდენობას. ლოურის მეთოდით ცილის განსაზღვრა არ შეიძლება ფოსფატის ბუფერში თუ მისი მოლარობა 0,1-ზე მეტია. ამ დროს ხდება ნალექის წარმოქმნა. ამინომჟავა გლიცინი 50%-ით ამცირებს შეფერვის ინტენსივობას.

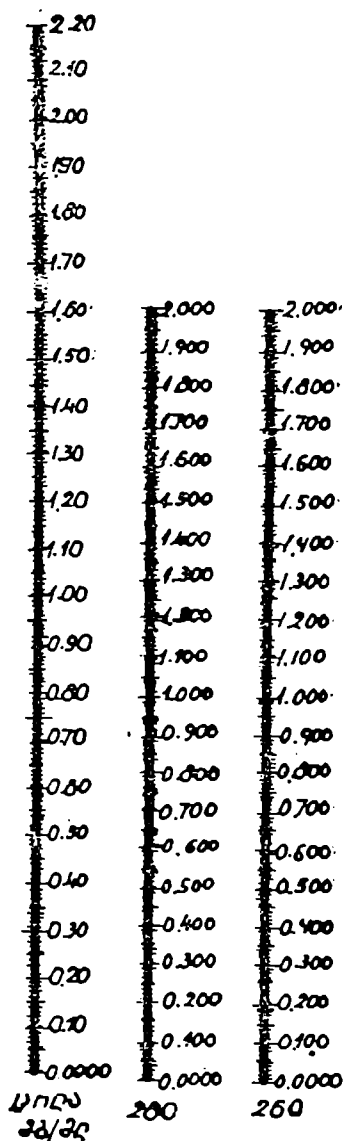
პარაზრებისა და კრისტინის მეთოდი

მეთოდი დამყარებულია ცილებში შემავალი არომატული ამინომჟავების (ტრიპტოფანი, ტიროზინი) უნარზე შთანთქონ ულტრაიისფერი სხივები. შთანთქმის მაქსიმუმი 280 ნმ, მაგრამ ამ ტალ-

ლაზე გარკვეული (ზოგჯერ უფრო მეტიც ვიდრე ცილას) შთანთქმით ხასიათდებიან ნუკლეინის მჟავები, თუმცა მათი შთანთქმის მაქსიმუმი 260 ნმ. ვარბუზება და კრისტიანმა გახსაზღვრეს რა ცილისა და ნუკლეინის მჟავების ნარევის შთანთქმა 260 და 280 ნმ-ზე, მოგვაწოდეს მონაცემები, რომელთა საფუძველზე შეიძლება უცნობ ნიმუშში განისაზღვროს ცილის რაოდენობა იმ პირობით, თუ ხსნარში ნუკლეინის მჟავების რაოდენობა არ აღემატება 20%-ს. სპეციალური ცხრილებისა და სპეციალური ნომოგრამის საშუალებით შეიძლება გათვლილი იქნას ცილის რაოდენობა მგ/მლ (სურ. 56).

კალკარმა ცხრილებისა და ნომოგრამების ნაცვალად მოგვაწოდა ფორმულა ცილა მგ/მლ = $1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$. ცილის განსაზღვრის ეს მეთოდი სწრაფია. მაგრამ ნაკლებ მგრძნობიარე. მიუხედავად ამისა ცილების გამოყოფისა და გაწმენდის პროცესში უპირატესად სარგებლობენ ამ მეთოდით. მისი უპირატესობა კიდევ ის არის, რომ იგი არ მოითხოვს რაიმე სპეციალურ რეაგენტებს და ცილის ხსნარი განსაზღვრის შემდეგ არ იღვრება. ამ მეთოდით შეფერილი ცილის ხსნარების ანალიზი იძლევა მსოლოდ შესაღარებელ შედეგებს.

სურ. 56. 260 და 280 ნმ ოპტიკური სიმკვრივის მიხედვით ცილის რაოდენობრივი განსაზღვრის ნომოგრამა.



როგორც ცნობილია, ცილები შეიცავენ საშუალოდ 16% აზოტს. ამიტომ ცილის საერთო აზოტის რაოდენობის განსაზღვრით შეიძლება წარმოდგენა ვიქონიოთ ცილის რაოდენობაზე. ამ მიზნით სარგებლობენ ე. წ. ცილის კოეფიციენტით, რომელიც გვიჩვენებს ცილის რაოდენობა შეესაბამება ერთ გ აზოტს. ცილის კოეფიციენტი 6,25-ის ტოლია. ამ ციფრის გამრავლებით აზოტის პროცენტული შემცველობის გამომსახველ რიცხვზე მიიღება ცილის რაოდენობა პროცენტებში. უნდა გვახსოვდეს, რომ ამ კოეფიციენტის გამოყენებისას დიდი სიფრთხილეა საჭირო. საქმე იმაშია, რომ გადამყვანი კოეფიციენტი 6,25 საშუალო სიდიდეა, ხოლო ზოგიერთი ცილებისათვის შეინიშნება აზოტის შემცველობის საშუალო სიდიდიდან საგრძნობი გადახრა. განსაკუთრებით ეს იგრძნობა უჯრედის ბირთვის ფუძე ცილების შემთხვევაში. მაგრამ, როგორც წესი, უმრავლესი ცილებისათვის ეს გადახრა არ აღემატება 5—10%.

ცილის საერთო აზოტის განსაზღვრის მეთოდებიდან ყველაზე ზუსტი და ამიტომ, ყველაზე მიღებული და გავრცელებულია კელდალის მეთოდი. მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს ცილის სველა გზით დაწვაში, რის შედეგად აზოტი მთლიანად გარდაიქმნება ამონიაკად, რომელიც შეიბოჭება გოგირდმჟავას მიერ. შემდეგ ამონიაკი ტუტის მოქმედებით გამოიხდება და გაიტიტრება ანდა განისაზღვრება ნესლეის რეაქტივით. პრაქტიკულად ეს შემდგენაირად ხორციელდება. კელდალის სპეციალურ კოლბებში შეაქვთ საკვლევი ნიმუში, მაგალითად, 0,1 გრამის რაოდენობით, უმატებენ კატალიზატორად 0,5 გ სპილენძის სულფატს, 2—3 გ კალიუმის სულფატს (დულილის ტემპერატურის ასაწევად) და 10 მლ კონცენტრირებულ გოგირდმჟავას. კოლბებს ათავსებენ ქურაზე დახრილ მდგომარეობაში (წვა ხორციელდება აუცილებლად ამწოვ კარადაში). წვა დამთავრებულად ჩაითვლება, როდესაც კოლბაში მოთავსებული ხსნარი გახდება გამჭვირვალე (ოდნავ მოცისფრო). დაწვის დამთავრების შემდეგ კოლბის შიგთავსი გადააქვთ გამოსახდელ (მრგვალძირა) კოლბებში, უმატებენ 200—300 მლ გამოხდილ წყალს (მოცულობის გაზრდის მიზნით) და მცირე რაოდენობით მინის კაპილარებს ან ბურთულებს (თანაბარი დულილისათვის). გადამდენ კოლბას მიუერთებენ მაცივარს წვეთდამქვრის საშუალებით და ძაბრს. ძაბრის საშუალებით ხდება 33%-იანი ნატრიუმის ტუტის დამატება (დამატება ხდება მანამ, სანამ სითხე არ მიიღებს ცისფერ შეფერვას სპილენძის ენაგის ჰიდრატის წარმოქმნის გამო). ამონიაკის სრული გადადენისათვის საჭიროა კოლბის შიგთავსის აღუღება. კოლ-

ბიდან გადაღენილი ამონიაკის შებოჭვა ზორციელდება მიმღებში (კონუსურ კოლბაში), სადაც მოთავსებულია 20 მლ 0,1 N გოგირდ-ზჟავას ხსნარი და რამდენიმე წვეთი ინდიკატორი (მეთილის წითელი). ამონიაკის გადაღენის დამთავრების შემდეგ მიმღების შიგთავსი იტიტრება 0,1 N ნატრიუმის ტუტის ხსნარით. ცხადია, ამ დროს გაიტიტრება თავისუფალი, ამონიაკთან რეაქციაში შეუსვლელი, შეუბოჭავი გოგირდმჟავა. გატიტრების წერტილის აღგენენ ინდიკატორის საშუალებით. აზოტის პროცენტული შემცველობის განსაზღვრისათვის უნდა ვიცოდეთ, რომ თეორიულად 1 მლ 0,1 N H_2SO_4 ბოჭავს 0,0014 გ აზოტს. მაგალითად, თუ 20 მლ 0,1 N H_2SO_4 -ის გატიტრებაზე დაიხარჯა 10 მლ 0,1 N NaOH, მაშინ $20 - 10 = 10$ მლ გოგირდმჟავას ხსნარი ყოფილა შებოჭილი ამონიაკით (იტიტრება შეუბოჭავი გოგირდმჟავა), ცხადია, 10 მლ 0,1 N H_2SO_4 შებოჭავს 0,014 გ აზოტს. რამდენადაც მთელი შებოჭილი ამონიაკი მიღებულ იქნა 0,1 გ მასალიდან (ჩვენს შემთხვევაში), ამიტომ აზოტის პროცენტული შემცველობა ტოლი იქნება $\frac{0,014 \cdot 100}{0,1} = 14\%$. ხოლო ცილის $14 \times 6,25 = 87,5\%$

ამიდოშავით შელეპვის ამთოღი

ცილის რაოდენობის განსაზღვრისათვის მეთოდის შერჩევა დამოკიდებულია საექსტრაქციო ხსნარის შემადგენლობაზე და ობიექტზე. თუ საექსტრაქციო ხსნარი შეიცავს ტრის — HCl -ის ბუფერს, რეკომენდირებული არ არის ბიურეტის მეთოდის გამოყენება, რადგან ტრისი აფერხებს ცილა-ბიურეტის რეაქტივის კომპლექსის შეფერვის გამომჟღავნებას.

ფენოლური ნაერთებითა და აზოტით მდიდარი ობიექტებიდან (მაგალითად, ვაზი, ჩაი) მიღებულ ექსტრაქტებში ცილის რაოდენობის განსაზღვრისათვის არ გამოდგება ლოურის (ფოლინის რეაქტივი ფენოლურ ნაერთებთან იძლევა შეფერვას) და კელდალის (ექსტრაქტში აზოტის დიდი რაოდენობით შემცველობის გამო) მეთოდები. ამ შემთხვევაში იყენებენ ამიდოშავით შელეპვის მეთოდს.

ცილის ხსნარზე ამიდოშავის დამატებისას წარმოიქმნება შავი მილურჯო შეფერვა. ხსნარის დაცენტრიფუგირების შემდეგ (მოცილდება ცილა-საღებავის კომპლექსი) მიღებული სუპერნატანტის შეფერვის ინტენსივობა უკუპროპორციულია ცილის რაოდენობისა საკვლევ ხსნარში, ე. ი. რაც უფრო მეტია ცილა, მით უფრო მეტი

ცილა-ამიდოშავის კომპლექსი გამოილექება და ამიტომაც სუპერნატანტი უფრო ბაცი იქნება.

რეაქტივი: ლიმონის მჟავა — 37,65 გ

ნატრიუმის ფოსფატი (ორჩანაცვლებული) — 1.136 გ

ამიდოშავი — 0,60 გ

შეავსებენ გამოხდილი წყლით ერთ ლიტრამდე.

ცილის განსაზღვრა ხდება შემდეგნაირად:

1 მლ საკვლევ ხსნარს უმატებენ 2 მლ რეაქტივს, კარგად ურევენ და აყოვნებენ 10 წთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ აცენტრიფუგირებენ 5000 ბრ/წთ 15 წთ-ის განმავლობაში. დაილექება ცილა-საღებავის კომპლექსი. სუპერნატანტის 1 მლ ვადააქვთ 25 მლ-იან კოლბაში და შეავსებენ გამოხდილი წყლით. ხსნარის შეფერვის ინტენსივობას საზღვრავენ სპექტროფოტომეტრზე 600 ნმ ან ფოტოელექტროკოლორიმეტრზე (შუქფილტრი № 8, წითელი). წინასწარ აგებენ საკალიბრო მრუდს. ეს მეთოდი ნაკლებ მგრძნობიარეა.

ფერმენტების გამოყოფისა და გაწმენდის შემდეგ მიღებული მონაცემები სასურველია წარმოდგენილ იქნას სპეციალურ ცხრილში, რომელსაც შეჯამებულ ცხრილს უწოდებენ (ცხრილი 8). ამ ცხრილის საშუალებით ნათლად ჩანს გაწმენდის თითოეული მეთოდის ეფექტურობა, გაწმენდის ხარისხი, ფერმენტის გამოსავალი და საერთოდ ფრაქციონირების მთელი სურათი, მიმდინარეობა. ქვემოთ მოცემულია ერთ-ერთი ფერმენტის, ბარდის მალატდეჰიდროგენაზის ნაწილობრივი გაწმენდის შეჯამებული ცხრილი.

ცხრილი 8

ბარდის მალატდეჰიდროგენაზის გაწმენდის შეჯამებული ცხრილი

ფრაქციები	საერთო მოცულობა, მლ	ცილა, მგ/მლ	საერთო ცილა, მგ	აქტივობა 1 მლ-ზე, ერთეული	საერთო აქტივობა, ერთეული	ხეცდრითი აქტივობა, ერთეული	გაწმენდის ხარისხი, გრ-ლი	ფერმენტის გამოსავალი, %	ცილა, როგორც ფერმენტი, %
პომოგენანტი	80	13,5	1080	67500	5400000	500	1	100	1,25
ღიალიზირებული ექსტრაქტი	70	3,7	260	74000	5200000	20000	4	56	5,00
ფრაქცია 60—100% ამონიუმის სულფატით დალექილი	40	1,05	42	105000	4200000	100000	20	77	25
ელუატი დეაჟ-ცელულოზის სეფტიდან	30	0,15	4,5	60000	1800000	400000	80	33	100

საერთო ცილა — ეს არის საერთო მოცულობისა და ცილის მგ/მლ გამომხატველი რიცხვების ნამრავლი.

საერთო აქტივობა — ეს არის საერთო მოცულობისა და 1 მლ-ზე აქტივობის გამომხატველი რიცხვების ნამრავლი, ან ზვედრითი აქტივობისა და საერთო ცილის გამომხატველი რიცხვების ნამრავლი.

ზვედრითი აქტივობა მიიღება საერთო აქტივობის გამომხატველი რიცხვის გაყოფით საერთო ცილის გამომხატველ რიცხვზე. გაწმენდის ხარისხი ყოველ საფეხურზე ეს არის ზვედრითი აქტივობის გამომხატველი რიცხვების შეფარდება. საწყის ფრაქციაში ზვედრითი აქტივობა მიიღება ერთი ტოლად. ფერმენტის გამოსავალი პროცენტებში გამოიოვლება საერთო აქტივობიდან. საერთო აქტივობა საწყის ფრაქციაში მიღებულია 100 პროცენტად. ზოგიერთ შემთხვევაში ცხრილი შეიცავს კიდევ ერთ სვეტს — ფერმენტის რაოდენობა საწყის ფრაქციაში, ან ცილა, როგორც ფერმენტი, პროცენტებში. იგი მიიღება ზვედრითი აქტივობიდან. ზვედრითი აქტივობა გაწმენდის ბოლოს მიღებულია 100%-ად. ზოგჯერ საწყის ფრაქციაში არ ხერხდება ზვედრითი აქტივობის ზუსტი განსაზღვრა, რაც აძნელებს გაწმენდის ხარისხის ზუსტ გარკვევას. ასეთ შემთხვევაში გაწმენდის ხარისხს ანგარიშობენ მეორე ფრაქციის მიმართ.

ლიტერატურა

1. Бэнли Дж., Методы химии белков. М., «Мир», 1965.
2. Верболовнич П. А., Полусухина Т. Я., и др., Практикум по органической, физической, коллоидной и биологической химии. Алма-Ата, «Наука», 1973.
3. Кочетов Г. А., Практическое руководство по энзимологии. М., «Высшая школа», 1971.
4. Methods in Enzymology. Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, N. Y: Academic Press vol. III, 1957. Oxidation and phosphorylation vol. XII, 1963. Citric acid cycle.

ოქსიდორმდუშტაზების აქტივობის რაოდენობითი
ბანსაზღვრა.

მალატდეჰიდროგენაზა

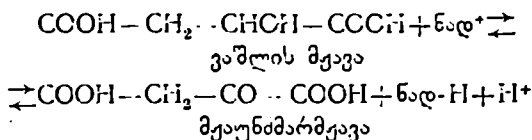
(ფა 1. 1. 1. 37, L-მალატ: ნად—ოქსიდორმდუშტაზა)

მალატდეჰიდროგენაზა კრების ციკლში მონაწილე ფერმენტია და ამდენად ის დაკავშირებულია სუნთქვის პროცესებთან და ენერგიის ცვლასთან. უკრედში მალატდეჰიდროგენაზა სხვა დეჰიდროგენაზებთან შედარებით წარმოდგენილია საკმაოდ დიდი რაოდენობით. მალატდეჰიდროგენაზის სუბსტრატი — მჟაუნძმარმჟავა არის ამინოაზოტის აქცეპტორი გლუტამინის მჟავას დეზამინირების დროს. აცეტილის აქცეპტორი პირუვატისა და ცხიმოვანი მჟავების კრების ციკლში ჩართვის პროცესში, ფოსფოენოლპირუვატის წინაპორბედი ნახშირწყლების სინთეზში და ა. შ. ყოველგვან ზემოთქმულის გამო ცხადია, თუ რა დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ამ ფერმენტს უკრედის ნორმალური ფუნქციონირებისა და რეგულირებისათვის.

მალატდეჰიდროგენაზა მიეკუთვნება საკმაოდ კარგად შესწავლილ ფერმენტთა რიცხვს. მიუხედავად ამისა დღეისათვის არ არის ერთიანი აზრი სუბუკრედულ სტრუქტურებში ამ ფერმენტის ლოკალიზაციის შესახებ. ნაკლებადაა ცნობილი ფერმენტის რეგულატორული თვისებები. არაა გაშიფრული მისი პირველადი სტრუქტურა და აქტიური ცენტრის შენება.

ფერმენტ მალატდეჰიდროგენაზის მოქმედების შედეგად ვაშლის მჟავა (მალატი) გადადის მჟაუნძმარმჟავაში და პირიქით. ამ რეაქციის წარმართვისათვის აუცილებელია კოფერმენტი — ნიკოტინამიდადენინდინუკლეოტიდი (ნად-ი). ვაშლის მჟავის დაჟანგვისათვის გამოიყენება კოფერმენტის დაჟანგული — ნად⁺, ხოლო

მეაუნდმარმეავის ალდგენისათვის კოფერმენტის ალდგენილი — ნად- H_2 ფორმები.



მეაუნდმარმეავის ალდგენის რეაქციის სიჩქარე ისაზღვრება სპექტროფოტომეტრული მეთოდით ულტრაიისფერ არეში 340 ნმ-ზე, დროის ერთეულში ნად- H_2 -ის ჟანგვის ხარისხის მიხედვით. ეს მტკიცდება საარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივის შემცირებით. ვაშლის მეავას დაჟანგვის რეაქციის სიჩქარე ისაზღვრება იმავე ტალღაზე დროის ერთეულში ნად⁺-ის ალდგენის ხარისხის მიხედვით. ამ შემთხვევაში ნად⁻-ის ალდგენის ხარისხი გამოიხატება უკვე საარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივის გაზრდაში. საქმე იმაშია, რომ ნად-ის (ასევე ნადფ-ის) დაჟანგული და ალდგენილი ფორმები, როგორც ამაზე უკვე მითითებული იყო, მკვეთრად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან თავიანთი შთანთქმის სპექტრებით, სახელდობრ 340 ნმ-ზე (სურ. 47).

როგორც 47 სურათიდან ჩანს, ნად- H_2 -ს 340 ნმ-ზე აქვს შთანთქმის პიკი, ნად⁺-ს კი არა. როდესაც ხდება ნად- H_2 -ის ჟანგვა, ე. ი. ნად⁺-ის წირმოქმნა, ბუნებრივი ხდება ნად- H_2 -ის რაოდენობრივი შემცირება და აქედან გამომდინარე შთანთქმის შემცირებაც და პირიქით, როდესაც ადგილი აქვს ნად⁺-ის ალდგენას ნად- H_2 -ად შთანთქმის სიდიდე მატულობს. იმისდა მიხედვით, თუ რა სიდიდით ხდება შთანთქმის შემცირება ან მატება მსჯელობენ რეაქციის სიჩქარეზე და ე. ი. ფერმენტის აქტივობაზე.

მალატდეჰიდროგენაზის საერთაშორისო, სტანდარტულ ერთეულად (და საერთოდ ფერმენტის ერთეულად) მიღებულია მისი ისეთი რაოდენობა, რომელიც მოცემულ პირობებში იწვევს 1 მიკრომოლი სუბსტრატის გარდაქმნას 1 წთ-ში. რეკომენდირებული ტემპერატურაა 25°C. ფერმენტის აქტივობის სტანდარტულ ერთეულებში გამოსახატავად საჭიროა იმ კომპონენტის მოლური ექსტინქციის კოეფიციენტის ცოდნა, რომელიც განაპირობებს საარეაქციო ხსნარის ოპტიკურ სიმკვრივეს (შთანთქმას). მოლური ექსტინქციის კოეფიციენტი გვიჩვენებს შთანთქმის სიდიდეს, რომელსაც იძლევა ერთ მლ ხსნარში მყოფი 1 მოლი ნივთიერება (ხსნარის ფენის სისქე = 1 სმ).

ნად-ისა და ნადფ-ის ალდგენილი ფორმების მოლური ექსტინქციის კოეფიციენტი $340 \text{ ნმ-ზე } (25^\circ\text{C})$ ტოლია $6,22 \times 10^6 \text{ სმ}^2/\text{მოლი}$. ეს ნიშნავს იმას, რომ თუ რეაქციის პროცესში ოპტიკური სიმკვრივე შეიცვლება (გაიზრდება ან შემცირდება $6,22 \times 10^6$ სიდიდით), ადგილი ექნება 1 მოლი ალდგენილი კოფერმენტების წარმოქმნას ან დახარჯვას 1 მლ სარეაქციო ხსნარზე გადაანგარიშებით. ცხადია, 1 მილიმოლი ნად (ფ)- H_2 -ის მოლური ექსტინქციის კოეფიციენტი იქნება $6,22 \times 10^3 \text{ სმ}^2/\text{მილიმოლი}$, ხოლო 1 მიკრომოლის — $6,22 \text{ სმ}^2/\text{მიკრომოლი}$. ამგვარად, როდესაც რეაქციის შედეგად ოპტიკური სიმკვრივე შეიცვლება 6,22-ით, მაშინ ადგილი ექნება 1 მიკრომოლი ნად(ფ)- H_2 -ის წარმოქმნას ან დახარჯვას.

პრაქტიკულად, ფერმენტული რეაქციის შედეგად სარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე იცვლება რაღაც გარკვეული სიდიდით და, რომ გავიგოთ ეს სიდიდე — ექსტინქციის სხვაობა (ΔE) ნად(ფ)- H_2 -ის მიკრომოლების რა რაოდენობის წარმოქმნას შეესაბამება, საჭიროა შევადგინოთ უბრალო პროპორცია:

6,22—1 მიკრომოლი ნად(ფ)- H_2

ΔE —x მიკრომოლი

საიდანაც $X = \frac{\Delta E}{6,22}$ მიკრომოლი.

იმ შემთხვევებში, როდესაც აუცილებლობა არ მოითხოვს ფერმენტის აქტივობა განსაზღვრულ იქნეს სტანდარტულ ერთეულებში, ფერმენტის ერთეულად შეიძლება მიღებულ იქნეს 1 მლ ფერმენტულ ექსტრაქტში მყოფი ფერმენტის ის რაოდენობა, რომელიც 1 წთ-ში იწვევს 3 მლ მოცულობის მქონე სარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივის შეცვლას 0,001-ით.

განვიხილოთ მაგალითი:

დავუშვათ სარეაქციო ხსნარის საერთო მოცულობაა 3 მლ, რომელიც შეიცავს 0,3 მლ ფერმენტულ ექსტრაქტს. რეაქციის დაწყებამდე სარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე ვთქვათ ტოლია 0,700. რეაქციის დაწყებიდან 1 წთ-ის შემდეგ სარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე შემცირდა და გახდა 0,600, ე. ი. 1 წთ-ის განმავლობაში სარეაქციო ხსნარის სიმკვრივე შემცირდა 0,100-ით ე. ი. $\Delta E = 0,100$. ეს შემცირება გამოიწვია 1 მლ სარეაქციო ხსნარში მყოფმა 0,1 მლ-მა ფერმენტულმა ექსტრაქტმა. ცხადია, 1 მლ ფერმენტული ექსტრაქტი გამოიწვევდა ოპტიკური სიმკვრივის 10-ჯერ უფრო მეტად შემცირებას, ე. ი. $\Delta E = 0,100 \times 10 = 1,000$. ამგვარად,

თუ 1 წუთში ოპტიკური სიმკვრივის 0,001-ით შეცვლა შეესაბამება ფერმენტის ერთ ერთეულს, მაშინ 1,000-ით შეცვლა შეესაბამება 1000 ერთეულს.

სტანდარტულ ერთეულებში გამოსახული ფერმენტის ერთეულების რიცხვი ტოლი იქნება: ფერმენტის ერთეულები 1 მლ სარეაქციო ხსნარში =

$$\frac{\Delta E}{6,22} = \frac{0,100}{6,22} = 0,16.$$

რამდენადაც 1 მიკრომოლი ნად(ფ)-H₂-ის გარდაქმნა შეესაბამება ფერმენტის 1 ერთეულს, 0,16 მიკრომოლი ნად(ფ)-H₂ შეესაბამება ფერმენტის 0,16 ერთეულს. საერთოდ, ნიმუშში განსაზღვრული ნად(ფ)-H₂-ის რაოდენობა მიკრომოლებში =

$$\frac{\Delta E}{6,22} \cdot v, \text{ სადა } v - \text{ნიმუშის მოცულობაა სპექტროფოტომეტრირების დროს.}$$

ჩვეულებრივ იგი 3 მლ-ის ტოლია, ე. ი., თუ ნიმუშის მოცულობაა 3 მლ. მაშინ სარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივის 6.22-ით შეცვლა დაკავშირებული იქნება 3 მიკრომოლი ნად(ფ)-H₂-ის წარმოქმნასთან ან დახარჯვასთან.

სწორ შემთხვევაში საჭირო ხდება ფერმენტის ხვედრითი აქტივობის განსაზღვრა. ფერმენტის ხვედრითი აქტივობა ახასიათებს ფერმენტის სისუფთავის ხარისხს და გვჩვენებს ცილის მთელ რაოდენობაში ფერმენტის წილს. ფერმენტის ხვედრითი აქტივობა ეს არის ფერმენტის ერთეულების რიცხვი გადაანგარიშებული 1 მგ ცილაზე. მალატდეპიდროგენაზის ხვედრითი აქტივობის გაანგარიშება სდება შემდეგი ფორმულის საშუალებით:

$$\text{ხვედრითი აქტივობა} = \frac{\Delta E}{6,22 \cdot A},$$

სადაც A—არის 1 მლ სარეაქციო ხსნარში მყოფი ცილა მილიგრამებში. ამ გზით გაანგარიშებული ფერმენტის ხვედრითი აქტივობა გამოისახება წარმოქმნილი ან დახარჯული ნად(ფ)-H₂-ის მიკრომოლების რიცხვით.

ხვედრითი აქტივობა შეიძლება გამოსახულ იქნას პირდაპირ ოპტიკური სიმკვრივის ცვლილების საშუალებით. ასეთ შემთხვევაში ხვედრითი აქტივობა განისაზღვრება ფორმულით:

$$\text{ხვედრითი აქტივობა} = \frac{\Delta E \cdot 1000}{A},$$

სადაც ΔE.1000 ეს არის ფერმენტის ერთეულების რიცხვი, ხოლო A—1 მლ სარეაქციო ხსნარში მყოფი ცილა მგ-ში.

მალატდეჰიდროგენაზის აქტივობა ისაზღვრება შემდეგნაირად: სპექტროფოტომეტრის კვარცის კიუვეტაში ათავსებენ 2,7 მლ 0,05—0,1 M ფოსფატის (ტრის — HCl ან სხვა რომელიმე) ბუფერს pH 3,0; 0,1 მლ ნად-H₂-ის ხსნარს (განსაზღვრული კონცენტრაციის), 0,1 მლ ფერმენტულ ექსტრაქტს (საჭირო განზავების) და NaOH-ით pH=6,7-მდე განეიტრალებული 0,1 მლ მქაუნდმარმქაევას (აგრეთვე განსაზღვრული კონცენტრაციის). სარეაქციო ხსნარის საბოლოო მოცულობა უნდა უდრიდეს 3 მლ-ს.

კიუვეტის შიგთავსს კარგად ურევენ და აითვლიან (გამსწნელია — ბუფერის. წყლის კიუვეტის წინააღმდეგ) სარეაქციო ხსნარის ოპტიკურ სიმკვრივეს 340 ნმ-ზე 15 წამის ინტერვალებით 1—2 წუთის განმავლობაში. საკონტროლო ცდის დაყენება აუცილებელია, რადგან უნდა გამოირიცხოს ენდოგენური სუბსტრატებით ნად-H₂-ის ჟანგვა. ამისათვის საჭიროა სარეაქციო ხსნარიდან გამოირიცხოს სუბსტრატი — მქაუნდმარმქაევა. მის მაგივრად უნდა დამატოს იმავე მოცულობის ბუფერი. საკონტროლო კიუვეტის მაჩვენებელი უნდა გამოაკლდეს ცდის მაჩვენებელს.

სუბსტრატისა და ნად-H₂-ის კონცენტრაციები ისეთნაირად უნდა იყოს შერჩეული, რომ ფერმენტი ამჟღავნებდეს მაქსიმალურ აქტივობას. მცენარეული ობიექტებისათვის ასეთი ოპტიმალური კონცენტრაციებია სუბსტრატისათვის $5 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-3}$ M, ხოლო ნად-H₂-თვის $1 \cdot 10^{-3}$ — $2 \cdot 10^{-4}$ M. კონცენტრაციები მოცემულია მთელ სარეაქციო ხსნარზე გადაანგარიშებით. ასევე ოპტიმალური უნდა იყოს ბუფერის მოლარობა და სარეაქციო ხსნარის pH.

მალატდეჰიდროგენაზა მაქსიმალურ აქტივობას ამჟღავნებს 0,05—0,1 M ბუფერში, მისი pH—ოპტიმუმი უდრის 8,0-ს. ფერმენტი სარეაქციო ხსნარს უნდა ემატებოდეს ისეთი რაოდენობით, რომ 1 წთ-ში ოპტიკურ სიმკვრივეთა სხვაობა (ექსტინქციათა სხვაობა) აცვლებოდეს 0,020—0,100-ის საზღვრებში. ასეთ დროს დაცულია პროპორციული დამოკიდებულება ფერმენტის აქტივობასა და დროს შორის.

სუბსტრატისა და ნად-H₂-ის ხსნარები უნდა მომზადდეს უშუალოდ ცდის დაწყების წინ, გარდა ამისა ცდის მსვლელობაში ისინი უნდა იყოს მოთავსებული ყინულის აბაზანაში. ეს აუცილებელია იმისათვის, რომ თავიდან იქნას აცილებული სუბსტრატის თუნდაც უმნიშვნელო გარდაქმნები (მქაუნდმარმქაევას დეკარბოქსილირება პიროყურძნის მქავად, ნად-H₂-ის დაშლა). მიზანშეწონილი არ არის აღნიშნული ხსნარების ხმარება მეორე დღეს. რაც შეეხება ფერმენტულ ექსტრაქტებს, ისინი უნდა მზადდებოდეს უშუალოდ ცდის წინ.

უნდა აღინიშნოს, რომ მალატდეჰიდროგენაზით კატალიზებული რეაქციის სიჩქარის წონასწორობა ძლიერაა გადახრილი ვაშლის მჟავას წარმოქმნისაკენ, ამის გამო რეაქცია საწინააღმდეგო მიმართულებით, ე. ი. მჟაუნდმარმჟავას წარმოქმნისაკენ, სუსტად მიმდინარეობს. სარეაქციო არე ასეთ შემთხვევაში შეიცავს 0,1 M გლიცინ—NaOH ბუფერს pH 10,0, განეიტრალებულს NaOH-ით pH 7.0—8,0-მდე, 0,1 მლ ვაშლის მჟავას (განსაზღვრული კონცენტრაციის), 0,1 მლ ნად⁺-ს (ასევე განსაზღვრული კონცენტრაციის) და 0,1 მლ ფერმენტულ ექსტრაქტს. სარეაქციო ხსნარის საბოლოო მოცულობაა 3 მლ. რეაქციის შედეგად ხდება სარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივის მომატება, რაც აღირიცხება 340 ნმ 15 წმ-ის ინტერვალებით 3 წთ-ის განმავლობაში.

ფერმენტის რაოდენობა შერჩეულ უნდა იქნეს ისეთნაირად, რომ ოპტიკური სიმკვრივის ცვლილება 1 წთ-ში მერყეობდეს 0,010—0,050 ფარგლებში.

ვაშლის მჟავას და ნად⁺-ის კონცენტრაციები უნდა იყოს ოპტიმალური, რაც სპეციალურად უნდა დადგინდეს ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში. აუცილებელია საკონტროლო ცდის დაყენება (ვაშლის მჟავას ან ნად⁺-ის გარეშე).

გლუტამატდეჰიდროგენაზა

საერთაშორისო ბიოქიმიური კავშირის სპეციალური კომისიის მიერ შემუშავებულ ფერმენტების კლასიფიკაციაში გლუტამატდეჰიდროგენაზას აქვს სამი შიფრი: 1. 4. 1. 2., 1. 4. 1. 3. და 1. 4. 1. 4, რაც ნიშნავს, რომ სახელწოდება გლუტამატდეჰიდროგენაზის ქვეშ გაერთიანებულია სამი ფერმენტი, რომლებიც კოფერმენტებად იყენებენ ან ნად-ს, ან ნადფ-ს, ან როგორც ნად-ს, ისე ნადფ-ს — ნად(ფ). ამ სამი ფერმენტის სისტემატიკური სახელწოდებებია:

L-გლუტამატ: ნად—ოქსიდორედუქტაზა (დეჰამინირების ფერმენტი) — 1. 4. 1. 2.

L-გლუტამატ: ნად(ფ)—ოქსიდორედუქტაზა (დეჰამინირების ფერმენტი) — 1. 4. 1. 3.

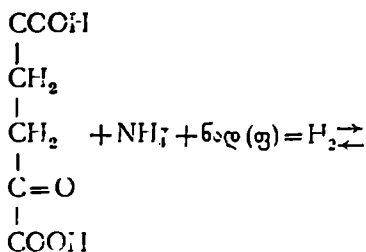
L-გლუტამატ: ნადფ—ოქსიდორედუქტაზა (დეჰამინირების ფერმენტი) — 1. 4. 1. 4.

ყველა გლუტამატდეჰიდროგენაზის საერთო თვისებას, ბიოლოგიური წყაროსაგან დამოუკიდებლად, წარმოადგენს ის, რომ

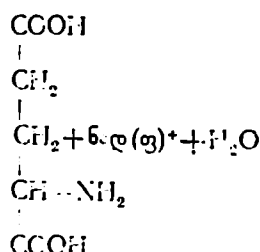
თავისი აქტივობის გამოსამჟღავნებლად ისინი საჭიროებენ მხოლოდ რეთ ნუკლეოტიდებს. როგორცაა ნად-ი და ნადფ-ი. სხვადასხვაობიექტების გლუტამატდეჰიდროგენაზები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან სპეციფიკურობით აღნიშნული კოფერმენტების მიმართ. ასე მაგალითად, ცხოველური უჯრედის გლუტამატდეჰიდროგენაზი წარმოადგენს ერთ ფერმენტს, რომლებიც მოქმედებენ როგორც ნად-თან ისე ნადფ-თან. რაც შეეხება მიკროორგანიზმების, ბაქტერიების, საფეურების, ობის სოკოების უმრავლესობას, ისინი შეიცავენ ორ განსხვავებულ გლუტამატდეჰიდროგენაზას, რომლებიც მკაცრ სპეციფიკურობას იჩენენ ნად-ის ან ნადფ-ის მიმართ. არის ზონაცემები, რომელთა თანახმადაც ზოგიერთი ორგანიზმები, მათ შორის მცენარეული ორგანიზმებიც, შეიცავენ სამ გლუტამატდეჰიდროგენაზას.

გლუტამატდეჰიდროგენაზას უკავია ცენტრალური ადგილი უჯრედში მეტაბოლიზმში. იგი აკავშირებს აზოტოვან ცვლას კრების ციკლთან. მცენარეებში იგი წარმოადგენს ძირითად ფერმენტს, რომლის მოქმედების შედეგად ხორციელდება არაორგანული აზოტის ჩართვა ორგანულ ნაერთებში. გლუტამინის მეშვე, რომელიც წარმოადგენს ამონიაკის აზოტის ასიმილაციის პირველ პროდუქტს, ითვლება ამინოკგუფების ძირითად დონორად ამინომჟავათა ბიოსინთეზში. ცხოველურ ორგანიზმებში გლუტამატდეჰიდროგენაზის (რომელიც მოქმედებს ამინოტრანსფერაზებთან კავშირში) უპირატესი როლია ტრანსამინირებისა და ტრანსდელამინირების რეაქციებში ბონაწილეობა. კარგადაა შესწავლილი გლუტამატდეჰიდროგენაზის ზეოთხეული სტრუქტურა, დისოციაცია-რეასოციაციის მოვლენები, რეგულატორული თვისებები, მოლეკულური მასები, ფერმენტის ინდექციის მოვლენები, ზოგერთი ფიზიკო-ქიმიური თვისებები და ა. შ. მიუხედავად ამისა, არ არის საბოლოოდ გადაწყვეტილი გლუტამატდეჰიდროგენაზების ლოკალიზაციის საკითხი სუბუჯრედულ ორგანოებში. არაა გაშიფოული ფერმენტის პირველადი სტრუქტურა და აქტიური ცენტრის შენება.

გლუტამატდეჰიდროგენაზის მოქმედების შედეგად ხდება ამონიუმის იონებით 2-ოქსო (α-კეტო) გლუტარის მეშვეს აღდგენითი ამინირება გლუტამინის მეშვედ და პირიქით, გლუტამინის მეშვეს ჟანგვითი დელამინირება 2-ოქსო (α-კეტო) გლუტარის მეშვედ. რეაქციის წარმართვისათვის საჭიროა კოფერმენტი ნად-ი ან ნადფ-ი. აღდგენითი ამინირების რეაქციებში გამოიყენება ნად(ფ)-H₂, ხოლო ჟანგვითი დელამინირების რეაქციებში ნად(ფ)⁺-ი



2 ოქსო (α-კეტო) –
გლუტარის მჟავა



გლუტამინის მჟავა

გლუტამატდეჰიდროგენაზის აქტივობა, ისევე როგორც ყველა იმ დეჰიდროგენაზების აქტივობა, რომლებიც კოფერმენტებად იყენებენ ნალ(ფ)-ს, განსაზღვრება სპექტროფოტომეტრული მეთოდით 340 ნმ დროის ერთეულში (1 წთ-ში ნალ(ფ)-H₂-ის ქანჯის ან ნალ(ფ)⁺-ის აღდგენის ხარისხის მიხედვით. ფერმენტის ერთეულის და ხვედრითი აქტივობის გამოთვლა ხდება ზუსტად, ისე, როგორც ეს აღწერილი იყო მალატდეჰიდროგენაზის შემთხვევაში.

გლუტამატდეჰიდროგენაზის აქტივობის განსაზღვრა ხდება როგორც 2-ოქსო (α-კეტო) გლუტარის მჟავას აღდგენითი ამინიზაციის, ისე გლუტამინის მჟავას ქანჯითი დეჰამინიზაციის რეაქციების სიჩქარის მიხედვით. პირველ შემთხვევაში სარეაქციო ნარევი შედგება 2.55 მლ 0.05—0.1 M ფოსფატის (ტრის—HCl ან რომელიმე სხვა) ზუფერისაგან pH 8.0; 0.1 მლ ნალ(ფ)-H₂-გან (განსაზღვრული კონცენტრაციის), NaOH-ით pH-7-მდე განეიტრალებული 0.1 მლ 2 ოქსო (α-კეტო) გლუტარის მჟავასაგან (განსაზღვრული კონცენტრაციის), 0.2 მლ ფერმენტული ექსტრაქტისაგან (საჭირო განზავების) და 0.05 მლ (NH₄)₂HPO₄-ის ან NH₄Cl-ის ნაყარი ხსნარისაგან.

საკონტროლო ვარიანტის სარეაქციო ნარევი შედგება იმავე კომპონენტებისაგან ამონიუმის მარილის გამოკლებით. მის მაგივრად ემატება იმავე მოცულობის ბუფერი. სარეაქციო ხსნარის ნარევის საბოლოო მოცულობაა 3 მლ. სარეაქციო ხსნარის pH უნდა იყოს ოპტიმალური. უმეტესი გლუტამატდეჰიდროგენაზების pH-ოპტიმუმი ძვეს pH 7.5—8.0-ის ფარგლებში. სუბსტრატების და კოფერმენტების კონცენტრაციები ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში ექსპერიმენტულად უნდა იყოს შერჩეული. მცენარეული ობიექტების ფერმენტებისათვის 2-ოქსო (α-კეტო) გლუტარის მჟავას ოპტიმალური კონცენტრაცია იმყოფება საზღვრებში 1·10⁻³—1·10⁻² M, ნალ(ფ)-

H_2 -ისა კი $1 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-4}$ M. ფერმენტი სარეაქციო ნარევეს უნდა ემატებოდეს ისეთი რაოდენობით, რომ 1 წთ-ში ოპტიკური სიმკვრივე იცვლებოდეს 0,010—0,050 ფარგლებში. ასეთ დროს დაცული იქნება პროპოზიციული დამოკიდებულება ფერმენტის აქტივობასა და დროს შორის.

გლუტამინის მჟავას ქანგვითი დეზამინირების შემთხვევაში სარეაქციო ნარევი შედგება 2,3 მლ 0,05—0,1M ფოსფატის (ტრის-HCl ან რომელიმე სხვა) ბუფერისაგან, რომლის pH უდრის 8,6-ს, 0,1 მლ ნად(ფ)-ის ხსნარისაგან (განსაზღვრული კონცენტრაციის), NaOH-ით განეიტრალებული 0,1 მლ გლუტამინის მჟავისა, ან მისი მარალისაგან (განსაზღვრული კონცენტრაციის) და 0,5 მლ საკვლევი ფერმენტული ექსტრაქტისაგან. სარეაქციო ხსნარის მოცულობაა 3 მლ. საკონტროლო ვარიანტი სუბსტრატის გამოკლებით. მის მაგივრად ემატება იმავე მოცულობის ბუფერი. უნდა აღინიშნოს, რომ გლუტამატდეჰიდროგენაზით კატალიზებული რეაქციის წონასწორობა სუსტ ტუტე არეში გადახრილია გლუტამინის მჟავას წარმოქმნისაკენ. ამიტომ ხშირად საჭირო ხდება სარეაქციო არიდან საბოლოო პროდუქტების გაყვანა. ანე მაგალითად, 2 ოქსო (α -კეტო) გლუტარის მჟავას შეზოგვას აწარმოებენ 0,4 M ჰიდრაზინით, რომელსაც ამზადებენ და უმატებენ ბუფერის ხსნარს ცდის დაწყების დღეს. გლუტამინის მჟავაა და ნად(ფ)-ის კონცენტრაციები უნდა იყოს ოპტიმალური და ექსპერიმენტულად შერჩეული ყოველი კონკრეტული შემთხვევისათვის. უმეტეს შემთხვევაში ეს კონცენტრაციები მერყეობენ საზღვრებში: სუბსტრატისაგან— $1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ M, ნ.დ(ფ)-ის კი $1 \cdot 10^{-4}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ M.

აქაც, ისევე როგორც მალატდეჰიდროგენაზის შემთხვევაში, რეაქციაში მონაწილე კომპონენტების ხსნარები უნდა მომზადდეს უშუალოდ ცდის დაწყების წინ და ცდის პროცესში ინახებოდნენ ყინულის აბაზანაში.

რეაქცია, როგორც აღდგენითი ამინირების ისე ქანგვითი დეზამინირების შემთხვევაში ტარდება 3—5 წუთის განმავლობაში, 1 წუთიანი ინტერვალებით.

ლაქტატდეჰიდროგენაზა

(ფა. 1. 1. 1. 27, L-ლაქტატ:ნად—ოქსიდორედუქტაზა)

ფერმენტთა კლასიფიკაციაში ფერმენტი ტრივიალური სახელწოდებით ლაქტატდეჰიდროგენაზა წარმოდგენილია ოთხი შიფრით: 1. 1. 1. 27, 1. 1. 1. 28, 1. 1. 2. 3 და 1. 1. 2. 4. ეს ფერმენტები

ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან წყალბადის აქცეპტორებით. გარდა ამისა, ორი მათგანი სუბსტრატად იყენებს რძის მჟავას (ლაქტატის) L, დანარჩენი ორი კი D-ფორმას. ამ ფერმენტების სისტემატიკური სახელწოდებებია:

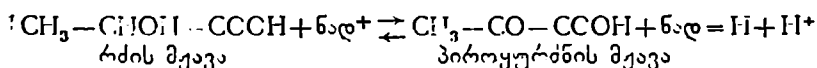
L-ლაქტატ:ნად—ოქსიდორედუქტაზა — 1. 1. 1. 27

D-ლაქტატ: ნად—ოქსიდორედუქტაზა — 1. 1. 1. 28

L-ლაქტატ: ციტოქრომ-ც—ოქსიდორედუქტაზა — 1. 1. 2. 3

D-ლაქტატ: ციტოქრომ-ც—ოქსიდორედუქტაზა — 1. 1. 2. 4.

ამ ოთხი ფერმენტიდან ყველაზე მნიშვნელოვანი და ამავე დროს კარგად შესწავლილია ლაქტატდეჰიდროგენაზა შიფრით 1. 1. 1. 27. ამ ფერმენტის მოქმედების შედეგად L-რძის მჟავა იქცევა პიროუჟრძნის მჟავად. რეაქცია შექცევადია.



ამ ფერმენტის ფიზიოლოგიური მნიშვნელობა უკვე მის მიერ კატალიზებული რეაქციიდან ჩანს. ფერმენტის სუბსტრატი — პიროუჟრძნის მჟავა — უმნიშვნელოვანესი მეტაბოლიტია. მას უჭირავს ცენტრალური ადვილი ყველა ცოცხალი ორგანიზმის ნივთიერებათა ცვლაში.

ლაქტატდეჰიდროგენაზა წარმოადგენს ერთ-ერთ ფერმენტს, რომლისთვისაც დადგენილ იყო მოლეკულური ფორმების მრავალგვარობა ე. ი. იზოფერმენტული ბუნება. ლაქტატდეჰიდროგენაზის იზოფერმენტები სხვა ფერმენტების იზოფერმენტებთან შედარებით გაცილებით კარგადაა შესწავლილი. არსებობს მრავალი მიმოხილვითი სტატია, რომლებშიც შეჯამებული და განზოგადოებულია კი არის გამოკვლევები ლაქტატდეჰიდროგენაზის იზოფერმენტების გავრცელების, ქიმიური, ფიზიკური, იმუნოქიმიური, კინეტიკური და რეგულატორული თვისებების შესახებ. უკანასკნელ ხანებში დაგროვდა მონაცემები, რომელთა საფუძველზე ლაქტატდეჰიდროგენაზა შეიძლება გამოყენებულ იქნას როგორც დიაგნოსტიკური ტესტი ისეთი დაავადებების შემთხვევაში, როგორიცაა პროგრესირებული კუნთოვანი დისტროფია, მიოკარდის ინფარქტი, ინფექციური ჰეპატიტი, რევმატიზმი, ლეიშის სხვადასხვა დაავადებები, გულ-სისხლ-ძარღვთა სისტემის უკმარისობა, სირსველი, ანემია, ლეიკემია, კუჭის ავთვისებიანი სიმსივნე, პროსტატის, სწორი ნაწლავისა და სარძევე ჯირკვლების კიბო და მრავალი სხვა.

ლაქტატდეჰიდროგენაზის, როგორც ყველა ნად(ფ)-დამოკიდ-

ბული ფერმენტის, აქტივობის განსაზღვრა წარმოებს 340 ნმ-ზე ნად-H₂-ის ქანგვის ან ნად⁺-ის აღდგენის ხარისხის მიხედვით.

სარეაქციო ხსნარი შედგება 2,7 მლ 0,1 M ფოსფატის ბუფერი-საგან pH 7.4; 0.1 მლ ნად-H₂-ისაგან (განსაზღვრული კონცენტრაციის); 0,1 მლ პიროყურძნის მჟავას ან მისი მარილისაგან (განსაზღვრული კონცენტრაციის) და 0,1 მლ საპირო განზავების ფერმენტული ექსტრაქტისაგან.

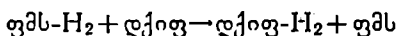
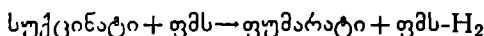
პიროყურძნის მჟავას ხსნარი მაცივარში ინახება 2—3 თვის განმავლობაში. საკონტროლო ვარიანტებია: საინკუბაციო ხსნარები პიროყურძნის მჟავას (ძირითადადში) და ფერმენტის გარეშე. ლაქტატდეჰიდროგენაზის აქტივობა ისაზღვრება 1 წთ-იანი ინტერვალებით 2—6 წუთის განმავლობაში. ფერმენტის ერთეულის დადგენა და ხვედრითი აქტივობის განსაზღვრა წარმოებს ზუსტად ისე, როგორც ეს მდპ-ისათვის იყო აღწერილი.

სუპერინაბლემიფროგენაზა

(შპ. 3. 99. 1. სუპერინაბ: (აპცაპტორი)—ოქსიდოროდუშაზა)

სუპერინაბდეჰიდროგენაზა ფლავოპროთეიდია და ციტოქრომ-*ქს*-დაზის მსგავსად, ითვლება მიტოქონდრიების მარკერულ ფერმენტად. იგი ააქტივებს ქარვის მჟავას დაქანგვას ელექტრონების როგორც ბუნებრივი, ასევე ხელოვნური აქცეპტორების საშუალებით, მაგალითად, რკინის ციანიდით, ფენაზინალკილსულფატით, შედარებით ნაკლებად მოლექულური ქანგბადით, მეთილენის ლურჯით, ციტოქრომ *c*-თი, დიქლორფენოლინდოფენოლით, ტრიფენილტეტრაზოლიუმის ქლორიდით, კოფერმენტით Q₆ ან Q₁₀. სუპერინაბდეჰიდროგენაზის აქტივობის განსაზღვრა ელექტრონების ამ აქცეპტორების გამოყენებაზეა დამყარებული.

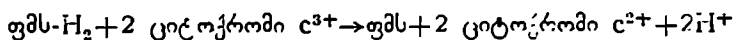
ფენაზინმეტოსულფატისა (ფმს) და 2,6-დიქლორფენოლინდოფენოლის (დქიფ) მონაწილეობა სუპერინატის დაქანგვაში შემდეგ რეაქციაზეა დამყარებული



თუმცა ფმს-ის აღდგენილი ფორმა ადვილად იქანგება ჰაერის ქანგბადით, უკანასკნელი გავლენას არ ახდენს განსაზღვრაზე. სუპერინაბდეჰიდროგენაზის აქტივობა ისაზღვრება სპექტროფოტომეტრულად აღდგენილი დქიფ-ის ოპტიკური სიმკვრივის შემცირებას მისეღვით. 2,6-დიქლორფენოლინდოფენოლის მოლური ექსტინქციის კოეფიციენტი 600 ნმ $\epsilon = 21 \times 10^6$ სმ²/მოლი: 1 მოლი სუპერინატი

აღადგენს 1 მოლ 2,6-დქიფს. სარეაქციო ხსნარი შედგება 0,1 მლ ახლად მომზადებული 0,045 M კალიუმის ციანიდისაგან, 0,1 მლ სუქცინატისაგან (გარკვეულ კონცენტრაციის) განეიტრალებულს pH 7—8-მდე NaOH-ით, 0,1 მლ 0,0015 M ახლად მომზადებული 2,6-დქიფ-საგან, 0,1 მლ 3% ხარის შრატის ალბუმინისაგან, 0,1 მლ 0,009 M სიბნელეში და გაყინულ მდგომარეობაში შენახულ ფენაზინმეტოსულფატისაგან, 0,1 მლ ქანკაბლისაგან თავისუფალ ფერმენტული ექსტრაქტისაგან (საქირო განზავების) და 2,4 მლ 0,05M ფოსფატის ბუფერისაგან pH 7,8. სარეაქციო ხსნარის საბოლოო მოცულობაა 3 მლ. რეაქცია იწყება სუქცინატის დამატებით.

საკონტროლოდ აღება ვარიანტი სუბსტრატის — სუქცინატის გარეშე. უნდა დაიდგას აგრეთვე კონტროლი ფერმენტის გარეშე. უურადლება უნდა მიექცეს იმ გარემოებას, რომ ყველა კომპონენტი აღებული უნდა იყოს ოპტიმალურ კონცენტრაციებში. ეს ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში ექსპერიმენტულად უნდა დადგინდეს. იგივე ითქმის სარეაქციო არის pH-ის და იონური ძალის მიმართაც. რეაქციას ატარებენ 38°C-ზე 0,5—1 წთ-იანი ინტერვალებით 3 წთ-ის განმავლობაში, თერმოსტატირებულ კიუვეტებში. აღწერილ მეთოდში 2,6-დქიფ-ი შეიძლება შეცვლილ იქნას ციტოქრომ c-თი.



საქმე იმაშია, რომ ლიტერატურული მონაცემების თანახმად 2,6-დქიფ-ის მოლური ექსტინციის კოეფიციენტი მერყეობს ფარდობით საზღვრებში. ციტოქრომ c-ს გამოყენების შემთხვევაში განსაზღვრას აწარმოებენ 550 ნმ 25°C-ის პირობებში.

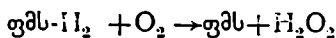
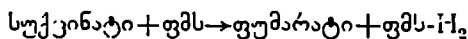
სუქცინატდეჰიდროგენაზის აქტივობის განსაზღვრის მეორე სპექტროფოტომეტრული მეთოდი დამყარებულია $K_3Fe(CN)_6$ -ის გამოყენებაზე.



ამ მეთოდით აქტივობის განსაზღვრის დროს სარეაქციო ნარევი შედგება: 2,4 მლ 0,1 M ფოსფატის ბუფერი. pH 7,6; 0,1 მლ 30mM ედტა 0,1 მლ სუქცინატი (გარკვეული კონცენტრაციის — 0,4 — 1,2M), 0,1 მლ 3 % ხარის შრატის ალბუმინი (იხსნება წყალში); 0,2 მლ 75mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,1 მლ 0,03M განეიტრალებული KCN (ემატება მხოლოდ მაშინ, როდესაც ისაზღვრება ორგანოლებთან დაკავშირებული ფერმენტის აქტივობა). აქტივობას საზღვრავენ 0,5—1 წთ-იანი ინტერვალებით 2—3 წთ-ის განმავლობაში 450 ნმ-ზე $K_3Fe(CN)_6$ -ის ოპტიკური სიმკვრივის შემცირების მიხედვით ($\epsilon =$

0.15×10^6 სმ²/მოლი). $K_3Fe(CN)_6$ 5mM მეტ კონცენტრაციაში მოქმედებს როგორც ინჰიბიტორი, ხოლო მცირე კონცენტრაციების დროს აქტივობას საზღვრავენ 420 ნმ ($\epsilon = 1,03 \times 10^6$ სმ²/მოლი). საკონტროლოდ აიღება ვარიანტი სუქცინატის და ფერმენტის გარეშე. როგორც რეაქციის ტოლობიდან ჩანს, 1 მოლი სუქცინატი აღადგენს 2 მოლ $K_3Fe(CN)_6$.

სუქცინატდეჰიდროგენაზის აქტივობას საზღვრავენ აგრეთვე მანომეტრული მეთოდით შთანთქმული ჟანგბადის რაოდენობის მიხედვით შემდეგი რეაქციის საფუძველზე



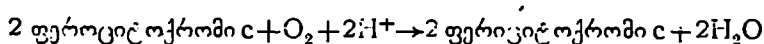
მიზანშეწონილია სუქცინატდეჰიდროგენაზის აქტივობა გამოისახოს 1 წუთში დაჟანგული სუბსტრატის მიკრომოლების რაოდენობებში. რისთვისაც საჭიროა წინასწარ აიგოს საკალიბრო მრუდები ან გამოყენებულ იქნას მოლური ექსტინქციის კოეფიციენტები (იხ. მალატდეჰიდროგენაზა).

ციტოქრომოქსიდაზა

(ფა 1. 9. 3. 1, ციტოქრომ c:ჟანგბად—ოქსიდოორედუქტაზა)

ციტოქრომოქსიდაზა ჰემის შემცველი ფერმენტია. იგი ლოკალიზებულია მხოლოდ მიტოქონდრიებში და ამიტომ ითვლება მიტოქონდრიების მარკერულ ფერმენტად. სუნთქვის ჯაჭვში ე. ი. ელექტრონების გადატანის ჯაჭვში ციტოქრომოქსიდაზა (ციტოქრომი c), უშუალოდ ურთიერთქმედებს მოლეკულურ ჟანგბადთან და აღადგენს მას. ციტოქრომოქსიდაზის კატალიზური ფუნქცია განპირობებულია მის მოლეკულაში რკინის არსებობით, რომელიც ელექტრონების მიერთებისა და გაცემის შედეგად განიცდის თანმიმდევრულ დაჟანგვასა და აღდგენას.

ციტოქრომოქსიდაზის მიერ კატალიზებული რეაქცია შემდეგი ტოლობით გამოისახება



ციტოქრომოქსიდაზის აქტივობის განსაზღვრის სპექტროფოტომეტრული მეთოდი დამყარებულია აღდგენილი ციტოქრომ c-ს დაჟანგვის ინტენსივობაზე. განსაზღვრა წარმოებს ხილულ უბანში 550 ნმ-ზე.

ციტოქრომოქსიდაზის აქტივობის განსაზღვრა წარმოებს სარეაქ-

ციო ხსნარში, რომელიც შეიცავს 2,8 მლ 0,1 M ფოსფატის ბუფერს pH 7,5; 0,1 მლ აღდგენილ ციტოქრომ c (განსაზღვრული კონცენტრაციის) და 0,1 მლ ფერმენტულ ექსტრაქტს (საჭირო განზავების). სპექტროფოტომეტრული მეთოდით ციტოქრომოქსიდაზის განსაზღვრისათვის პირველ რიგში საჭიროა დაქანგული ციტოქრომი c-ს აღდგენა. კომერციული ციტოქრომი c- დაქანგულ ფორმაშია.

დაქანგული ციტოქრომი c-ს აღდგენას აწარმოებენ ასკორბატით, ჰიდროსულფიტით ან ცისტეინით. ციტოქრომ c-ს გახსნიან 0,01 M კალიუმის ფოსფატში, pH 7,2, ისეთნაირად, რომ მისი კონცენტრაცია უდრიდეს 1%-ს, სპონტანური დაქანგვის აცილების მიზნით უმატებენ რამდენიმე მკ კალიუმის ასკორბატს. ჰარბ ასკორბატს აცილებენ დიალიზით ამავე ბუფერის წინააღმდეგ 18—24 სთ-ის განმავლობაში, სადიალიზო ბუფერის რამდენჯერადი შეცვლით. ამ გზით მიღებული ციტოქრომი c თითქმის სრულიად აღდგენილ მდგომარეობაში რჩება რამდენიმე თვის განმავლობაში.

ციტოქრომი c-ს აღდგენა ჰიდროსულფატით ხდება შემდეგნაირად: 8 მკ ციტოქრომი c გაიხსნება 1 მლ 0,05 M ფოსფატის ბუფერში და ემატება 0,02 მლ ახლადმომზადებული 3,2%-იანი ჰიდროსულფიტის ხსნარი (ჰიდროსულფიტის ხსნარი მზადდება ფოსფატის ბუფერში). ჩვეულებრივ ამ დროს ოპტიკური სიმკვრივე 550 ნმ-ზე იზრდება 2-ჯერ. ანალოგიურად ხდება ციტოქრომი c აღდგენა ცისტეინით. აქ ყურადღება უნდა მიექცეს იმ გარემოებას, რომ ციტოქრომი c უნდა დარჩეს ბოლომდე აღდგენილი, თავისუფალი აღმდგენელის გარეშე (ჰიდროსულფიტი, ცისტეინი). აღდგენილ მდგომარეობაში ამ გზით მიღებული ციტოქრომი c უცვლელი რჩება მხოლოდ 5—10 წთ-ის განმავლობაში. ეს სავესებით საკმარისია ფერმენტის აქტივობის განსაზღვრისათვის. აქტივობა ისაზღვრება 0.5—1,0 წუთის ინტერვლებით 3 წუთის განმავლობაში. ცხადია, წინასწარ უნდა იყოს დადგენილი ციტოქრომი c-ს არაფერმენტული ქანგვის სიჩქარე, ე. ი. უნდა ჩატარდეს საკონტროლო ცდა ფერმენტის გარეშე.

ფერმენტის აქტივობა შეიძლება გამოისახოს ერთ წუთში ოპტიკური სიმკვრივის ცვლილებით ან გარდაქმნილი სუბსტრატის მაქრომოლების რიცხვის მიხედვით. უკანასკნელ შემთხვევაში საჭიროა წინასწარ საკალიბრო მრუდის აგება ან სუბსტრატის მოლური ექსტინქციის განსაზღვრა. ციტოქრომი c-ს მოლური ექსტინქციის

კოეფიციენტი უდრის $19,6 \times 10^3 \frac{\text{ც სმ}^2}{\text{მოლი}}$.

ციტოქრომოქსიდაზის აქტივობა შეიძლება გამოისახოს აგრეთვე პირველი რიგის რეაქციების სინქარის მუდმივას სიდიდეებში. ამ მიზნით გამოიყენება განტოლება:

$$k = 2,3 \lg \frac{A_{10}}{A_{(10+1\infty)}} \cdot \tau^{-1}$$

სადაც A_{10} სარეაქციო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივეა რეაქციის დაწყებამდე, ხოლო $A_{(10+1\infty)}$ იმავე ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე რეაქციის დაწყებიდან 1 წუთის შემდეგ. ხვედრითი აქტივობა გამოითვლება სარეაქციო ხსნარში ციტოქრომი c და ფერმენტის ცნობილი კონცენტრაციებიდან.

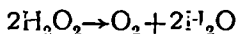
$$\text{ხვ. აქტ.} = \frac{k (\text{ციტოქრომი c-ს კონცენტრაცია})}{(\text{ფერმენტის კონცენტრაცია})}$$

ციტოქრომოქსიდაზის აქტივობა შეიძლება განისაზღვროს მანონეტრული ან პოლაროგრაფიული მეთოდებითაც დახარჯული (შთანთქმული) ენგბადის რაოდენობის მიხედვით.

კატალაზა

(ფა. 1. 11. 1. 6, წყალბადის ჰეჰანგი: წყალბადის ჰეჰანგი —
ოქსიდოორემუტაზა)

კატალაზა ჰემოპროტეიდია. ის პროსთეტული ჯგუფის სახით შეიცავს ჰემს — ფერობროტოპორფირინს. იგი მიეკუთვნება ფართოდ გავრცელებულ ფერმენტთა რიცხვს. მისი მოქმედებით მიმდინარეობს შემდეგი რეაქცია



ე. ი. ადგილი აქვს ერთი მოლეკულა წყალბადის ზეჰანგის დაჟანგვას ჟანგბადად, ხოლო მეორე მოლეკულის აღდგენას წყლის მოლეკულამდე. კატალაზამ დიდი როლი ითამაშა ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნისა და არსებობის დამტკიცების საქმეში.

კატალაზის ფუნქცია ჯერ კიდევ არ არის საბოლოოდ გარკვეული. უკანასკნელი მონაცემების თანახმად იგი უპირატესად უნდა ფუნქციონირებდეს პეროქსისომებში და ამდენად შეიძლება ჩათვალოს პეროქსისომების მარკერულ ფერმენტად.

კატალაზის აქტივობის განსაზღვრა ძალზე მოხერხებულია სპექტროფოტომეტრული მეთოდით. განსაზღვრას აწარმოებენ 240 ნმ-ზე H_2O_2 -ის ოპტიკური სიმკვრივის ცვლილების (ΔE) მიხედვით.

სარეაქციო ნარევი შეიცავს 2,8 მლ 0,05 M ფოსფატის ბუფერს pH 7,0—7,5; 0,1 მლ 2% H_2O_2 და 0,1 მლ ფერმენტულ პრეპარატს (საქირო განზავების). სარეაქციო ხსნარის საბოლოო მოცულობაა 3 მლ. მხედველობაში უნდა იქნას მიღებული, რომ წყალბადის ზე-
ქანგი დიდ კონცენტრაციებში ფერმენტზე უარყოფითად მოქმედებს. რეაქციას ატარებენ $25^{\circ}C$ -ზე 0,5 — 1,0 წუთის ინტერვალებით 3 წუთის განმავლობაში. საკონტროლოა ვარიანტი ფერმენტული პრე-
პარატისა ან სუბსტრატის (ძირითადად) გარეშე. კატალაზის აქტივო-
ბა გამოისახება 1 წუთში გარდაქმნილი H_2O_2 -ის მიკრომოლების რიცხვით. H_2O_2 -ის მოლური ექსტინქციის კოეფიციენტი $\epsilon = 0,36 \times 10^6 \text{ სმ}^2/\text{მოლი}$. კატალაზის ერთეული 1 მლ სარეაქციო ხსნარში უდ-
რის $-\frac{\Delta E}{0,36}$ მიკრომოლს.

ო-დიფენოლქსიდაზა

(ფა 1. 10. 3. 1, ო-დიფენოლ: O_2 — ოქსიდორაქსება)

ეს ფერმენტი ცნობილია აგრეთვე სხვა სახელწოდებებითაც (პოლიფენოლქსიდაზა, კატეხოლქსიდაზა, ფენოლაზა და ტი-
როზინაზა). ფერმენტი პოლიფენოლქსიდაზა ორთო-დიფენოლთან
ქანგბადის მიერთებით წარმოქმნის ორთოქინონს და წყალს.

ო-დიფენოლქსიდაზა შეიცავს სპილენძს და მოქმედებს სხვა-
დასხვა ო-დიფენოლებზე, პოლიფენოლქსიდაზური სისტემა ქანგავს
აგრეთვე მონოფენოლებსაც. ეს ფერმენტი ფართოდ არის გავრცე-
ლებული მცენარეებში. პირველ პოლიფენოლქსიდაზა აღმოჩე-
ნილი იყო სოკოებში. ხილისა და ბოსტნეულის სწრაფი შეფერვა პა-
ერზე გაჭრის შემდეგ პოლიფენოლქსიდაზის მოქმედების შედე-
გია. ამ ფერმენტის აქტივობა აღმოჩენილია ჩაიში, ვაშლში, კარტო-
ფელში, სოკოებში, ვაშლში, ქლიავში და ბევრ სხვა სახის მცენარე-
ში. კარგად არის შესწავლილი ჩაიდან და სოკოებიდან გამოყოფი-
ლი ფერმენტი. მისი მოლეკულური მასა მერყეობს 34000-დან
150000-მდე და შეიცავს სპილენძის ატომს. პოლიფენოლქსიდაზას,
ზოგიერთი სხვა ფერმენტის მსგავსად, არ გააჩნია აშკარად გამოზა-
ტული pH -ობტიმუმი. როგორც წესი ამ ფერმენტის მოქმედების
pH ოპტიმალური ზონა 5,0—7,0 შეადგენს. რაც შეეხება ფერმენ-
ტის სტაბილობას, უნდა აღინიშნოს, რომ ფერმენტის გაშენდასთან
ერთად მისი სტაბილობა მცირდება. დიდი მუშაობა იყო ჩატარებუ-
ლი ფერმენტის თერმოსტაბილური თვისებების შესწავლის მიზ-
ნით. ეს გამოწვეული იყო იმით, რომ პოლიფენოლქსიდაზის ამ

თვისებას დიდი საწარმოო მნიშვნელობა აქვს, მაგალითად, ჩაის დამზადების პროცესში. მსხლის წვენი 80°C -ის პირობებში 10 წამის განმავლობაში პოლიფენოლოქსიდაზა კარგავს აქტივობის 50%, 90°C -ის პირობებში 99%-ით მცირდება ფერმენტის აქტივობა.

პოლიფენოლოქსიდაზა ინჰიბირდება ნივთიერებებით, რომლებიც კმნიან სტაბილურ კომპლექსს სპილენძთან, ასეთებია: KCN , ლიეთილდითიოკარბამატი, გოგირდოვანი წყალბადი, ნატრიუმის ანიდი და სხვა.

ხილის წვენების დამზადების დროს პოლიფენოლოქსიდაზა იწვევს ხილის წვენების გამუქებას, რაც დაკავშირებულია ქინონების ჟანგვით პოლიმერიზაციასთან და წარმოადგენს სერიოზულ სიძნელეს ხილის წვენების წარმოებაში. წვენების ფერმენტული გამუქება შეიძლება თავიდან აცილებული იყოს ქინონების კომპლექს-წარმომქმნელი ნივთიერებების დამატებით. ამ მიზნისათვის იხმარება მეტა-და ტეტრაბორატები. ასკორბინის მჟავა აღადგენს ორთო-ქინონებს პოლიმერიზაციის წინ და ამით აიცილება წვენის ფერმენტული გამუქება. უკანასკნელის დამატება საჭიროა დიდი რაოდენობით, რაც ეკონომიურად მიზანშეწონილი არ არის. კარგ შედეგს იძლევა ფერმენტის ინაქტივირება CO_2 -ით და NaHSO_3 -ით. ფერმენტების ინაქტივირება შეიძლება აგრეთვე გადასამუშავებელი მასალის გაცხელებით და ატმოსფერული ჟანგბადის მოშორებითაც. განსაკუთრებით სერიოზული ყურადღება ექცევა პოლიფენოლოქსიდაზურ მოქმედებას სხვადასხვა ფერმენტული პროცესების დროს, სადაც ამ ფერმენტის აქტივობას ტექნოლოგიის თვალსაზრისით გადამწყვეტი მნიშვნელობა ენიჭება. მაგალითად, შავი ბაიხის ჩაის წარმოებისას პოლიფენოლოქსიდაზის მოქმედებით მიმდინარეობს რიგი ქიმიური ცვლილებანი, რომლებიც განაპირობებენ მზა ჩაის ხარისხობრივ მაჩვენებლებს.

პოლიფენოლოქსიდაზის აქტივობა ისაზღვრება ვარბურგის აპარატში ჟანგბადის რაოდენობის შთანთქმის მიხედვით.

ვარბურგის აპარატის ჭურჭლის ძირითად განყოფილებაში ათავსებენ საანალიზო ფერმენტულ ნარევეს 2,0 მლ-ის რაოდენობით, შემდეგ უმატებენ 0,6 მლ $\text{M}/15$ ფოსფატის ბუფერს, რომლის pH უდრის 6,0. ჭურჭლის ცენტრალურ განყოფილებაში ჩაასხამენ 0,2 მლ 2%-იან NaOH -ის ხსნარს, გვერდით მდებარე გაზონაზარდში კი 4,0 მგ პოლიფენოლს გახსნილს 1,0 მლ წყალში. თანაბარი ტემპერატურის დამყარების შემდეგ ის გადააქვთ ძირითად განყოფილებაში. ანალიზი მიმდინარეობს 30°C -ის პირობებში დროის გარკვეული პერიოდის განმავლობაში (მაგალითად 2 საა-

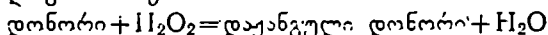
თი). ყოველი 15 წთ-ის შემდეგ ისაზღვრება შთანთქმული O_2 -ის რაოდენობა მიკრომოლუბში.

უნდა აღინიშნოს, რომ ხშირად პოლიფენოლოქსიდაზების პრეპარატები ჩაისა და ვაზის კულტურებიდან მიიღება აცეტონის პრეპარატის სახით. ამ შემთხვევაში ფერმენტული ხსნარის ნაცვლად ვარბურგის აპარატის ცენტრალურ ჭურჭელში შეაქვთ 50 მგ აცეტონის პრეპარატი, 2,0 მლ $M/15$ ფოსფატის ბუფერი, რომლის pH 6,0-ის ტოლია და ანალიზს ჩვეულებრივად, ზემოთ მოყვანილი სქემით აწარმოებენ.

პეროქსიდაზა

(ფა 1. 11. 1. 7. დონორი: წყალბადის ჰაჰანგი — ოქსიდოქსიდაზა)

პეროქსიდაზა იწვევა წყალბადის ზეეანგიო ზოგიერთი ორგანული ნაერთების ფენოლების, ამინებისა და სხვა პეტეროციკლური ნაერთების დაჟანგვას. სქემატურად ამ ფერმენტის რეაქცია შემდეგნაირად გამოისახება:



პეროქსიდაზა ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული ფერმენტია. იგი გვხვდება ცხოველური წარმოშობის ორგანიზმებში, ზოგიერთ მიკროორგანიზმებში და განსაკუთრებით მცენარეებში. მაღალი პეროქსიდაზული აქტივობით გამოირჩევიან ისეთი მრავალწლიანი მცენარეები, როგორიცაა ვაზისა და ჩაის კულტურები. ყველაზე დიდი რაოდენობით პეროქსიდაზას შეიცავს პირშუშას ფესვები. კრისტალურ მდგომარეობაში პეროქსიდაზა მოღებულია რძიდან, ლეიკოციტებიდან და პირშუშხადან.

ყველაზე უკეთ შესწავლილია და ფართოდ გამოიყენება პირშუშხადან გამოყოფილი პეროქსიდაზა. დადგენილია, რომ ამ უკანასკნელის მოლეკულური მასა უდრის 40000, ხოლო იზოელექტრული წერტილი $pI = 7,2$. ეს ფერმენტი შეიცავს რკინის ერთ ატომს მოლეკულაზე და შესაბამისად ერთ ჰემის ჯგუფს. პეროქსიდაზა საკმაოდ სტაბილური ფერმენტია pH-ის ცვალებადობის მიმართ (4,0-დან 12,0-მდე). პეროქსიდაზის მოქმედების pH-ოპტიმუმი უდრის 6,0.

ყველა ობიექტიდან გამოყოფილი პეროქსიდაზები ხასიათდებიან განსაკუთრებული თერმოსტაბილობით. ქვემოთ მოყვანილია ტემპერატურისა და ინკუბაციის პირობები, რომლის შემდეგ ფერმენტი 50% აქტივობას ინარჩუნებს: $85^{\circ}C - 32$ წთ., $100^{\circ}C - 12$ წთ., $115^{\circ}C - 2,5$ წთ., $145^{\circ}C - 0,4$ წთ. პეროქსიდაზის ასეთი მაღალი თერმოსტაბილური თვისებებიდან გამომდინარე შემუშავე-

ბელია ტესტები საკონსერვო მრეწველობაში ზოგიერთი თერმული ოპერაციის მართებულად ჩატარებისათვის. მაგალითად, ბოსტნეულის ბლანშირების ეფექტურობას საზღვრავენ პროცესის დამთავრების შემდეგ პროდუქტში შერჩენილი პეროქსიდაზული აქტივობით. ლაქტოპეროქსიდაზის აქტივობით ისაზღვრება თუ რამდენად სწორად ჩატარდა რძის პასტერიზაცია, ამ რეაქციას დიდი მნიშვნელობა აქვს რძის წარმოების ტექნოლოგიაში.

აღნიშნული თვისებების გაზრა პეროქსიდაზა პოლიფენოლოქსიდაზურ სისტემასთან ერთად დიდ როლს თამაშობს მცენარეების მეტაბოლიზმის რეგულირებაში.

ფერმენტ პეროქსიდაზის აქტივობას, როგორც წესი, საზღვრავენ ნედლეულიდან მიღებული აცეტონის პრეპარატში.

პეროქსიდაზის აქტივობა ისაზღვრება ულტრათერმოსტატის საშუალებით.

სინჯარაში ათავსებენ 20 მგ აცეტონის პრეპარატს და უმატებენ 2.0 მლ M/15 ფოსფატის ბუფერს, რომლის pH 6,0-ის ტოლია, 10 მგ პიროგალოლს, რომელიც გახსნილია 1,0 მლ წყალში და 1,0 მლ 1,0%-იან H_2O_2 . რეაქცია მიმდინარეობს 10 წუთის განმავლობაში 25°C-ის პირობებში. ამ დროის გავლის შემდეგ ხსნარს ფერმენტის ინაქტივირებისათვის უმატებენ 5,0 მლ ეთილის სპირტს და ფალტრავენ. ფილტრატში ფოტოელექტრული კოლორიმეტრის საშუალებით 360 ნმ-ზე საზღვრავენ ოპტიკურ სიმკვრივეს.

მიღებულ რიცხვს აკლებენ ფერმენტ პოლიფენოლოქსიდაზის შესაძლო მოქმედების სიდიდეს. ამისათვის სპეციალურ სინჯარას ათავსებენ ზემოთ მოყვანილი რეაქციის საერთო სქემით იმ პირობით, რომ 1,0 მლ 1%-იანი წყალბადის ზეჟანგის ნაცვლად შეაქვთ 1,0 მლ წყალი.

ლიტერატურა

1. Асатрянн В. С., Ферментные методы анализа, М., «Наука», 1969.
2. Бокучава М. А., Биохимия чая и чайного производства, изд. АН СССР, 1958.
3. Methods in enzymology, Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, N. Y., Academic Press, vol. X, 1967, Oxidation and phosphorylation vol, XIII, 1969, Citric acid cycle.

ჰიდროლაზების აქტივობის რაოდენობითი განსაზღვრა

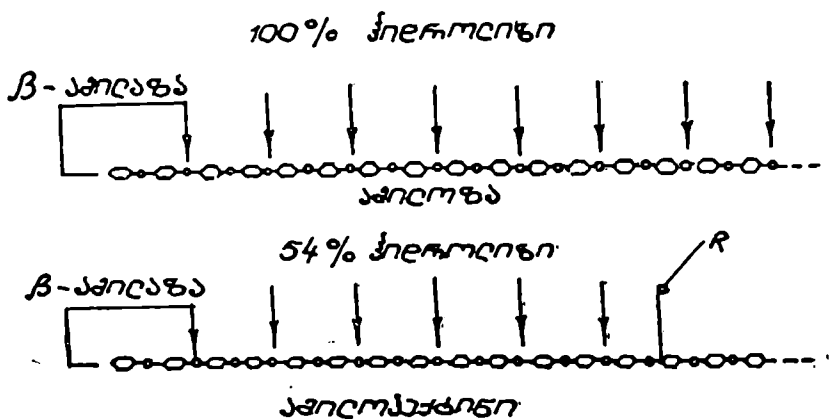
ამილაზები

ამილაზები წარმოდგენენ ბუნებაში ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ ფერმენტთა კომპლექსს. ამ კომპლექსის წარმომადგენლები აღმოჩენილია ყველა სახის ბიოლოგიურ ობიექტში: ცხოველურში (ნერწყვისა და ღვიძლში), მცენარეულში (ხორბალსა და კარტოფილში) და მიკროორგანიზმებში (ობის სოკოებსა და ბაქტერიებში). ყველა აღნიშნულ ობიექტში ამილაზები ასრულებენ ერთსა და იმავე ფუნქციას, მოქმედებენ ამილოზის ტიპის პოლისაქარიდებზე, ე. ი. α —1,4 გლუკანური ტიპის მქონე გლუკოზისაგან შემდგარ პოლიმერებზე და შლიან მათ დაბალმოლეკულურ ოლიგოდი-და მონოსაქარიდებამდე.

ამილაზების კომპლექსი რამდენიმე ფერმენტისაგან შედგება. მათგან აღსანიშნავია α -ამილაზა, გლუკოამილაზა და β -ამილაზა. ეს ფერმენტები განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან როგორც სუბსტრატის (მაგ. სახამებლის) ჰიდროლიზის პროდუქტებით, ასევე მთელი რიგი სხვა ფიზიკო-ქიმიური თვისებებით. ასე მაგალითად: α -ამილაზა სახამებლის ჰიდროლიზის შედეგად იძლევა გლუკოზას, მალტოზას და მალტოტრიოზას, გლუკოამილაზა — გლუკოზას, ხოლო β -ამილაზა — β -მალტოზას. ამ ფერმენტებიდან განსაკუთრებით გავრცელებულია და დიდი გამოყენება აქვს მრეწველობაში α -ამილაზასა და გლუკოამილაზას. ამ უკანასკნელ ხანს აღნიშნული ფერმენტების მაღალხარისხოვნად გასუფთავებულმა პრეპარატებმა გამოყენება პოვეს მედიცინაში (საქმლის მონელებაში, ღვიძლისა და სხვა ორგანოების გლიკოგენზე დაავადებათა მკურნალობაში). არსებული მონაცემებით ფერმენტი β -ამილაზა (ფკ 3. 2. 1. 2,

α -1,4 გლუკან-მალტოპიძროლაზა) მხოლოდ უმაღლესი მცენარე-
ების ქსოვილებშია აღმოჩენილი, მაგალითად, ქერის ალაოში, ხორ-
ბალში, ტბილ კარტოფილში და სხვა. ყველა აღმოჩენილი β -ამი-
ლაზა ადვილად ინჰიბირდება სპილენძით და სპეციფიკური SH-
რეაგენტებით. აქედან გაკეთებულია დასკვნა, რომ β -ამილაზის მო-
ლეკულაში SH-ჯგუფები ლოკალიზებულია ფერმენტის აქტიურ
ცენტრში. β -ამილაზების pH-ოპტიუმში ძირითადად მერყეობს 4,0
— 5,0 საზღვრებში.

განსაკუთრებით საყურადღებო მონაცემებია მიღებული β -ამი-
ლაზის მოქმედების შესახებ. საინტერესო იყო დასადგენად, თუ
როგორ შლის პოლისაქარიდ ამილოზის მოლეკულას β -ამილაზა,
მთლიანად დაჰყავს β -მალტოზაზე ერთი მოლეკულა და შემდეგ
იწყებს სეორე მოლეკულაზე მოქმედებას, თუ აწარმოებს ამილო-
ზის მოუწყვსრიგებელ ჰიდროლიზს. თავდაპირველად მიჩნეული
იყო, რომ β -ამილაზა მთლიანად ერთი ამილოზის მოლეკულას
შლის β -მალტოზაზე და მერე იწყებს სუბსტრატის შენდგობი მო-
ლეკულის ჰიდროლიზს. ბაგრამ, როგორც აღმოჩნდა, β -ამილაზის
მოლეკულა ჰიდროლიზის ყოველი აქტის შემდეგ შორდება სუბს-
ტრატს, ე. ი. აწარმოებს ამილოზის მოუწყვსრიგებელ ჰიდროლიზს.
არ არის გამორიცხული იმიც, რომ სხვადასხვა წარმოშობის β -
ამილაზები მოქმედებენ სუბსტრატზე განსხვავებული მექანიზმე-
ბით. β -ამილაზის მოქმედების სქემა ამილოზაზე და ამილოპექტინ-
ზე მოცემულია 57 სურათზე.



სურ. 57. β -ამილაზის მოქმედების სქემა ამილაზაზე და ამილოპექტინზე.

ეს ფერმენტი α—1.4 გლუკანური ტიპის ბმების ჰიდროლიზს ახდენს პოლისაქარიდებში, რომლებიც შეიცავენ სამზე მეტ D-გლუკოზის ნაშთს და დაკავშირებული არიან α—1,4 ტიპის გლუკანური ბმებით. α—ამილაზა მოქმედებს სახამებელზე, გლიკოგენზე და მათ მსგავს პოლი-და ოლიგოსაქარიდებზე.

მცენარეული α—ამილაზა, რომელსაც აგრეთვე დიასტაზას უწოდებენ, აღმოჩენილი იქნა კირპოფის მიერ 1814 წელს, ხოლო შემდეგ იაპონელმა მკვლევარმა ტაკაჰინემ 1884 წელს ეთანოლით პირველად გამოყო α—ამილაზის აქტიური ფერმენტული პრეპარატი. ამის შემდეგ α—ამილაზა აღმოჩენილ იქნა ბევრ სხვადასხვა ორგანიზმში, როგორც ცხოველურ ასევე მცენარეულ და მიკროორგანიზმებში. აქ მაგალითად, გამოყოფილია და შესწავლილია ადამიანისა და ცხოველების ნერწყვის (პტიალინი) და კუჭქვეშა ჯირკელის α—ამილაზები. მეტად აქტიურია ჭვავის ალაოდან გამოყოფილი ფერმენტი. საყოველთაოდ ცნობილია და ყველაზე ფართო გამოყენებას პოულობენ მიკროორგანიზმებიდან, კერძოდ ობის სოკოებიდან და ბაქტერიებიდან გამოყოფილი α-ამილაზის ფორმები. მთელ რიგ ეკონომიურად განვითარებულ ქვეყნებში პირველად ფერმენტების გამოყოფა დაიწყო საფეიქრო მრეწველობის მოთხოვნებთან დაკავშირებით, რადგანაც აუცილებელი შეიქნა ისეთი მეთოდის შემუშავება, რომელიც ქსოვილიდან რაციონალურად და ეფექტურად მოაშორებდა სახამებლის ნარჩენებს და ამავე დროს არ დაარღვევდა ქსოვილის ცელულოზას.

გარდა საფეიქრო მრეწველობისა ობის სოკოების, კერძოდ ასპერგილების ოჯახის, α—ამილაზის და გლუკამილაზის კომპლექსური პრეპარატები ფართო გამოყენებას პოულობენ კვების მრეწველობაში. ამ ფერმენტებით დამუშავებული კარტოფილისა და ხორბლის სახამებლიდან მიიღება ძირითადად მონო-და დისაქარიდები D—გლუკოზის და მალტოზის სახით, რომლებიც სრულად ღებულობენ მონაწილეობას სპირტულ დუდილში, რის შედეგადაც სპირტის გამოსავალი საგრძნობლად იზრდება.

ობის სოკოების და ბაქტერიული წარმოშობის α-ამილაზები გამოიყენება ლუდის დამზადების დროს. ლუდის წარმოება იმით განსხვავდება სპირტის წარმოებისაგან, რომ არ საჭიროებს შაქრების მთლიან დადუღებას და პირიქით, მოითხოვს მცირე რაოდენობის დექსტრინების (რამოდენიმე D-გლუკოზის ნაშთისაგან შემდგარ

ოლიგოსაქარიდების) შენარჩუნებას მზა პროდუქტში, რადგან ეს უკანასკნელნი ლუდს აძლევენ სპეციფიკურ გემოს, სიბლანტეს და ქაფის წარმოქმნის უნარს.

საბჭოთა კავშირში, აშშ-ში, ინგლისში, იაპონიაში და ზოგიერთ სხვა ქვეყნებში α -ამილაზა გამოიყენება პურის ცხობის პროცესში. პურის ფქვილში ბუნებრივად არსებობს ფერმენტი α -ამილაზა, მაგრამ ამ ფერმენტის რაოდენობა და მისი ხორბლის პოლისაქარიდებზე მოქმედების პერიოდი იმდენად მცირეა, რომ ფქვილში არსებული α -ამილაზა თითქმის არავითარ გავლენას არ ახდენს მზა პურის ხარისხზე. ბაქტერიული და სოკოვანი ამილაზების დანატება საგრძნობლად ზრდის პურის ცომში გლუკოზის რაოდენობას და აღმოქმედებს პურის ხარისხს.

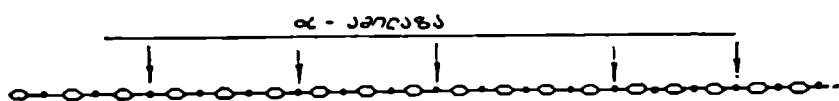
დღემდე ყველა ცნობილი α -ამილაზა მათი მოლეკულების აქტიურ კონფორმაციულ მდგომარეობაში შენარჩუნებისათვის, საჭიროებენ კალციუმს, და მიუხედავად იმისა, რომ მოქმედებენ ერაზსა და იმავე სუბსტრატებზე და მოქმედების მექანიზმით თითქმის არ განსხვავდებიან, მთელი რიგი განმასხვავებელი ფიზიკო-ქიმიური თვისებები გააჩნიათ. ასე მაგალითად, α -ამილაზები განსხვავდებიან მოლეკულური მასებით, pH-ოპტიუმით, ამინომჟავური შედგენილობით, თერმოსტაბილობით და ბევრი სხვა ფიზიკო-ქიმიური თვისებებით.

მოქმედების მექანიზმი ყველა ცნობილ α -ამილაზებს თითქმის ერთი და იგივე აქვთ. ეს ფერმენტები აწარმოებენ სახამებლის მოუწყესრაგებელ ჰიდროლიზს და ხლეჩენ მხოლოდ α -1,4 ტიპის გლუკონურ ბმას სახამებლის მოლეკულაში D-გლუკოზის პირველ ნახშირბადის ატომსა და ქანგბადს შორის, რომლითაც ეს ნახშირბად-ატომი დაკავშირებულია მეზობლად მდებარე გლუკოზის მოლეკულასთან. ცნობილია აგრეთვე ისიც, რომ რაც უფრო მცირდება ამილაზის მოლეკულა α -ამილაზა ჰიდროლიზს უფრო ნაკლები სიჩქარით აწარმოებს, ე. ი. α -ამილაზის ფერმენტული რეაქციის სიჩქარე დამოკიდებულია სუბსტრატის პოლიმერიზაციის ხარისხზე. α -ამილაზას მოქმედების სქემა ამილაზაზე წარმოდგენილია 58 სურათზე.

ჩვენ ქვემოთ განვიხილავთ მიკრობული წარმოშობის α -ამილაზებს, რომელნიც გამოიყენება კვების მრეწველობაში, მსუბუქ მრეწველობაში და მედიცინაში.

ფართოდაა ცნობილი და კარგად არის შესწავლილი *Aspergillus*-ის α -ამილაზა. ამ კლასის მიკროორგანიზმები ორ ჯგუფად იყოფა, ესენია: მომწვანო-ყვითელი ასპერგილები და შავი ასპერგილები.

იმის მიხედვით, თუ რომელ ჯგუფს მიეკუთვნება ესა თუ ის ასპერგილი, განსხვავდება მათ მიერ სინთეზირებული α -ამილაზაც. მომწვანო-ყვითელი ასპერგილების α -ამილაზის pH-ოპტიმუმა 4,7—4,8; pH—3,0-ის პირობებში ეს ფერმენტი განიცდის დენატურაციას. ამ ფერმენტის მოლეკულური მასა უდრის 54000. შავი ასპერგილების α -ამილაზას სხვანაირად მქავე-გამძლე ამილაზას უწოდებენ, რადგან ეს ფერმენტი pH-2-ის პირობებშიც კი არ კარგავს აქტივობას. ცხადია, ფერმენტის ასეთი იშვიათი მქავე-გამძლე თვისებები მთელ რიგ საწარმოო პროცესებში უპირატესობას ანიჭებს შავი ასპერგილების α -ამილაზას. აქვე უნდა ითქვას, რომ ეს ფერმენტი შედარებით მცირე ხანია რაც აღმოჩენილია და მის შესახებ ლიტერატურაში ჯერ არ არის მოცემული ისეთი ამომწურავი მონა-



სურ. 58. α -ამილაზის მოქმედების სქემა ამილაზაზე.

ცემები, როგორც მომწვანო-ყვითელი ასპერგილების α -ამილაზის შესახებ.

ბაქტერიული ამილაზები, როგორც სოკოვანი წარმოშობის α -ამილაზა, α -ტიპის ფერმენტებს მიეკუთვნებიან. მოუხედავად იმისა, რომ ეს ფერმენტები მთელი რიგი ფიზიკო-ქიმიური თვისებებით განსხვავდებიან, სუბსტრატის ჰიდროლიზის შედეგად იძლევიან იმავე პროდუქტებს. განსაკუთრებით კარგადაა შესწავლილი *Bacillus subtilis*-ის α -ამილაზა და *Bacillus stearothermophilus*-ის თერმოსტაბილური α -ამილაზა. ამ უკანასკნელის მოქმედებას pH-ოპტიმუმი შეადგენს, 5,9—6,1, ეს ფერმენტი შეიცავს კალციუმს. და თუთიის იონების თანაობისას წარმოქმნის დიმერს. ფერმენტის დიმერული ფორმის მოლეკულური მასა უდრის 96900.

საერთოდ ბაქტერიული α -ამილაზები უფრო თერმოსტაბილური არიან სოკოვანი წარმოშობის ამილაზებთან შედარებით. განსაკუთრებით თერმოსტაბილური თვისებებით ხასიათდება *B. stearothermophilus*-ის α -ამილაზა, რომელიც ინარჩუნებს მისთვის დამახასიათებელი აქტივობის 70%-ზე მეტს 85° პირობებში, ორი საათის ინკუბაციის შემდეგ. ცხადია, რომ ამ ფერმენტის გამოყენება იმ პროცესებში, რომლებიც მაღალი ტემპერატურის პირობებში მიმდინარეობს, ძალზე ეფექტურია.

(დექსტრინოგენური ანუ ამილოზური უნარი)

ფერმენტ ამილაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც იწვევს ერთი გრამი სახამებლის ჰიდროლიზის კატალიზს 30°C -ზე 1 სთ-ის განმავლობაში განსაზღვრულ სტანდარტულ პირობებში.

α-ამილაზის აქტივობის საერთაშორისო ერთეულად (AC) მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც იწვევს 1 მიკრომოლი სახამებლის ჰიდროლიზის კატალიზს 1 წთ-ის განმავლობაში სტანდარტულ პირობებში.

რეაქტივები:

1. ფერმენტული ხსნარების მომზადება

ა) ფერმენტული პრეპარატებიდან

ანალიზურ სასწორზე 25—30 მლ მოცულობის კიჩაში იწონება ფერმენტული პრეპარატი 0,1 გრამის რაოდენობით და იხსნება მცირეოდენი გამოხდილი წყლის დამატებით და მინის წკირის ინტენსიური მორევით. 0,1 გ წონაკი აიღება ფერმენტული პრეპარატის საშუალო სინჯიდან. ამის შემდეგ მიღებული ხსნარი მთლიანად გადააქვთ 100 მლ მოცულობის საზომ კოლბაში და ანჯღრევენ ცოტაოდენი გამოხდილი წყლის მიმატებით. კოლბას ავსებენ საზომ ხაზამდე, ანჯღრევენ და საჭიროების შემთხვევაში აცენტრალუგირებენ. ძირითადი ხსნარიდან ამზადებენ ფერმენტის სამუშაო ხსნარს განზავების საშუალებით, ისეთი რაოდენობით, რომ 5 მლ სამუშაო ხსნარი შეიცავდეს ფერმენტის იმდენ რაოდენობას, რომელიც მოცემულ პირობებში უზრუნველყოფდა სახამებლის ჰიდროლიზს 20-დან 70% მდე. ამისათვის იღებენ ძირითადი ხსნარის სხვადასხვა რაოდენობას იმისდა მიხედვით, თუ რა აქტივობის გამოსაკვლევ პრეპარატთან გვაქვს საქმე და ანზავებენ გამოხდილი წყლით 50 მლ-მდე, როცა გამოსაკვლევ პრეპარატის აქტივობაა 20-დან 700 ერთეულამდე, და 200 მლ-მდე როცა პრეპარატის აქტივობა არის 700 ერთეული და მეტი.

ბ) ობის სოკოების ზედაპირული კულტურებიდან

ზედაპირულ კულტურას გულმოდგინედ სრესენ ფაიფურის როდინში. აქედან იღებენ 5 გრამ წონაკს და გადააქვთ 200—250 მლ მოცულობის კოლბაში, უმატებენ 10 მლ აცეტატის ბუფერს (pH 4,7) და 90 მლ გამოხდილ წყალს. ნარევის აყოვნებენ 1 საათის გან-

შავლობაში თერმოსტატში 30°C-ზე: პერიოდულად ანჭლრევენ, შემდეგ აცენტრიფუგირებენ და მიღებულ ხსნარს იყენებენ სამუშაო ხსნარების დასამზადებლად. ამისათვის იღებენ ძირითადი ხსნარის სხვადასხვა რაოდენობას და ანზავებენ გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე, იმის და მიხედვით თუ რა აქტივობისაა გამოსაკვლევი ხსნარი.

გ) სიღრმული კულტურებიდან

ფერმენტის აქტივობის გამოსაკვლევად კულტურული სითხე უნდა გაიფილტროს და შემდეგ განზავდეს გამოხდილი წყლით საჭიროების მიხედვით.

2. სუბსტრატი — 1%-იანი სახამებლის ხსნარის მომზადება

სუბსტრატის მოსამზადებლად იყენებენ ხსნად კარტოფილის სახამებელს. სახამებლის 1%-იანი ხსნარის მოსამზადებლად 5,5 გ სახამებლის წონაჲს ათავსებენ 500 მლ მოცულობის კოლბაში (5, გ ვილებით სახამებლის ტენიანობის გათვალისწინებით), უმატებენ 25 მლ გამოხდილ წყალს და ურევენ. შემდეგ ისევ უმატებენ 25 მლ გამოხდილ წყალს და კოლბას დგამენ აღულებული წყლის აბაზანაზე, სადაც აჩერებენ 25 წთ-ის განმავლობაში მუდმივი ნჭლრევის პირობებში, სახამებლის მთლიან გახსნამდე. ამის შემდეგ კოლბას აციეებენ და უმატებენ 50 მლ აცეტატის ბუფერს (pH 4,7) სოკოვანი წარმოშობის ფერმენტული პრეპარატების ანალიზის დროს. მკვლევამდე ამილაზის შემთხვევაში იყენებენ აცეტატის ბუფერს (pH 5,5). ხსნარის გაციეებისა და ბუფერის დამატების შემდეგ ხსნარს ავსებენ საზომ ხაზამდე გამოხდილი წყლით და ხელახლა ანჭლრევენ.

სუბსტრატის ოპტიკური სიმკვრივის შემოწმებისათვის ხსნარს ასხავენ 10 მლ-იან სინჯარაში, უმატებენ 5 მლ გამოხდილ წყალს და ურევენ. შემდეგ 0,5 მლ ხსნარს უმატებენ 50 მლ იოდის სამუშაო ხსნარს. მიღებული ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე უნდა უდრიდეს დაახლოებით 0,7-ს, ფოტოელექტროკოლორიმეტრში წითელ უექტილტრზე, λ-656 ნმ, (კონტროლი გამოხდილი წყალი).

3. ბუფერული ხსნარები

ა) აცეტატის ბუფერი (pH 4,7)

1N CH₃COOH, 1N CH₃COONa 1:1

1N ძმარმკვასის მოსამზადებლად იყენებენ ცინულოვან ძმარმკვასის 57,25 მლ-ს (60, 12 გ) ან ქიმიურად სუფთა ძმარმკვასის 52,63 მლ (61,22 გ) და ავსებენ 1 ლიტრამდე გამოხდილი წყლით.

1N CH_3COONa -ის მოსამზადებლად იღებენ 82 გ უწყლო CH_3COONa ან 136 გ $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ და ავსებენ 1 ლიტრამდე გამოხდილი წყლით.

4. იოდის ხსნარი

ა) იოდის ძირითადი ხსნარი

0,5 გ იოდის ფხვნილს და 5,0 გ KI ათავსებენ ბიუქსში შლი-ფიანი თავსახურით და უმატებენ 2 მლ გამოხდილ წყალს, ფრთხილად ანჯღრევენ იოდის მთლიან გახსნამდე, შემდეგ ხსნარი გადა-აქვთ 200 მლ საზომ კოლბაში და ავსებენ ხაზამდე გამოხდილი წყლით. ძირითად ხსნარს ინახავენ სიბნელეში მუქი ფერის კუბ-პელში. ხსნარი ვარგისია 1 თვის განმავლობაში.

ბ) იოდის სამუშაო ხსნარი.

იოდის სამუშაო ხსნარს ამზადებენ ძირითადი ხსნარიდან. ამო-სათვის 2,0 მლ ძირითად ხსნარს ანზავებენ 0,1N მარილმჟავით 100 მლ-მდე საზომ კოლბაში.

აქტივობის განსაზღვრისა და გამოთვლის ტექნიკა სახამებ-ლის ჰიდროლიზის ფერმენტული რეაქციით მიმდინარეობს მკაც-რად სტანდარტულ პირობებში $t=30^\circ\text{C}$, pH 6,0 ბაქტერიული წარ-მოშობის პრეპარატებისათვის და pH 4,7 სოკოვანი წარმოშობის პრე-პარატებისათვის, რეაქციის დროს $t=10$ წთ, სუბსტრატის კონცენტ-რაციაა 1%, სარეაქციო ხსნარის მოცულობა 15 მლ (10 მლ სუბს-ტრატი და 5 მლ ფერმენტული ხსნარი).

ანალიზისათვის იღებენ ორ სინჯარას (2 სმ დიამეტრით და 16 სმ სიმაღლით), თითოეულში ასხამენ 10 მლ 1%-იან სახამებლის ხსნარს და ათავსებენ ულტრაბერმოსტატში 30°C -ზე.

ბერმოსტატში სინჯარებს აყოვნებენ 10—15 წთ-ით იმისათვის, რომ ხსნარებმა მიიღონ საჭირო ტემპერატურა. შემდეგ, პირველ სინჯარაში უმატებენ 5 მლ გამოხდილ წყალს (კონტროლი), მეო-რეში კი 5 მლ ფერმენტულ ხსნარს. მიღებულ ნარევებს სწრაფად ურევენ, თითოეულს ცალ-ცალკე, და ტოვებენ ბერმოსტატში 10 წთ-ის განმავლობაში (დრო იზომება წამმზომით). 10 წთ-ის შემ-დეგ საკონტროლო და საცდელი სინჯარებიდან იღებენ 0,5 მლ და გადააქვთ კოლბებში, სადაც წინასწარ მოთავსებულია 50 მლ იო-დის სამუშაო ხსნარი 0,1N HCl-ში. მიღებული ხსნარების არევით-ერთბუნად მიმდინარეობს ფერმენტის ინაქტივაცია 0,1N HCl-ით და იოდსახამებლის რეაქცია. კოლბებს ანჯღრევენ, რის შემდეგაც ხსნა-რები შეიფერებიან: კონტროლი—ლურჯად, საცდელი ხსნარი კი იის-

ფრად, სხვადასხვა ინტენსივობით, რაც დამოკიდებულია სახამებლის ჰიდროლიზის ხარისხზე. შეფერილი ხსნარების ოპტიკურ სიმკვრივეს საზღვრავენ ფოტოელექტროკოლორიმეტრზე 1 სმ სიგრძის წახნაგის მქონე კიუვეტებში, წითელი შუქფილტრი, $\lambda = 656$ ნმ. კოლორიმეტრიკებას ატარებენ წყალთან შედარებით. იღებენ ოპტიკური სიმკვრივის ორ მნიშვნელობას: D_1 —საკონტროლო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე დაახლოებით 0,7 D_2 —ფერმენტული ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე — 0,18—0,40.

ჰიდროლიზებული სახამებლის რაოდენობა ისაზღვრება შემდეგი განტოლებით

$$C = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0,1 \text{ გ}$$

ობის სოკოებიდან მიღებული პრეპარატებისათვის α -ამილაზური აქტივობა შემდეგი ფორმულით გამოითვლება

$$a. \text{ აქტ.} = \frac{7,264 \cdot c - 0,03766}{n} \cdot 1000 \text{ ერთ/გ}$$

n — ფერმენტის რაოდენობა აღებული ანალიზისათვის მგ-ში ან მლ-ში.

c — ჰიდროლიზებული სახამებლის რაოდენობა.

ბაქტერიული წარმოშობის პრეპარატებისათვის α -ამილაზური აქტივობა შემდეგი ფორმულით გამოითვლება

$$a. \text{ აქტ.} = \frac{5,885 \cdot C + 0,001671}{n} \cdot 1000 \text{ ერთ/გ}$$

გლუკოამილაზა

(ფა 3.2.1.3, α -1.4-გლუკან—გლუკოჰიდროლაზა)

გლუკოამილაზა აწარმოებს α —1,4 და α —1,6 გლუკანური ტიპის ბმების ჰიდროლიზს. აღნიშნული ფერმენტი პოლისაქარიდს. არარედუცირებადი ბოლოდან თანმიმდევრობით ამორებს D-გლუკოზის ნაშთს, მოქმედებს სახამებელზე, გლიკოგენზე და მათ მავარ პოლი-და ოლიგოსაქარიდებზე. სახამებელზე მოქმედების შედეგად იძლევა მხოლოდ D-გლუკოზას.

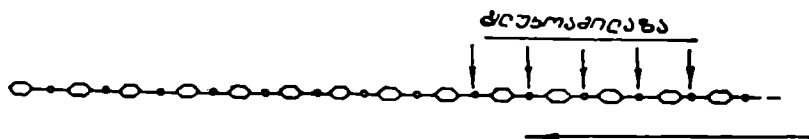
დღემდე ცნობილი გლუკოამილაზები ძირითადად იყოფიან მკვე და ნეიტრალურ ფერმენტებად, იმისდა მიხედვით თუ pH-ის

რომელ დიაპაზონში ამჟღავნებენ მაქსიმალურ აქტივობას, pH 3,5—5,5 თუ pH 6,0—7,5.

ცხოველური ორგანიზმებიდან გამოყოფილი და შესწავლილია ამ ფერმენტის ორივე ფორმა. მიკროორგანიზმებში გლუკოამილაზა კვებდება ობის სოკოების *Aspergillus*-ისა და *Rhizopus*-ის წარმომადგენლებში და საფუარ *Endomycopsis*-ის კულტურებში მჟავაგამძლე ფერმენტის სახით. უნდა ითქვას, რომ მიკრობული წარმოშობის გლუკოამილაზებიც არაერთგვარად მჟავაგამძლეებია. ზოგიერთი მათგანი pH 2,5-ის პირობებში კარგავს აქტივობას, ზოგი კი pH 2,0-ის არესაც კარგად იტანს. ზოგიერთი მკვლევარის აზრით ეს გარემოება იმით აიხსნება, რომ გლუკოამილაზის ფორმა შეიცავს ნახშირწყლოვან ნაწილს მეტ-ნაკლები რაოდენობით (დაახლოებით 17—20%). სხვადასხვა წყაროებიდან გამოყოფილი გლუკოამილაზების მოლეკულური მასები მერყეობს 54000—74000-მდე. რაც შეეხება მოქმედების მექანიზმს, გლუკოამილაზები უფრო აქტიურად მოქმედებენ გრძელჭაჭვიან სუბსტრატებზე და ახდენენ გლუკოზის ნაშთის ჰიდროლიზს არარედუცირებული ბოლოდან.

სუბსტრატის ჯაჭვის შემცირებასთან ერთად ფერმენტის აქტივობა საგრძნობლად მცირდება. გლუკოამილაზა სრულად აწარმოებს თითოეული სუბსტრატის ჰიდროლიზს გლუკოზამდე და შემდეგ უკავშირდება მომდევნო მოლეკულას, ამით ეს ფერმენტი განსხვავდება α -ამილაზისა და β -ამილაზისაგან. იმის გამო, რომ გლუკოამილაზის მოქმედების შედეგად მიიღება მხოლოდ გლუკოზა, ამ ფერმენტმა დიდი გამოყენება პოვა სახამებლიდან გლუკოზის მიღებაში. დღეისათვის იაპონიაში, კანადაში, აშშ-ში გლუკოზა მიიღება ძირითადად სახამებლისაგან ფერმენტული დამუშავებით, რაც გაცილებით უფრო ეკონომიურია, ვიდრე მარილმჟავათი ჰიდროლიზის მეთოდი. 60—70 სთ-ის განმავლობაში სოკოვანი წარმოშობის გლუკოამილაზას სახამებლის თოქმის 99% გლუკოზაში გადაყავს, რის შემდეგაც ხსნარებს აკონცენტრირებენ და გლუკოზას აკრისტალებენ. 59 სურათზე მოცემულია გლუკოამილაზის მოქმედების სქემა ამილოზაზე. სერიოზული ხელის შემშლელი პირობა ამ პროცესის დროს არის ის, რომ გლუკოამილაზის პრეპარატებს ყოველთვის თან ახლავს სხვა ფერმენტი — ტრანსგლუკოზილაზა, რომელიც იწვევს სუბსტრატის მოდიფიკაციას α —1,6 გლუკანური ბმების წარმოქმნით და ამით ამცირებს გლუკოზის გამოსავალს. ტრანს-გლუკოზიდაზის მოსაშორებლად გლუკოამილაზის ხსნარებს სხვადასხვანაირად ამუშავებენ: შემჟავებით pH—2,0 და 20—24 სთ-ის დაყოვნებით; ტუტე პირობების შექმნით pH 9,0; მჟავე იაპონური

თხით დამუშავებით, რომელიც ტრანსგლუკოზიდაზისათვის სორბენტს წარმოადგენს და იონცვლად ფისებზე გატარებით ისეთ პირობებში, რომ ტრანსგლუკოზილაზა დაცილებული იქნეს გლუკო-ამილაზასაგან.



სურ. 59, გლუკოამილაზის მოქმედების სქემა ამილაზაზე.

ობის სოკოების გლუკოამილაზა α -ამილაზასთან ერთად გამოიყენება საკმლის მონელების გაუმჯობესების მიზნით. ამ პრეპარატების მიღება განსაკუთრებით მიზანშეწონილია იმ პირთათვის, რომელთაც დაქვეითებული აქვთ ამილაზების სინთეზის დონე. უკანასკნელ ხანებში დიდი პერსპექტივები ისახება გლუკოამილაზებს პრეპარატებით ღვიძლისა და სხვა ორგანოების გლიუკოგენურ დაავადებათა მკურნალობაში. ამ მიზნისათვის გათვალისწინებული გლუკოამილაზები აბსოლუტურად ჰომოგენური უნდა იყოს, რათა არ გამოიწვიოს რაიმე სხვა გარეშე ეფექტი გარდა გლიუკოგენის ჰიდროლიზისა. სამრეწველოდ გათვალისწინებული გლუკოამილაზის ყველაზე აქტიურ პროდუცენტებად მიჩნეული არიან საფუარები *Edomyopsis*-ის ოჯახიდან და განსაკუთრებით ობის სოკოები. ამ შემთხვევებში გლუკოამილაზა წარმოადგენს ექსტრაქტულ ფერმენტს, ე. ი. ადგილი აქვს ამ ფერმენტის სეკრეციას კულტურალურ სითხეში, რაც გაცილებით აადვილებს ფერმენტის შემდგომ გასუფთავებას არააქტიური ცილებისაგან იმ მდგომარეობამდე, რომ ეს ფერმენტი გამოყენებული იქნას სამედიცინო თვალსაზრისით.

გლუკოამილაზის აქტივობის განსაზღვრა

გლუკოამილაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც ხსნად სახამებელზე მოქმედებისას ათავისუფლებს 1 მიკრომოლ გლუკოზას 1 წთ-ის განმავლობაში, pH 4,7 და $t=30^{\circ}\text{C}$ -ის დროს.

რ ე ა ქ ტ ი ვ ე ბ ი

1. გამოსაყვლევი ფერმენტული ხსნარი (გლუკოამილაზა)

2. 1%-იანი ხსნადი სახამებლის ხსნარი 1M აცეტატის ბუფერში (pH 4,7) (სუბსტრატი.)

3. 1 M აცეტატის ბუფერი (pH 4,7)

4. 0.5 M ტრის-HCl ბუფერი (pH 7,0)

61 გ ტრისი იხსნება 85 მლ 5N HCl-ში და ივსება 1 ლიტრამდე გამობდილი წყლით.

5. გლუკოზოქსიდაზის წონაკს, რომელიც შეესაბამება 500 ერთეულს (ჩვეულებრივად იგი ტოლია 5 მგ-ის), ხსნიან 50 მლ 0.5M ტრის-ბუფერში (pH 7,0) და იმავე ხსნარში უმატებენ 2 მგ პეროქსიდაზას. შენახვის მიზნით მიღებულ ხსნარს უმატებენ 0,3%-ქლოროფორმს. ასეთი ხსნარი შეიძლება შეინახოს მაცივარში ორ კვირამდე.

6. ო-დიანიზიდინის ხსნარი.

5 მგ გოგირდმევა ო-დიანიზიდინი უნდა გაიხსნას 50 მლ გამობდილ წყალში. ეს ხსნარი შეიძლება შეინახოს მაცივარში ორ კვირამდე.

7. გლუკოზოქსიდაზური რეაქტივი

1 ნაწილს გლუკოზოქსიდაზისა და პეროქსიდაზის ხსნარს ურევენ 1 ნაწილი ო-დიანიზიდინის ხსნარს. რეაქტივი ინახება მაცივარში 2—3 დღე.

8. გლუკოზის სტანდარტული ხსნარები

სტანდარტული ხსნარების მოსამზადებლად იყენებენ სპირტით გამოკრისტალებულ უწყლო გლუკოზას, რომელსაც ინახავენ ექსიკატორში CaCl_2 -ზე. გლუკოზის ხსნარებს, რომლებიც შეიცავენ 10,30 და 60 მკგ გლუკოზას 1 მლ ხსნარში, ამზადებენ ბენზოის მჟავას ნაჯერ ხსნარზე (2,7 გ ბენზოის მჟავა 1 ლ-ზე). ასეთი ხსნარები შეიძლება შეინახოს მაცივარში 1 წლის განმავლობაში.

ა ნ ა ლ ი ზ ი ს მ ს ვ ლ ე ლ ო ბ ა :

სინჯარაში ათავსებენ 10 მლ სუბსტრატს და დგამენ 5 წუთით თერმოსტატში 30°C -ის პირობებში. შემდეგ უმატებენ 5 მლ ფერმენტულ ხსნარს. თუ ფერმენტული ხსნარი აქტიურია, შესაძლებელია 1 მლ ხსნარის შეტანაც კი იმ პირობით, რომ 4 მლ გამობდილი წყალი დაემატება. 10 წუთით ფერმენტისა და სუბსტრატის ხსნარების ინკუბაციის შემდეგ 1,0 მლ ფერმენტული ხსნარი გადააქვთ პატარა სინჯარაში. სადაც ახდენენ ფერმენტის ინაქტივაციას, სინჯარის მდულარე წყლის აბაზანაში მოთავსებით, 2 წთ-ის განმავლობაში (სინჯარა თავდახურულია მინის საცობით).

საკონტროლო; 10 მლ სუბსტრატი+5 მლ გამოხდილი წყალი; გაცივების შემდეგ თითოეულ სინჯარას ემატება 2,5 მლ გლუკოზოქსიდაზური რეაქტივი, ანჯღრევენ და შეაქვთ თერმოსტატში 30°C-ზე 30 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც ზომავენ ოპტიკურ სიმკვრივეს 420 ნმ-ზე

გლუკოამილაზური აქტივობა (გ. ა.) ისაზღვრება შემდეგი ფორმულით

$$\text{გ. ა.} = \frac{a \cdot b \cdot 15 \cdot 6}{n} \text{ ერთეული/1 მლ}$$

n—საანალიზოდ აღებული ფერმენტის რაოდენობა;

a—გლუკოზის ნაზარდი მლ-ში;

b—განზავების კოეფიციენტი.

ბ-გალაქტოზიდაზა

(შპ 3. 2. 1. 23, β-D-გალაქტოზიდაზა—გალაქტოჰიდროლაზა)

ეს ფერმენტი ახდენს შემდეგი რეაქციის კატალიზს: β-D-გალაქტოზიდაზა + H₂O = სპირტი + D-გალაქტოზა. მცენარეული წარმოშობის β-გალაქტოზიდაზას ახასიათებს აგრეთვე გალაქტოტრანსფერაზული თვისებები. ჰიდროლაზების ჯგუფის ფერმენტებიდან β-გალაქტოზიდაზა ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული ფერმენტია. ეს ფერმენტი გვხვდება მცენარეებში: (ნუში, ვარდის ფოთლებში, ქლიაფში, ატამში). ცხოველური წარმოშობის β-გალაქტოზიდაზა აღმოჩენილია ადამიანის და ცხოველების ლორწოვან გარსში, ტვინის ქსოვილში და ღვიძლში. განსაკუთრებით დიდი რაოდენობით β-გალაქტოზიდაზას წარმოქმნიან მიკროორგანიზმები, ობის სოკოები, ბაქტერიები და საფუარები. ამ ფერმენტის სამრეწველო გამოყენების თვალსაზრისით განსაკუთრებით საინტერესოა არიან მიკროორგანიზმები. უნდა აღინიშნოს, რომ მიკრობული წარმოშობის β-გალაქტოზიდაზები საგრძნობლად გასხვავდებიან ერთმანეთისაგან. ასე მაგალითად, ბაქტერიული წარმოშობის β-გალაქტოზიდაზა ამჟღავნებს თავის მაქსიმალურ აქტივობას pH 6,0—8,0 ფარგლებში, მაშინ როდესაც ობის სოკოებიდან გამოყოფილი β-გალაქტოზიდაზა აქტიურია უფრო მკავე არეში pH 4,0—6,0, ხოლო საფუარიდან გამოყოფილი ფერმენტის pH-ოპტიმუზია 6,7—7,2.

β-გალაქტოზიდაზა თერმოლაბილური ფერმენტია. მაგალითად, ბაქტერიული წარმოშობის β-გალაქტოზიდაზა 55°C-ის პირობებში,

1 წთ-ის ინკუბაციის შემდეგ მთლიანად კარგავს აქტივობას. საფუ-
არიდან გამოყოფილი β -გალაქტოზიდაზა სტაბილურია 30—40°C
ტემპერატურის დიაპაზონში, 70°C-ის პირობებში კი განიცდის შე-
უქცევად დენატურაციას.

სხვადასხვა წყაროებიდან გამოყოფილი ეს ფერმენტი საგრძ-
ნობლად განსხვავდება ერთმანეთისაგან მთელი რიგი ფიზიკო-ქიმი-
ური თვისებებით. ამ ფერმენტის მოლეკულური მასა პერყვობს
500.000-დან 800.000-მდე. β -გალაქტოზიდაზის მოლეკულური აღ-
ნაგობის შესწავლით დადგინდა, რომ ფერმენტი აქტიურ მდგომა-
რეობაში შეიცავს 4 იდენტურ სუბერთეულს და თითოეული სუბ-
ერთეულის მოლეკულური მასა უდრის 135.000. შარდოვანის ზე-
მოქმედებით ფერმენტი გადადის არააქტიურ ტეტრამერულ მდგო-
მარეობაში. მთელი რიგი მკვლევარების აზრით მესამეული და მეო-
თხეული სტრუქტურა ასეთი დიდი მოლეკულისა ძირითადად გან-
პირობებულია სუბერთეულთა შორის წყალბადური ბმებითა და
პიდროფობური ურთიერთქმედებებით.

მიუხედავად იმისა, რომ β -გალაქტოზიდაზა არამდგრადი ფერ-
მენტია ტემპერატურის მიმართ და აქტივობას ამჟღავნებს pH-ის
შედარებით ვიწრო დიაპაზონში, ამ ფერმენტს დიდი პრაქტიკუ-
ლი გამოყენება აქვს. საქმე იმაშია, რომ β -გალაქტოზიდაზას შესწევს
უნარი ცუდად ხსნადი და უგემური შაქარი — ლაქტოზა, რომე-
ლიც არ იღებს მონაწილეობას სპირტულ დუღილში, დაშალოს გა-
ცილებით უფრო ტკბილ და ძვირადღირებულ მონოსაქარიდებად—
გლუკოზად და გალაქტოზად.

ლაქტოზას დიდი რაოდენობით შეიცავს რძე და მისგან დამზა-
დებული პროდუქტები. რძის სხვადასხვა პროდუქტებად გადამუშა-
ვების შედეგად რჩება იაფი პროდუქტი—შრათი, რომელიც შეი-
ცავს რძეში არსებულ ყველა ცილას კაზეინის გარდა, ყველა ვიტა-
მინებსა და ნახშირწყლებს, რომელთა 90% რძეში წარმოდგენილია
ლაქტოზით.

ფერმენტ β -გალაქტოზიდაზის დამუშავების შედეგად რძის
შრათის გამოყენების მასშტაბები ჩვენს ქვეყანაში გაცილებით გაი-
ზარდა. პურის ცილოვანი ნივთიერებით გამდიდრების თვალ-
საზრისით პურის ცომში ხელოვნურად შეაქვთ გამშრალი
რძე. რძის დამატებით პურში დიდი რაოდენობით ხვდება შა-
ქარი — ლაქტოზა. სწორედ ამ შაქრის ფერმენტული პიდროლი-
ზის მიზნით უკანასკნელ ხანებში პურის ცომში ამილაზებთან
ერთად შეაქვთ ფერმენტი β -გალაქტოზიდაზა.

ფერმენტის ფართოდ გამოყენების პერსპექტივა კვების მრეწველობასა და მედიცინაში სახავს ამოცანებს, რათა მიღებული იქნას β -გალაქტოზიდაზის მაღალი სიხუფთავის ხარისხის მქონე ფერმენტული პრეპარატები. β -გალაქტოზიდაზის საწარმოო დანიშნულების პრეპარატების კლასიკურ პროდუცენტებად დღეისათვის მიჩნეულია ობის სოკოები *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, ბაქტერია *E. coli* და *Fabospora fragilis*-ის ოჯახის წარმომადგენელი საფუარები.

β -გალაქტოზიდაზის აქტივობის განსაზღვრა

β -გალაქტოზიდაზის აქტივობის განსაზღვრის დროს მხედველობაში უნდა იქნას მიღებული ის გარემოება, რომ ამ ფერმენტის აქტივობის განსაზღვრა ორ განსხვავებულ სუბსტრატზე წარმოებს და იმის მიხედვით, თუ რომელი წყაროდანაა გამოყოფილი ფერმენტი, ამ სუბსტრატებზე მოქმედების უნარი განსხვავებულია.

ა) პირველი მეთოდი დამყარებულია სუბსტრატად ლაქტოზის გამოყენებაზე და დაკავშირებულია ჰიდროლიზის პროდუქტებას განსაზღვრაზე სხვადასხვა მეთოდებით: ქიმიური, ფიზიკური, ქრომატოგრაფიული და ფერმენტული.

5 მლ $3 \cdot 10^{-2} M$ ლაქტოზის ხსნარს, რომელიც დაბუფერებულია 0.2 M ფოსფატის ბუფერით (pH 6.9) ემატება 1 მლ ფერმენტული ხსნარი, რის შემდეგ სარეაქციო ხსნარის მოცულობა გამოხდილი წყლით ივსება 10 მლ-მდე. რეაქცია მიმდინარეობს 15 წთ-ის განმავლობაში, $30^{\circ}C$ -ის პირობებში. ხსნარადან იღებენ ორ ნიმუშს: ერთს რეაქციის დაწყებამდე, მეორეს რეაქციის დამთავრების შემდეგ. ფერმენტის მოქმედებას ამ ნიმუშებში წყვეტენ სინჯარების დუღილით წყლის აბაზანაზე 3 წთ-ის განმავლობაში. გაცივების შემდეგ ხსნარებს უმატებენ 3 მლ გლუკოზოქსიდაზურ ხსნარს, რომელიც აგრეთვე შეიცავს პეროქსიდაზისა და კალიუმის ფეროციანიდს. ხსნარის ლიმონის ფერის წარმოქმნა აღწევს მაქსიმუმს 30 წთ-ის შემდეგ, ოთახის ტემპერატურის პირობებში. მოყვითალო ლიმონის ფერის წარმოქმნა აიხსნება, იმით, რომ ფეროციანიდი ფერიციანიდში გადადის. ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე იზომება 400 ნმ სიგრძის ტალღაზე. ამგვარად, წარმოქმნილი გლუკოზის რაოდენობა გამოითვლება საკალიბრო მრუდით, რომელიც აგებულია გლუკოზის სტანდარტულ ხსნარებზე. β -გალაქტოზიდაზის აქტივობის პირობით ერთეულებში განსაზღვრა წარმოებს შემდეგი ფორმულით:

$$g. \text{ აქტ.} = \frac{\text{მგ. გლუკოზა, ნაპოვნი საკალიბრო მრუდით}}{b} \times 3700 \text{ ერთ/მლ}$$

სადაც b არის აღებული ფერმენტის რაოდენობა

β -გალაქტოზიდაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა რომელიც იწვევს 1 მიკრომოლი ლაქტოზის ჰიდროლიზს, 30°C და $\text{pH } 6,9$ -ის პირობებში.

ბ) მეორე მეთოდი დამყარებულია β -გალაქტოზიდაზის უნარზე, აწარმოოს ისეთი სუბსტრატების ჰიდროლიზი, სადაც ლაქტოზის მოლეკულაში, გლუკოზა ჩანაცვლებულია რომელიმე სხვა შაქრით, ანდა არილური ან ალკილური ჯგუფით. მეორე ტიპის მეთოდები უფრო ზუსტია და გაცილებით უფრო ფართოდ გამოიყენება პირველ მეთოდებთან შედარებით. ამ შემთხვევაში სუბსტრატად იხმარება ორთო-ან პარა-ნიტროფენოლ- β -D-გალაქტოპირანოზიდი. რეაქციის დროს ორთო-ან პარა-ნიტროფენოლის გამოყოფილი რაოდენობა ისაზღვრება საკალიბრო მრუდით, რომელიც აგებულია ორთო-ან პარა-ნიტროფენოლის ცნობილ კონცენტრაციებზე.

სუბსტრატის დამზადება:

1. სუბსტრატი — ორთო-ნიტროფენოლ- β -D-გალაქტოპირანოზიდის ხსნარი

(ნიფეგალი).

ანალიზისათვის გამოიყენება $0,01 \text{ M}$ ნიფეგალის ხსნარი (მოლეკულური მასა 301, 26). ხსნარის დასამზადებლად $0,075 \text{ გ}$ ნიფეგალი იხსნება 25 მლ გამოხდილ წყალში. ხსნარი მაცივარში ინახება რამდენიმე კვირის განმავლობაში. თუ ხსნარი გაყვითლდა, ეს იმას ნიშნავს, რომ იგი უვარგისია და საჭიროა მისი ხელახალი მომზადება.

2. $1\text{M Na}_2\text{CO}_3$ -ის ხსნარი

ხსნარი დამზადების შემდეგ აუცილებლად იფილტრება ქაღალდის ფილტრში და ინახება კორპის საცობიან, ან შლიფიან ჭურჭელში ხანგრძლივი დროის განმავლობაში (2—3 თვე) .

3. $0,2 \text{ N Na}$ — ფოსფატის ბუფერი ($\text{pH } 6,9$). ბუფერი მაცივარში ინახება და გამოიყენება ანალიზისათვის, ვიდრე მას ნალექი არ გაუჩნდება.

4. სუსტი $0,001 \text{ N Na}$ ფოსფატის ბუფერი ($\text{pH } 6,9$) — $0,5\%$ -იან MgCl_2 -ში.

ეს ბუფერიც ასევე ინახება მაცივარში და გამოიყენება მხოლოდ ფერმენტული პრეპარატებიდან ფერმენტული ხსნარების დასამზადებლად.

ა ნ ა ლ ი ზ ი ს მ ს ე ლ ე ლ ო ბ ა :

ნიფეგალის ფერმენტული ჰიდროლიზი მიმდინარეობს სტანდარტულ პირობებში: ტემპერატურა 30°C , საანალიზო ნარევის pH 6,9. რეაქციის ხანგრძლივობა 15 წუთი (წამშზომით). სინჯარაში, რომლის დიამეტრი = 2,0 სმ, ხოლო სიმაღლე 18 სმ-ს, შეაქვთ 3,5 მლ 0,2 N Na-ფოსფატის ბუფერი და 0,5 მლ სუბსტრატის — ნიფეგალის ხსნარი. ეს ნარევი სპეციალური შტატივით თავსდება ულტრათერმოსტატში $30-31^{\circ}\text{C}$ -ის პირობებში. ამ პირობებში ხსნარი ყოვნდება 10—15 წუთის განმავლობაში იმისათვის, რომ საანალიზო ნარევმა მიიღოს სტანდარტული ტემპერატურა. ამის შემდეგ ხსნარში შეაქვთ 1,0 მლ ფერმენტული ხსნარი, რომელიც შესაბამისად არის განზავებული. მიღებულ ხსნარს ურევვენ, ხსნარიდან იღებენ 1,0 მლ და გადააქვთ სინჯარაში, რომელიც შეიცავს 1,0 მლ სოდის ხსნარს (საწყისი ხსნარი). სინჯარაში მოთავსებული ნარევი ყოვნდება თერმოსტატში, 15 წუთის განმავლობაში. 15 წუთის შემდეგ კვლავ იღებენ 1,0 მლ სარეაქციო ნარევს (საცდელი ხსნარი), რომელიც ასევე შეაქვთ სინჯარაში, რომელშიც წინასწარ ჩასხმულია 1,0 მლ სოდის ხსნარი. სოდა იწვევს ფერმენტული რეაქციის შეწყვეტას. მიღებულ ხსნარებს (საწყისი და საცდელი ხსნარი) ემატება 2,0 მლ გამოხდილი წყალი და ხსნარები გულმოდგინედ ირევა. ხსნარების საერთო მოცულობა სინჯარაში შეადგენს 10 მლ-ს. ოთახის ტემპერატურის პირობებში ხსნარები იღებენ სხვადასხვა შეფერვას. საწყისი ხსნარი რჩება უფერული, საცდელი ხსნარი კი იღებს მოყვითალო ფერს. რაც უფრო მეტია ფერმენტის აქტივობა, საცდელი ხსნარი მით უფრო აშკარად იღებება ყვითლად (ვინაიდან თავისუფლდება უფრო მეტი ორთო-ნიტროფენოლი).

მიღებული ხსნარების ოპტიკური სიმკვრივე იზომება ფოტოელექტროკოლორიმეტრზე კიუვეტებში, რომელთა წახნაგის სიგანე უდრის 30 მმ, 420 ნმ ტალღის სიგრძეზე (ლურჯი შუქფილტრი). ორივე ხსნარის კოლორიმეტრიკება წარმოებს წყლის წინააღმდეგ, რის შედეგადაც მიიღება ორი მნიშვნელობა:

D_1 — საწყისი ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე

D_2 — საცდელი ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე

ბ-გალაქტოზიდაზის აქტივობის გამოთვლისათვის საჭიროა

საკალიბრო მრუდის აგება ორთო-ნიტროფენოლის ხსნარზე. 0,014 გ ნიტროფენოლს ხსნიან მცირეოდენ წყალში და გადააქვთ 100 მლ-იან საზომ კოლბაში, უმატებენ 10 მლ 1 M Na_2CO_3 -ის ხსნარს და ავსებენ 100 მლ-მდე. მიღებული ხსნარიდან მზადდება ნიტროფენოლის შემდეგი განზავებები: (1:100), (1:90), (1:80), (1:70), (1:60), (1:50), (1:40), (1:20); მიღებულ ხსნარებში იზომება ოპტიკური სიმკვრივე 420 ნმ ტალღის სიგრძეზე და მიღებული მონაცემების მიხედვით აიგება საკალიბრო მრუდი. ორდინატთა ღერძზე გადაიზომება მიღებული ოპტიკური სიმკვრივეები, ხოლო აბსცისთა ღერძზე ორთო-ნიტროფენოლის შესაბამისი კონცენტრაციები (მიკრომოლებში).

β-გალაქტოზიდაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც აწარმოებს 1 მიკრომოლი ორთო-ნიტროფენოლ-β-D-გალაქტოპირანოზიდის ჰიდროლიზს ერთი წუთის განმავლობაში, როდესაც სარეაქციო არის pH უდრის 6,9, ხოლო ტემპერატურა 30°C.

β-გალაქტოზიდაზის აქტივობის გამოსაანგარიშებლად გამოიყენება შემდეგი ფორმულა:

$$\beta\text{-გ. აქტ.} = \frac{D_2 - D_1}{15 \cdot a \cdot b} \times \text{განზავებაზე (ერთ/1 მლ)}.$$

სადაც 15 არის ფერმენტული რეაქციის დრო წუთებში, D_1 და D_2 ოპტიკური სიმკვრივეები. a-ფერმენტის რაოდენობა გრამებში ან მლ-ში, რომელიც აღებული იქნა საანალიზოდ b-ოპტიკური სიმკვრივე, რომელიც შეესაბამება ფერმენტის ერთეულს და უდრის 0,000028 გ. ეს სიდიდე განსაზღვრულია საკალიბრო მრუდის მიხედვით.

უნდა აღინიშნოს, რომ ყველა ფოტოელექტროკოლორიმეტრისათვის საჭიროა საკალიბრო მრუდის აგება და ამ მრუდის საშუალებით ფერმენტის ერთეულის მოქმედების ექვივალენტური მუდმივას განსაზღვრა.

ინვარტაზა. β-ფრუქტოფურანოზიდაზა

(ფა 3, 2. 1. 26, β-D-ფრუქტოფურანოზიდ—ფრუქტოპიდროლაზა)

ეს ფერმენტი აწარმოებს შემდეგ რეაქციას: β-D-ფრუქტოფურანოზიდი + H_2O = სპირტი + D-ფრუქტოზა. β-ფრუქტოფურანოზიდაზის სუბსტრატს წარმოადგენს საქაროზა. ამ ფერმენტს შეს-

წევს აგრეთვე ფრუქტოტრანსფერაზული რეაქციების კატალიზირების უნარი.

ინვერტაზა საკმაოდ გავრცელებული ფერმენტია. იგი აღმოჩენილია უმაღლესი მცენარეებისა და ცხოველების ლორწოვან გარსში, თაფლში, სადაც ფერმენტი ფუტკრის საყლაპავი ჭირკვლიდან გადადის. ინვერტაზის საწარმოო დანიშნულების ფერმენტული პრეპარატები მიიღება ობის სოკოებიდან *Asp. Oryzae* და *Asp. niger*-იდან და *Fabcspora fragilis*-ის ოჯახის საფუარებიდან. საფუარებიდან გამოყოფილი ინვერტაზა ამჟღავნებს β -ფრუქტოფურანოზიდოზის უფრო სპეციფიკურ თვისებებს, სოკოურ ინვერტაზასთან შედარებით. საფუარის ინვერტაზა მოითხოვს ჩაუნაცვლებელ β -ფრუქტოფურანოზიდის ნაშთს. ეს ფერმენტი არ ამჟღავნებს განსაკუთრებულ სპეციფიკურობას აგლიკონური ნაწილის მიმართ, რომელიც შეიძლება იყოს სპირტი, ქსილოზა, გალაქტოზა. ან სხვადასხვანაირად ჩანაცვლებული გლუკოზა. საფუარის ინვერტაზის pH-ოპტიმუმი შეადგენს 4,0—5,5, ხოლო ტემპერატურული ოპტიმუმი 55°C. უნდა აღინიშნოს, რომ ტექნიკური ფერმენტული პრეპარატების ტემპერატურული ოპტიმუმი უფრო მეტია მაღალხარისხოვნად გასუფთავებულ პრეპარატებთან შედარებით, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ გასუფთავებისას ფერმენტს ცილდება რომელიმე მასტაბილიზირებელი აგენტი. ინვერტაზა სწრაფად ინჰიბირდება მძიმე მეტალების იონებით. ეს პროცესი უკუქცევადია.

სუბსტრატის კონცენტრაციის გავლენის შესწავლისას ფერმენტის აქტივობაზე დადგენილი იქნა, რომ ინვერტაზის მოქმედება მაქსიმალურია საქაროზის 5—8%-იან ხსნარებში. როდესაც სუბსტრატის კონცენტრაცია 70% უდრის ფერმენტის მოქმედების ეფექტურობა მცირდება 25%-მდე. ინვერტაზა ფართო გამოყენებას პოულობს კვების მრეწველობაში. საქაროზის კონცენტრირებული ხსნარების ჰიდროლიზის შედეგად მიიღება უფრო ტკბილი სიროფები. ინვერტაზით დამუშავებული სიროფების დუდილის ტემპერატურა უფრო მაღალია იმიტომ, რომ ინვერსიის დროს იზრდება ოსმოსური წნევა. მიღებული მონოსაქარიდები ხასიათდებიან უკეთესი ხსნადობით და აღარ კრისტალდებიან კონცენტრირებული ხსნარიდან. განსაკუთრებით ეფექტური გამოდგა ინვერტაზას გამოყენება საკონდიტრო მრეწველობაში, სადაც შაქრების კონცენტრაცია 79%-ზე მაღალია და საქაროზა, რომელიც საკმაოდ მყარია, ფორმირებისათვის მოითხოვს ჰიდროლიზს.

ინვერტაზის pH-ოპტიმუმი შეადგენს 4,5—5,5, რაც საკონდიტრო წარმოებისათვის სავესებო მისაღებია. ინვერტაზას იღებენ საფუარის ბიომასის პლაზმოლიზით და შემდგომი პროტეოლიზური ფერმენტების დაწეშეებით. საწარმოო დანიშნულებისათვის განკუთვნილი ინვერტაზა მიიღება 50—60%-იან გლიცერინის ან 70%-იან სორბიტის ხსნარებში.

ინვერტაზის აქტივობის განსაზღვრა

ამ მეთოდს საფუძვლად უდევს სომოჯის მეთოდი, რომელიც დამყარებულია ალდეჰიდებისა და კეტონების ჯგუფების უნარზე, ალდეჰიდონ სპილენძის ქანგი სპილენძის ზეჟანგამდე. ამგვარად მიღებული სიდიდე ექვივალენტურია შაქრის რაოდენობისა ხსნარში და ისაზღვრება კოლორიმეტრულად. ინვერტაზის აქტივობის განსაზღვრისას სუბსტრატად იყენებენ 0,25%-იან საქაროზის ხსნარს, დაბუფერებულს 0,2N ბუფერით, რომლის pH უდრის 5,2.

ს ა ჯ ი რ ო ხ ს ნ ა რ ე ბ ი :

1. 0,2N Na-ფოსფატის ბუფერი (pH 5,2)

ამ ხსნარის დასამზადებლად საჭიროა შემდეგი საწყისი ხსნარები:

ა) 0,2 N $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ -ის ხსნარი. ამისათვის 359,81 გ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ იხსნება 1 ლიტრ გამოხდილ წყალში

ბ) 0,2 N $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ხსნარი
31,2 გ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ იხსნება 1 ლიტრ გამოხდილ წყალში pH 5,2.

0,2 N Na-ის ფოსფატის ბუფერის მიღებისათვის საჭიროა რეაქტივი „ა“-ს 4,9 ნაწილს დაემატოს 95,1 ნაწილი რეაქტივი „ბ“.

2. სუბსტრატის საქაროზის დამზადება

ანალიზისათვის გამოიყენება 0,25 % საქაროზის ხსნარი. ამისათვის საქაროზას ხსნიან 0,2 N Na-ფოსფატის ბუფერში, რომლის pH 5,2.

3. ინვერტაზის ამ მეთოდით განსაზღვრისათვის საჭიროა რეაქტივების დამზადება სომოჯისა და ნელსონის მიხედვით (მითითებულია ქვემოთ).

ა ნ ა ლ ი ზ ი ს მ ს ვ ლ ე ლ ო ბ ა :

რეაქციის ჩატარებას პირობები: ტემპერატურა 30°C , pH—5,2, რეაქციის ხანგრძლივობა 15 წუთი (წამოზომით). 2,0 სმ დიამეტრის

და 18 სმ სიმაღლის სინჯარაში შეაქვთ 4,0 მლ სუბსტრატი და ათავსებენ ულტრათერმოსტატში 30°C-ის პირობებში 10 წუთით. სინჯარაში შეაქვთ 1,0 მლ საწყისი ხსნარი და ემატება სინჯარაში წინასწარ ჩასხმულ სომოქის რეაქტივს. 15 წთ-ის შემდეგ სარეაქციო ნარევიდან იღებენ 1,0 მლ საცდელ ხსნარს და ისევე უმატებენ 1,0 მლ სომოქის რეაქტივს. მინის საცობით დაცულ სინჯარებს ათავსებენ მადულარი წყლის აბაზანაში 15 წუთით. დუღილის შედეგად და საქაროზის ჰიდროლიზის პროდუქტების — გლუკოზის და ფრუქტოზის თანაობისას წარმოიქმნება წითელი ნალექი. უნდა აღინიშნოს, რომ საქაროზის ხსნარი ნალექს არ იძლევა. დუღილის დამთავრების შემდეგ სინჯარებს აცივებენ ცივი წყლით აბაზანაში და წარმოქმნილი ნალექის გასახსნელად უმატებენ 1 მლ ნელსონის რეაქტივს. სინჯარებს, ავსებენ 10 მლ-მდე წყლით. ურევენ და წარმოქმნილი ლურჯი ფერის ინტენსივობას ზომავენ 490 ნმ ტალღის სიგრძეზე (წმვანე შექვილტრი), კიუვეტაში, რომლის წახნაგის სიგანე უდრის 5 მმ. კოლორიმეტრზე გაზომვას აწარმოებენ კონტროლთან შედარებით. საკონტროლო ნიმუში შემდეგნაირად მზადდება: 1 მლ H_2O + 1 მლ სომოქის რეაქტივი. ამ ხსნარს აღუღებენ 15 წთ-ის განმავლობაში, უმატებენ 1 მლ ნელსონის რეაქტივს და ავსებენ წყლით 10 მლ-მდე.

კოლორიმეტრიკების შედეგად იღებენ ოპტიკური სიმკვრივების ორ მნიშვნელობას:

1. D_1 — საწყისი ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე

2. D_2 — საცდელი ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე.

D_1 და D_2 სიდიდეების მიხედვით საზღვრავენ ფერმენტული რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი შაქრების რაოდენობას K_1 და K_2 საკალიბრო მრუდის საშუალებით. რომელსაც წინასწარ აგებენ.

ინვერტაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც აწარმოებს 1 მიკრომოლ საქაროზის ჰიდროლიზს შემდეგ პირობებში: $t=30^\circ C$, $pH\ 5,6$ 1 წთ-ის განმავლობაში.

$$\text{ი. აქტ.} = \frac{K_1 - K_2}{0,072 \cdot 15} = \frac{K_1 - K_2}{1,08 \cdot \text{განზავება}} = \text{აქტ. ერთ/მლ}$$

15 რეაქციის მსვლელობის დროა წთ-ში. 0,072—ინვერტაზის აქტივობის ერთეულის მოქმედების შედეგად წარმოქმნილი შაქრების რაოდენობის ექვივალენტი.

სომოჯისა და ნელსონის რეაქტივების
დამზადება:

სომოჯის რეაქტივის დამზადება

1 ლ სომოჯის ხსნარი შეიცავს:

ა) 4გ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;

ბ) 24გ. უწყლო Na_2CO_3 ;

გ) 16გ NaHCO_3

დ) 12გ სეგნეტის მარილი ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

ე) 18გ უწყლო Na_2SO_4

1) ბ და დ რეაქტივებს მითითებული რაოდენობით გახსნიან 250 მლ წყალში, შემდეგ უმატებენ (ინტენსიური მორევის პირობებში) რეაქტივ (ა)-ს 10%-იან ხსნარის 40 მლ-ს, შემდეგ კი ნატრიუმის ბიკარბონატის რეაქტივს (გ).

2) ნატრიუმის სულფატს ხსნიან 500 მლ ცხელ გამოხდილ წყალში და მიღებულ ხსნარს ადუღებენ 40 წუთის განმავლობაში CO_2 -ის მოსაშორებლად.

ხსნარის გაცივების შემდეგ (ოთახის ტემპერატურის პირობებში) I და II ხსნარს აურევენ ერთად და ავსებენ 1 ლ-მდე. 3—4 ღლის განმავლობაში ილექება ცოთაოდენი სპილენძის ჟანგი მექანიკურ მინარევებთან ერთად. ნალექი შორდება ხსნარს ფილტრაციით. ხსნარი ინახება სინათლისაგან დაცულ პირობებში.

ნელსონის რეაქტივის დამზადება:

25 გ ამონიუმის მოლიბდატს ხსნიან 450 მლ გამოხდილ წყალში, უმატებენ 21 მლ კონცენტრირებულ H_2SO_4 და 3,0 გ ღარიშხანმეაფა ნატრიუმს, რომელიც გახსნილია 25 მლ წყალში. მიღებულ ხსნარს ავსებენ 25 მლ-მდე და აყოვნებენ 24 სთ-ის განმავლობაში 37°C -ის პირობებში.

პრობიოლოგიური ფერმენტები

თანამედროვე კლასიფიკაციის მიხედვით პროტეოლიზური ფერმენტები მიეკუთვნებიან ერთ ჯგუფში გაერთიანებული ჰიდროლაზების კლასს და წარმოადგენენ ყველაზე მრავალრიცხოვანი ფერმენტების ჯგუფს, რომლებსაც სხვაანირად პეპტიდჰიდროლაზებსაც უწოდებენ.

პროტეოლიზური ფერმენტები ყველა ცოცხალ ორგანიზმში (ცხოველური, მცენარეული, მიკრობული) მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ. მათთვის დამახასიათებელი ძირითადი ფუნქციის გარ-

და, რაც მდგომარეობს ცილების შემადგენელ ამინომჟავებამდე დაშლაში, პროტეოლიზურ ფერმენტებს ახასიათებთ ზოგიერთი სხვა, უფრო ნაკლებად სპეციფიკური თვისებები. ასე მაგალითად, მათ შესწევთ უნარი მოახდინონ ამილური და რთული ეთერული ბმების ჰიდროლიზი.

როგორც ცნობილია, პროტეოლიზური ფერმენტები აწარმოებენ სხვადასხვა ამინომჟავებისაგან შემდგარ პეპტიდური ბმის ჰიდროლიზს. სწორედ ამ თვისების გამო პროტეოლიზური ფერმენტები გადამწყვეტ როლს თამაშობენ ცილების პირველადი სტრუქტურის შესწავლაში.

პროტეოლიზური ფერმენტების ცალკეულმა წარმომადგენლებმა დიდი გამოყენება პოვეს სახალხო მეურნეობისა და მედიცინის სხვადასხვა დარგებში. კარგადაა ცნობილი პროტეოლიზური ფერმენტების როლი ყველის წარმოებაში. ხორცის დამზადების ტექნოლოგია ითვალისწინებს ხორცში არსებული ცილების ჰიდროლიზს პროტეოლიზური ფერმენტებით, რაც საგრძნობლად აუმჯობესებს ხორცის ხარისხს და ადვილად მოსანელებელს ხდის. განსაკუთრებით დიდი მნიშვნელობა აქვს პროტეოლიზურ ფერმენტებს მსუბუქ მრეწველობაში, კერძოდ, ტყავის დარბილებასა და ტყავიდან ბეწვის მოშორებაში.

პროტეოლიზური ფერმენტების გამოყენების ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან დარგს მედიცინა წარმოადგენს. სიღამწვრის დროს ეფექტურად გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის პროტეოლიზური ფერმენტები. გარდა ამისა ამ კლასის წარმომადგენელ ფერმენტებს იყენებენ ქირურგიულ პრაქტიკაში, სასუნთქი მილების დაავადებათა მკურნალობაში, სტომატოლოგიასა და მედიცინის სხვა დარგებში.

პროტეოლიზური ფერმენტების თანამედროვე კლასიფიკაციას საფუძვლად უდევს სუბსტრატული სპეციფიკურობის პრინციპი. აქედან გამომდინარე ეს ფერმენტები დაყოფილი არიან ოთხ ჯგუფად:

3. 4. 1 — ამინოცილებპტიდ-ჰიდროლაზები (ამინოპეპტიდაზები)

3. 4. 2. — პეპტიდილ-ამინომჟავური ჰიდროლაზები (კარბოქსიპეპტიდაზები)

3. 4. 3 — დიპეპტიდ-ჰიდროლაზები (დიპეპტიდაზები)

3. 4. 4. — პეპტიდილ-პეპტიდჰიდროლაზები (პროტეინაზები).

პირველ და მეორე ჯგუფს შეადგენენ ფერმენტები, რომლებიც აწარმოებენ N და C ბოლო ბმების ჰიდროლიზს ცილებში და პეპ-

ტილებში. მესამე ჯგუფში წარმოდგენილია ფერმენტები, რომლებიც აწარმოებენ დიპეპტიდების ჰიდროლიზს. მეოთხე ჯგუფის ფერმენტები — პროტეინაზები აწარმოებენ ცილების შიდა პეპტიდური ბმების ჰიდროლიზს.

ელასტაზა (პანკრეატოკამპილაზა, შპ 3. 4. 4. 7)

ელასტაზა აწარმოებს პეპტიდების ჰიდროლიზს, განსაკუთრებით ინტენსიურად ეს ფერმენტი შლის იმ პეპტიდურ ბმებს, რომელთა წარმოქმნაშიც ნეიტრალური ამინომჟავები მონაწილეობენ.

ბუნებაში ფართოდ გავრცელებულია მიკრობული წარმოშობის ელასტაზები. ასე მაგალითად: ცნობილია ბაქტერიული და აქტინომიცეტების ელასტაზა.

განსაკუთრებით კარგად არის შესწავლილი ბაქტერიული წარმოშობის ელასტაზა, რომელსაც წარმოშობს კულტურა *Ps. aeruginosa*. ამ ფერმენტის მოლეკულური მასა უდრის 39. 500. ფერმენტის ამინომჟავური შედგენილობის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ მის ამინომჟავურ შედგენილობაში დიდი რაოდენობით შედიან გოგირდშემცველი ამინომჟავები: მეთიონინი, ცისტეინი და ცისტინი.

ელასტინის გარდა, ელასტაზას შესწევს უნარი მოახდინოს სხვა ცილების ჰიდროლიზიც. უკანასკნელ ხანებში დამტკიცებულ იქნა, რომ ელასტაზა ხასიათდება ელასტაზური და პროტეოლიზური აქტივობით. ამ ფერმენტის მოქმედების pH-ოპტიმუმი უდრის 6.0-ს, ელასტაზის მიმართ აშკარად გამოხატული ინჰიბიტორული თვისებებით ხასიათდება ითილენდიამინტეტრააცეტატი და 1,10-ფენანტროლინი. დიიზოპროპილფტორფოსფატი და SH-ჯგუფების ისეთი სპეციფიკური რეაგენტი, როგორიცაა პ-ქლორმერკურიბენზოატი არ იწვევენ ელასტაზის ინჰიბირებას. მოქმედების სპეციფიკურობით ელასტაზა წააგავს ბაქტერიული წარმოშობის პროტეინაზებს.

ელასტაზის აქტივობის განსაზღვრა

ელასტაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომლის მოქმედების დროს ელასტინზე ერთი წუთის განმავლობაში, წარმოიქმნება ხსნადი პეპტიდები, რომლებიც შეიცავენ აზოტის ერთ მიკროექვივალენტს.

ელასტაზის აქტივობა ისაზღვრება შეფერვის ინტენსივობით,

რომელსაც იძლევა ბიურეტის რეაქტივთან ის ხსნადი პეპტიდო, რომელიც წარმოიქმნება ფერმენტის მოქმედებისას ელასტინის პრეპარატზე.

ანალიზის მსვლელობა:

10 მგ ელასტინს ემატება 4 მლ 0.025 M ბორატის ბუფერი pH 9,0 და 1 მლ ფერმენტული ხსნარი (ფერმენტის რაოდენობა C₆—0,7 პროტეოლიზური აქტივობის რაოდენობის ექვივალენტური უნდა იყოს). მიღებულ ხსნარს ფრთხილად ურევვენ და ათავსებენ ულტრაბათოსტატში 37°C-ის პირობებში. 30 წუთის შემდეგ ხსნარს ფილტრავენ და 2,5 მლ ფილტრატში საზღვრავენ ცილას ბიურეტის მეთოდით. (ემატება ბიურეტის რეაქტივის თანაბარი რაოდენობა). 20—25 წუთის შემდეგ მიღებული ხსნარის ფერის ინტენსივობას საზღვრავენ ფოტოელექტროკოლორიმეტრზე 536 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

1. კონტროლი სუბსტრატზე — ელასტინზე. 10 მგ ელასტინს უმატებენ 5 მლ ბუფერს ფერმენტის გარეშე. ფილტრავენ და საზღვრავენ შეფერვის ინტენსივობას.

2. კონტროლი რეაქტივებზე — 0,5 მლ ფერმენტულ ხსნარს უმატებენ 2.0 მლ ბუფერს და 2,5 მლ ბიურეტის რეაქტივს.

ხარის შრატის ალბუმინის ხსნარით მიღებულ საკალაბრო მრუდის საშუალებით ისაზღვრება აზოტის რაოდენობა. მიღებულ სიდიდეში შეაქვთ შესწორებები ელასტინსა და ფერმენტში ხსნადი აზოტის შემცველობიდან გამომდინარე და ისე საზღვრავენ ელასტაზის აქტივობას.

ელასტაზის აქტივობის განსაზღვრისათვის გამოიყენება შემდეგი შეფარდება:

$$\text{ელ. აქტ.} = \frac{\text{მგ. ცილა/მლ. } 5 \cdot 1000 \text{ განზავება}}{14 \cdot 6,25 \cdot 30 \cdot \text{ფერმენტის რაოდენობაზე } 5 \text{ მლ ხსნარში}}$$

ტრიპსინი (ფპ 3. 4. 4. 4)

ტრიპსინი აწარმოებს პეპტიდების, ამიდებისა და რთული ეთერების ჰიდროლიზს, იმ ბმების მიხედვით, სადაც მონაწილეობას ღებულობენ L-არგინინისა და L-ლიზინის კარბოქსილის ჯგუფები.

ტრიპსინი ცხოველური წარმოშობის ფერმენტია. ის გამომუშავდება ცხოველებისა და ადამიანის კუჭქვეშა ჯირკვალში. თავდაპირველად ტრიპსინი იმყოფება არააქტიურ ზიმოგენურ ფორმაში,

რომელსაც ტრიპსინოგენი ეწოდება. ზიმოგენური ფორმიდან ტრიპსინის აქტიურ ფორმად გარდაქმნა მიმდინარეობს ორი მექანიზმით. პირველ შემთხვევაში, არსებული ტრიპსინი თითონ აშორებს ტრიპსინის ზიმოგენურ ფორმას არააქტიურ პოლიპეპტიდურ ნაწილს, რის შედეგადაც მიიღება აქტიური ტრიპსინი. ტრიპსინის ბუნებრივ აქტივატორს წარმოადგენს ფერმენტი ენტეროკინაზა (ენტეროპეპტიდაზა ფკ. 3. 4. 4. 8).

ტრიპსინის აქტივაციის პროცესი პირობადებულია ზიმოგენური ფორმიდან გარკვეული სიგრძის ოლიგოპეპტიდური ჯაჭვის ჩამოშორებით. მაგალითად, ხარის კუჭქვეშა ჯირკვლიდან გამოყოფილ ტრიპსინოგენს გააქტიურების დროს N-ბოლოდან შორდება პექსაპეპტიდი, ღორიდან მიღებულ ტრიპსინის ზიმოგენურ ფორმას ერთი პეპტიდური ბმის ჰიდროლიზით შორდება ოქტაპეპტიდი, მაშინ როდესაც ცხვირიდან გამოყოფილ ამ ფერმენტის ზიმოგენურ ფორმას შორდება ორი პეპტიდი — ჰექსა-და ოქტაპეპტიდი.

უნდა აღინიშნოს, რომ ყველა წარმოშობის ტრიპსინის ზიმოგენური ფორმიდან მოშორებული არააქტიური პეპტიდის შემადგენლობაში მონაწილეობას ღებულობს ასპარაგინის მეჟვას ოთხი ნაშთი, რომლებიც ერთი მეორის თანმიმდევრობით არიან განლაგებული. პირველი მათგანი დაკავშირებულია ლიზინთან. სწორედ ლიზინის მიერ წარმოქმნილი პეპტიდური ბმის ჰიდროლიზი მიმდინარეობს ტრიპსინოგენის აქტივაციის დროს. ეს ფერმენტი განსაკუთრებულ როლს ასრულებს სხვა პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივაციის პროცესში. ტრიპსინის საშუალებით ზიმოგენური ფორმებიდან მიიღება ქიმოტრიპსინი A და B, კარბოქსიპეპტიდაზა A და B და ფოსფოლიპაზა.

ტრიპსინის მოლეკულური მასა უდრის 24000, ხოლო მოქმედების pH-ოპტიუმში სუსტ ტუტე არეშია, თუმცა ტრიპსინი კარგად იტანს მეჟვე არესაც, როცა pH 10-ის ტოლია. რაც შეეხება ფერმენტის სუბსტრატულ სპეციფიკურობას, აღმოჩნდა, რომ ტრიპსინი მაქსიმალური სიჩქარით აწარმოებს იმ პეპტიდური, ამიდური და ეთერული ბმების ჰიდროლიზს, რომლის წარმოქმნაში მონაწილეობენ ფუძე ამინომჟავების — არგინინისა და ლიზინის კარბოქსილის ჯგუფები.

უკანასკნელ ხანებში გაირკვა, რომ ტრიპსინს უნარი შესწევს მოახდინოს იმ ბმების ჰიდროლიზიც, რომელთა წარმოქმნაში მონაწილეობას იღებენ სხვა ფუძე ამინომჟავები: ორნიტინი, ჰომო-არგინინი და ε-ამინოკაპრონის მეჟვა. პისტიდინის მიერ წარმოქმნილ ბმებზე ტრიპსინი არ მოქმედებს.

ტრიპსინის ძირითადი ფიზიოლოგიური ფუნქცია დაკავშირებულია საკვების მონელების პროცესთან. თორმეტგოჯა ნაწლავის წვეწში სხვა პროტეოლიზურ ფერმენტებთან ერთად (ქიმოტრიპსინი, კარბოქსიპეპტიდაზა). ტრიპსინი აქტიურ მონაწილეობას ღებულობს საკვებში არსებული ცილოვანი ნაერთების ჰიდროლიზში შემადგენელ ამინომჟავებამდე. თორმეტგოჯა ნაწლავის წვეწის pH უდრის 7,3—8,4.

ტრიპსინის აქტივობის განსაზღვრა

ანალიზის მსვლელობა.

(ტრიპსინის სუბსტრატად გამოიყენება N ბენზოილ—L არგინინის ეთილის ეთერი — ბ ა ე ე).

8,6 მგ ბ ა ე ე იხსნება 100 მლ 0,1 M ტრის — HCl-ის ბუფერში, რომლის pH ტოლია 8,0. შემდეგ 25°C-ის პირობებში თერმოსტატირებულ კიუვეტაში შეაქვთ 0,2 მლ ფერმენტული ხსნარი (0,4 მგ ფერმენტი იხსნება 50 მლ 0,1M ტრის-ბუფერში, რომლის pH უდრის 8,0) და 3 მლ ბ ა ე ე ხსნარი. შემდეგ 7 წუთის განმავლობაში ზომავენ ოპტიკური სიმკვრივის ზრდას სპექტროფოტომეტრზე 253 ნმ ტალღის სიგრძეზე. ფერმენტის აქტივობის ერთეულად მიღებულია მისი ისეთი რაოდენობა, რომლის დროს სტანდარტულ პირობებში ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე იზრდება 1 წუთში 0,001 სპექტროფოტომეტრის დანაყოფზე.

მაგალითი:

დრო (წუთებში)	სპექტროფოტომეტრის მაჩვენებლები 253 ნმ-ზე
0	0,280
1	0,307
2	0,330
3	0,377
4	0,401
5	0,425
6	0,450

$$\text{ტ. აქტ.} = \frac{(0,450 - 0,330) \cdot 50 \text{ მლ} \cdot 5 \cdot 1000}{5 \text{ წთ. } 4 \text{ მგ ფერმენტზე}} \cdot 1500 \text{ ერთ/მგ ფერმენტი}$$

ლეიცილამინოჰაპტიდაზა

(შპ 3. 4. 1. 1)

ეს ფერმენტი აწარმოებს ბევრი პეპტიდების ჰიდროლიზს N-ბოლო ნაშთის ჩამოშორების გზით.

$L\text{-ლეიცინპეპტიდი} + H_2O = L\text{-ლეიცინი} + \text{პეპტიდი.}$

ლეიცინამინოპეპტიდაზა ფართოდ არის გავრცელებული ბუნებაში. ეს ფერმენტი აღმოჩენილია, როგორც ცხოველურ ასევე მცენარეებსა და უმდაბლეს ორგანიზმებში. ფერმენტის მიღების საუკეთესო წყაროს წარმოადგენს ღორის ღვიძლი. ლეიცინამინოპეპტიდაზას მოლეკულური მასა უდრის 300000, ხოლო მოქმედების pH -ოპტიუმში 8,0-დან 9,0-მდე. ფერმენტის მოქმედება აქტიურდება Mn^{2+} და Mg^{2+} თანაობისას. მავნიური. ფერმენტის გააქტივების გარდა იწვევს მის თერმოსტაბილობის გაზრდას. ლეიცინამინოპეპტიდაზა მეტალოფერმენტია, იგი შეიცავს თუთიის 4—6 გ ატომს 300 გ ფერმენტზე. მეტალის მოშორება მოლეკულიდან დაკავშირებულია ფერმენტის აქტივობის მთლიან დაკარგვასთან.

ლეიცინამინოპეპტიდაზა განსხვავებით სხვა პროტეოლიზური ფერმენტებისაგან ხასიათდება არაჩვეულებრივად ფართო სუბსტრატული სპეციფიკურობით. ფერმენტი აწარმოებს სხვადასხვა ამინომჟავებისაგან შემდგარი პეპტიდური ბმების ჰიდროლიზს მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როცა N -ბოლო მეყავს ამინოჯგუფი α -მდგომარეობაშია. გარდა ამისა, ფერმენტი ხასიათდება სტერეოსპეციფიკურობით, რაც გამოიხატება მხოლოდ L -რიგის ამინომჟავებიდან წარმოქმნილ პეპტიდებზე მოქმედებაში.

ვინაიდან ლეიცინამინოპეპტიდაზა მეტალოფერმენტია, მისი აქტივობა მცირდება იმ ნაერთების დამატებით, რომლებსაც გააჩნიათ უნარი წარმოქმნან კომპლექსები მეტალებთან, ასეთი ნაერთებია 1,10—ფენანტროლინი და კუპფერონი. თუ ამ ნაერთებით ნაწილობრივ ან მთლიანად ინჰიბირებულ ფერმენტს დაემატება ქარბი რაოდენობით თუთიის იონები ლეიცინამინოპეპტიდაზას აქტივობა მთლიანად აღდგება. ვინაიდან ლეიცინამინოპეპტიდაზას გააჩნია უნარი აწარმოოს მთელი რიგი პეპტიდების ჰიდროლიზი, ეს უკანასკნელი ფართოდ გამოიყენება ცილის ქიმიკაში, პირველადი სტრუქტურის შესწავლის დროს.

ლეიცინამინოპეპტიდაზას აქტივობის განსაზღვრა

ლეიცინამინოპეპტიდაზის აქტივობა ისაზღვრება სუბსტრატის L -ლეიცილ- β -ნაფტილამიდის (ლნა) დაშლის უნარით.

ლეიცინამინოპეპტიდაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც აწარმოებს 1 მიკრომოლი L -ლეიცილ- β -ნაფტილამიდის ჰიდროლიზს 1 წუთის განმავლობაში.

ანალიზის მსვლელობა:

1 მლ სუბსტრატის ხსნარს, რომელიც შეიცავს 0,8 მგ ლნა-ს ემატება 1 მლ ფერმენტის ხსნარი (2 მგ ფერმენტი 1 მლ-ში) და 2.0 მლ 0,05 M ბორატის ბუფერი pH 8,0, რომელიც შეიცავს 0,002 M კალციუმის აცეტატს. ეს ნარევი 1 საათის განმავლობაში ინკუბირდება 37°C-ის პირობებში, შემდეგ ემატება 1 მლ დიაზოტირებული პ-ანიზიდინი, ხოლო 5 წუთის შემდეგ 1 მლ 80%-იანი სამქლორძმარმეავა. მიღებული აზოსაღებავი ექსტრაგირდება 10 მლ იზოამილის სპირტით, შეფერვის ინტენსივობა კი იზომება 536 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

ფერმენტის აქტივობა გამოითვლება შემდეგი შეფარდებით:

ლ. აქტ.=

$$= \frac{4 \text{ მლ საცდელი ხსნარი (სუბსტრატი მგ-ში განსაზღვრული საკალიბრო მრუდზე)}}{60 \text{ წთ. მგ ფერმენტზე ერთ მლ-ში}} = \text{ფერმენტის აქტივობის ერთ/მლ.}$$

იმისათვის, რომ ამგვარი განსაზღვრით მიღებული მონაცემები მართებული იყოს, საჭიროა რამდენიმე საკონტროლო მონაცემი:

1. კონტროლი სუბსტრატზე;
- 2 მლ ბუფერს (0,05 M ბორატის ბუფერს, რომლის pH 8,0 და შეიცავს 0,002 M კალციუმის აცეტატს) ემატება 1 მლ ლ ნ ა.
2. კონტროლი ფერმენტულ ხსნარზე;
- 3 მლ ბუფერს ემატება 1 მლ საანალიზო ფერმენტული ხსნარი.

ორივე შემთხვევაში თითოეულ სინჯარას ემატება 1 მლ დიაზოტირებული პ-ანიზიდინი, 5 წუთის შემდეგ 1 მლ 80%-იანი სამქლორძმარმეავა. ხსნარი ექსტრაგირდება 10 მლ იზოამილის სპირტით და შეფერვის ინტენსივობა ისაზღვრება 536 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

სუბსტრატის დამზადება: სუბსტრატი ლნა იხსნება მცირეოდენ ეთანოლში და შემდეგ ემატება ბორატის ბუფერი.

დიაზოტირებული პ-ანიზიდინის ხსნარის დამზადება:

270 მგ გამოხდილი პ-ანიზიდინი იხსნება 14 მლ 1N HCl-ში, შემდეგ ამ ხსნარს აციევენ —10°C და უმატებენ 600 მგ ნატრიუმის ნიტრატს. 5 წუთის შემდეგ ნარევს უმატებენ სულფამინის მკავეს 2,0 გ რაოდენობით. ნატრიუმის ბიკარბონატის ფრთხილი მიმატე-

ბით ხსნარის pH დაჰყავთ 7,0—8,0, რის შემდეგაც ავსებენ გამონ-
დილი წყლით 100 მლ-მდე.

ხსნარი ინახება არა უმეტეს ერთი დღისა.

ლეიცინამინოპეტიდაზური აქტივობისათვის საჭირო საკალიბრო მრუდის აგება:

ნაფტილამინის სტანდარტული ხსნარის დასამზადებლად 21.4
მგ ნაფტილამინი იხსნება 100 მლ მეთანოლში. ამ ხსნარიდან მზად-
დება ხსნარები 1,4—21,4-მდე მკმ ნაფტილამინი (მლ-ში სხვადასხვა
კონცენტრაციებით). ამ ხსნარების მოცულობა მიჰყავთ 4,0 მლ-მდე
ვერონალის ბუფერით, რომლის pH უდრის 7,8. შემდეგ უმატებენ
1,0 მლ დიაზოტირებულ პ-ანიზიდინს, 5 წუთის შემდეგ კი 1 მლ
50%-იან სამქლორმმარმეავას, საღებავის ექსტრაქციას ახდენენ 10
მლ იზომილის სპირტით, ხსნარების მიღებულ ინტენსივობებს ზო-
მავენ 536 ნმ ტალღის სიგრძეზე. ამგვარად მიღებული მონაცემებას
საშუალებით აგებენ საკალიბრო მრუდს.

კარბოქსიპეტიდაზა

კარბოქსიპეტიდაზები (3. 4. 2.) წარმოადგენენ პროტეოლიზუ-
რა ფერმენტების იმ ჯგუფს, რომლებსაც უნარი შესწევთ ცილებსა
და პეპტიდებში მოახდინონ C-ბოლო ამინომჟავის ჰიდროლიზი.
ცხოველების კუჭსქვეშა ჯირკვლის წვენში გვხვდება ორი ტიპის
კარბოქსიპეტიდაზა: კარბოქსიპეტიდაზა A (ფკ 3. 4. 2. 1) და
კარბოქსიპეტიდაზა B (ფკ 3. 4. 2. 2). ეს ფერმენტები განსხვავდე-
ბიან მათთვის სპეციფიკური რეაქციის კატალიზირების სიჩქარის
უნარით.

კარბოქსიპეტიდაზა A აწარმოებს შემდეგი რეაქციის კატა-
ლიზს:

პეპტიდილ-L—ამინომჟავა + H₂O = პეპტიდი + L-ამინომჟავა

კარბოქსიპეტიდაზა A მოქმედებს ასევე სხვა პეპტიდებზეც,
რომლებსაც C-ბოლო მდგომარეობაში გააჩნიათ დიამინომჟავა, ან
პროლინი.

კარბოქსიპეტიდაზა B (პროტამინაზა) ხასიათდება შემდეგი
ტიპის რეაქციების ჩატარების უნარით:

პეპტიდილ-L-ლიზინი + H₂O = პეპტიდი + L-ლიზინი

ეს ფერმენტი მოქმედებს იმ პეპტიდებზეც, რომლებსაც ბოლო
მდგომარეობაში გააჩნიათ L-არგინინი ლიზინი და ორნიტინი. ორივე
ფერმენტმა მაღალი სუბსტრატული სპეციფიკურობის გამო ფართო

გამოყენება პოვეს ცილის ქიმიში, ამინომჟავების C-ბოლო თანმიმდევრობის შესწავლაში. ზემოთ აღწერილი A და B კარბოქსიპეპტიდაზების გარდა შესწავლილია საფუარიდან გამოყოფილი კარბოქსიპეპტიდაზა. ეს ფერმენტი ანხორციელებს შემდეგ რეაქციას:

პეპტიდილ-გლიცინი + H_2O = პეპტიდი + გლიცინი

A და B კარბოქსიპეპტიდაზას მიღების კლასიკურ წყაროს წარმოადგენს კუჭქვეშა ჯირკვალი.

კარგად არის შესწავლილი კარბოქსიპეპტიდაზა A-ს ზიმოგენური ფორმა-პროკარბოქსიპეპტიდაზა, რომლის მოლეკულური მასა უდრის 87000 და შედგება სამი სუბერთეულისაგან.

კარბოქსიპეპტიდაზა A-მეტალოფერმენტია, რომელიც შეიცავს თუთიის ატომს. ეს უკანასკნელი საკმაოდ მჭიდროდ არის დაკავშირებული ფერმენტის მოლეკულაში არსებულ ჰისტიდინთან და გლუტამინის მჟავასთან კოორდინაციული ბმებით.

ძალზე საინტერესო თვისებებს ამჟღავნებს ეს ფერმენტი სხვადასხვა pH-ების პირობებში ეთერულ სუბსტრატებზე მოქმედებას დროს. ასე მაგალითად, ცილებისა და პეპტიდების ჰიდროლიზის pH-ოპტიუმში შეადგენს 7,5—8,5, ეთერების ჰიდროლიზის ინტენსივობა იზრდება pH-ის ინტერვალში 5,5—7,0-მდე, pII-ის შემდგომი გაზრდა 9,0-მდე არ მოქმედებს ჰიდროლიზის სიჩქარეზე, ხოლო pII 10,5 პირობებში აღწევს მაქსიმუმს. სტრუქტურული აღნაგობის, ფერმენტ-სუბსტრატის წარმოქმნის უნარის და მთელი რიგი ფიზიკო-ქიმიური დახასიათებების თვალსაზრისით კარბოქსიპეპტიდაზა A წარმოადგენს ერთ-ერთ ყველაზე კარგად შესწავლილ ფერმენტს.

კარბოქსიპეპტიდაზა B აწარმოებს ცილებსა და პეპტიდებში C ბოლოდან ფუძე ამინომჟავების ჩამოშორებას (არგინინის, ლიზინის, ორნიტინის და ჰომოარგინინის). კარბოქსიპეპტიდაზა A-ს მაგვარად ამ ფერმენტსაც გააჩნია ესთერაზული აქტივობა.

კარბოქსიპეპტიდაზა A-ს pH ოპტიუმში შეადგენს 8,0.

კარბოქსიპეპტიდაზის აქტივობის განსაზღვრა

ამ მეთოდით ისაზღვრება კარბოქსიპეპტიდაზა A-ს და კარბოქსიპეპტიდაზა B-ს ჯამური აქტივობა. ე. ი. ფერმენტის უნარი მოახდინოს C-ბოლოდან ამინომჟავის ჰიდროლიზი.

კარბოქსიპეპტიდაზის აქტივობა ისაზღვრება სუბსტრატის-კარბო-ბენზოქსი-გლიცილ-ლეიცილის ჰიდროლიზის უნარის მიხედვით,

რაც მოწმდება ნინჰიდრინთან შეფერვის ინტენსივობის გაზრდით.

კარბოქსიპეპტიდაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც აწარმოებს 1 წუთში 1 მიკრომოლის კბზ — გლიცინ-ლეიცინის ჰიდროლიზს.

ანალიზის მსვლელობა:

0,5 მლ ფერმენტის ხსნარს უმატებენ 1 მლ 0,4M M კბზ გლიცინ-ლეიცინს, რომელიც გახსნილია 0,05 M ბორატის ბუფერში (pH 8,0) და შეიცავს 0,002 M კალციუმის აცეტატს. ეს ნარევი ინკუბირდება 10 წუთის განმავლობაში 40°C-ის პირობებში, შემდეგ ცივდება ოთახის ტემპერატურამდე და ისაზღვრება ამინური აზოტი როზენის მეთოდით. ფერმენტის აქტივობა ითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$\text{კ. აქტ.} = \frac{1,5 \text{ მლ საანალიზო ხსნარი. (მკმ/მლ) როზენის მიხედვით}}{10 \text{ წთ. მგ ფერმენტზე } 0,5 \text{ მლ-ში}} = \text{ერთ/მლ}$$

ამ მეთოდით კარბოქსიპეპტიდაზური აქტივობის განსაზღვრისას აუცილებელია დაყენებული იქნას შემდეგი კონტროლები.

1. კონტროლი ფერმენტულ ხსნარზე.

0,5 მლ ფერმენტულ ხსნარს ემატება 1 მლ ბორატის ბუფერი (pH 8,0) და ისაზღვრება ამინური აზოტი.

2. კონტროლი სუბსტრატზე

0,5 მლ ბორატის ბუფერს, რომლის pH უდრის 8,0 ემატება 1 მლ სუბსტრატის ხსნარი და ისაზღვრება ამინური აზოტი.

ამინური აზოტის განსაზღვრა როზენის მეთოდით

საჭირო რეაქტივები:

1. 0,01 M NaCN

2. აცეტატის ბუფერი, pH 5,3—5,4

3. 0,000 2 M აცეტატ-ციანიდი. 20 მლ I ხსნარს ემატება II ხსნარი (980 მლ.)

4. 3 % ნინჰიდრინი მეთილცელოსოლვის ხსნარში.

5. გამხსნელი — იზოპროპილის სპირტი: წყალი 1:1

ანალიზის მსვლელობა:

1 მლ საანალიზო ხსნარს, რომელიც დაახლოებით 0,02—0,4 მიკრომოლ ამინომჟავას შეიცავს, ემატება 0,5 მლ მესამე ხსნარი და 0,5 მლ მეოთხე ხსნარი. შეანჯღრევენ და 15 წუთით ათავსებენ მადულარი წყლის აბაზანაში. ამის შემდეგ უმატებენ 5,0 მლ მეხუთე ხსნარს, რამდენჯერმე შეანჯღრევენ და აცივებენ ოთახის ტემპერატურამდე. მიღებული ხსნარის შეფერვის ინტენსივობას საზღვრავენ ფოტოელექტროკოლორიმეტრზე 536 ნმ ტალღის სიგრძეზე 10 მმ-ის სიგანის კიუვეტებში. თუ შეფერვის ინტენსივობა ძალზე ძლიერია უმატებენ კიდევ 5,0 მლ მეხუთე ხსნარს, იმ მაზნით, რომ ოპტიკური სიმკვრივე დაახლოებით უდრიდეს 0,8-ს.

საკალიბრო მრუდის აგება

იღებენ ხუთ სხვადასხვა ამინომჟავას, მაგალითად, ლიზინს — 3,6 მგ, ტიროზინს — 3,6 მგ, გლუტამინის მჟავას — 2,95 მგ, გლიცინს — 1,5 მგ, ფენილალანინს — 3,0 მგ. აღნიშნულ ამინომჟავეებს ხსნიან 10 მლ წყალში და უმატებენ ოთხ წვეთ 1 N HCl-ს. ამ ხსნარის კონცენტრაცია შეადგენს 0,002 M თითოეული ამინომჟავას მიმართ, ხოლო ყველა ამინომჟავის კონცენტრაცია ერთად უდრის 0,01 M. ხსნარის 10 მლ შეიცავს 10 მიკრომოლ თითოეულ ამინომჟავას. მიღებული ხსნარის სხვადასხვა განზავებებით იგება საკალიბრო მრუდი.

პროტეაზის კრეპარატების აქტივობის განსაზღვრის სტანდარტული მეთოდი

პროტეოლიზური აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელსაც 1 წუთის განმავლობაში 30°C-ის პირობებში გადაყავს სამქლორმჟამჟავით დაულექავ მდგომარეობაში კაზეინის ან ჰემოგლობინის ისეთი რაოდენობა, რომელიც შეიცავს 1 მიკრომოლ ტიროზინს (1 მიკრომოლი ტიროზინი უდრის 0,181 მგ).

სუბსტრატები:

პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრის დროს სუბსტრატებად გამოიყენება კაზეინი (როდესაც ფერმენტული ხსნარის მოქმედების pH 6,0-ზე მეტია), ან ჰემოგლობინის ხსნარი (როდესაც რეაქცია მჟავე არეში მიმდინარეობს).

ჰიდროლიზის პირობები: ფერმენტული ჰიდროლიზი მიმდინა-

რეოზს სუბსტრატის 1%-იანი კონცენტრაციის პირობებში. (ჰიდროლიზის დრო 15 წუთი, ტემპერატურა 30°C).

იმის გამო, რომ პროტეაზები ქსოვილებში წარმოდგენილია სხვადასხვა სახით და შესაძლებელია საქმე გვქონდეს ახალი ტიპის პროტეაზასთან, ამიტომ უცნობი ფერმენტის აქტივობა უნდა იქნას შემოწმებული pH 3,0, 6,0 და 8,0-ის პირობებში.

სუბსტრატის დამზადება:

2%-იანი კაზეინის ხსნარის დამზადება: წონიან 2 გ კაზეინს (აინესტე 8—10%-ია), უმატებენ 100 მლ 1/15 M ფოსფატის ბუფერს (pH 8,0) და აცხელებენ წყლის აბაზანაში კაზეინის სრულ გახსნამდე. მინის წკირის მორევით. გაცივების შემდეგ (ოთახის ტემპერატურამდე) ამოწმებენ pH-ს და თუ იგი არ უდრის 8,1 საჭიროების მიხედვით აჟონასწორებენ 1 N NaOH ან 1 NHCl-ით. ამგვარად დამზადებული კაზეინის ხსნარი ინახება 3 დღე-ღამე.

2%-იანი ჰემოგლობინის ხსნარის დამზადება.

2,0 გ ჰემოგლობინს სრესენ როდინში ცოტაოდენი წყლით, შემდეგ გადააქვთ 100 მლ საზომ კოლაში და 0,3 N HCl ამჟავებენ pH 3,0-მდე, ამის შემდეგ ავსებენ გამოხდილი წყლით 100 მლ-მდე. ჰემოგლობინის ხსნარი არ არის მდგრადი და მოითხოვს ყოველდღიურ დამზადებას.

იმ შემთხვევაში, როდესაც საჭიროა დამზადდეს pH 6,0 და pH 8,0 ჰემოგლობინის ხსნარები შემდეგნაირად იქცევიან: ხსნიან 2,2 გ ჰემოგლობინის შესაბამის 1/15 M ფოსფატის ბუფერში, უმატებენ 36,0 გ შარდოვანას და ოთახის ტემპერატურაზე აყოვნებენ 30—60 წთ-ის განმავლობაში, შემდეგ ხსნარის pH დაყავთ საჭირო მნიშვნელობამდე 1N HCl-ის ან 1 N NaOH-ის დამატებით. ფოლინის რეაქტივი მზადდება როგორც ეს ლოურის მიერ ცილის განსაზღვრის მეთოდშია აღწერილი.

ანალიზის მსვლელობა:

პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრისათვის ორ სინჯარაში (სიმაღლე 18 სმ დიამეტრი 2 სმ), შეაქვთ 2 მლ სუბსტრატი და ათავსებენ ულტრაოტერმოსტატში 30°C, დაახლოებით 10 წთ-ის შემდეგ შეაქვთ 2,0 მლ ფერმენტის ხსნარი. სინჯარას ანჭლრევენ დატოვებენ ზუსტად 15 წთ-ის განმავლობაში. ორივე სინჯარაში უმატებენ 4 მლ 5%-იან სამქლორმმმარმეავას რეაქციის შეწყვეტისათვის. გამოილეკება ცილის ის ნაწილი, რომელმაც ჰიდროლიზი არ განიცადა. ნალექის მოსაშორებლად ფილტრავენ პატარა ძაბრებში ქაღალდის ფილტრების საშუალებით. ფილტრატი აუცილებლად

გამქვირვალე უნდა იყოს. ფილტრატებიდან აიღება 0,5 მლ ახალ სინჯარაში და ემატება 5,0 მლ 0,5 M Na_2CO_3 -ის ხსნარი. ურევენ და არევის პირობებში უმატებენ 1,0 მლ ფოლინის სამუშაო ხსნარს. ხსნარს აყოვნებენ 20 წთ-ს განმავლობაში მაქსიმალური ლურჯი ფერის მიღებისათვის. შეფერვის ინტენსივობა ისაზღვრება ფოტოელექტროკოლორიმეტრზე 670 ნმ ტალღის სიგრძეზე კი-უვეტებში, რომლის სიგანე 10 მმ უდრის.

კონტროლს ამზადებენ შემდეგნაირად: 2,0 მლ ფერმენტულ ხსნარს, ისეთივე განზავებისას, როგორც ცდაში, უმატებენ 4,0 მლ სამქლორდმარმეავას, აყოვნებენ ულტრაბეროსტატში 30°C 15 წთ-ის განმავლობაში, შემდეგ შეაქვთ 2,0 მლ სუბსტრატი. 20-წუთის შემდეგ ხსნარს ფილტრავენ. 1,0 მლ ფილტრატს უმატებენ 5,0 მლ 0,5 M Na_2CO_3 -ს და 1,0 მლ სამუშაო ფოლინის ხსნარს. კონტროლს ახასიათებს სუსტი მოლურჯო ფერი.

აქტივობის განსაზღვრისათვის საჭიროა საკალიბრო მრუდის აგება ტიროზინზე, რომლის ოპტიკური სიმკვრივე გამოიხატება მიკრომოლებში. შემდეგ საკალიბრო მრუდის საშუალებით ანგარიშობენ ტიროზინის ექვივალენტს. ე. ი. იმ ოპტიკურ სიმკვრივეს, რომელსაც 1,0 მლ-ში არსებული 1 მიკრომოლი ტიროზინი იძლევა. ტიროზინის მიღებული ექვივალენტი შეაქვთ ფორმულაში, რომელიც ქვევით არის მოყვანილი. ეს ექვივალენტი ყველა ფოლინის ხსნარისათვის და ფოტოელექტროკოლორიმეტრისათვის იანგარიშება და, როგორც წესი, უდრის 1,5—1,7.

აქტივობის გამოანგარიშება შემდეგი ფორმულით წარმოებს:

$$\text{პროტეაზული აქტ.} = \frac{E \cdot 4}{\text{ტ. ე} \cdot 15 \cdot n} \cdot 1000.$$

სადაც E—ოპტიკური სიმკვრივეა, ტ. ე.—ტიროზინის ექვივალენტი, 4 — სარეაქციო ხსნარის მოცულობა, 15 — სუბსტრატის პიდროლიზის დროს წუთებში, n—ფერმენტული პრეპარატის რაოდენობა, რომელიც აღებულია პროტეოლიზისათვის. 1000—მიღებული ერთეულების გადაყვანა 1 გ ფერმენტულ პრეპარატზე.

პ ა მ ა თ ო ლ ი ზ უ რ ი ფ ი ა მ ე ნ ტ ა ბ ი

ფერმენტები, რომლებიც აწარმოებენ პექტინის ნივთიერებებს პიდროლიზს, პირობით შეიძლება ორ ჯგუფად დაიყოს:

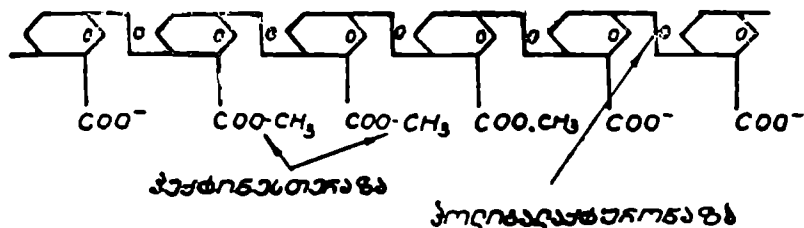
1. პოლიგალაქტურონაზები, რომლებიც აწარმოებენ პექტინში

არსებული გალაქტურონის მჟავებს შორის გლიკოზიდური ბმების პირობიზს.

2. პექტინმეთილესთერაზები, რომლებიც აწარმოებენ ეთერული ბმების პირობიზს გალაქტურონის მჟავას მეთილის ესთერებში (სურ. 60).

პექტოლიზური ფერმენტების ყველაზე აქტიური პროდუცენტებია ობის სოკოები და საფუარები. მაგრამ ხშირად აღნიშნული ორგანიზმები წარმოქმნიან მხოლოდ ერთ ფერმენტს, მაგალითად პოლიგალაქტურონაზას, რომლის სუბსტრატზე მოქმედების საბოლოო პროდუქტები მონო-და დიგალაქტურონის მჟავებია.

მიკრობული წარმოშობის პოლიგალაქტურონაზების გარდა ცნობილია მცენარეული წარმოშობის პოლიგალაქტურონაზებიც. ამ შემთხვევაში განსაკუთრებით დიდი აქტივობით გამოირჩევა კიტრი და პომიდორი. პოლიგალაქტურონაზები აღმოჩენილია აგრეთვე მსხლის ზოგიერთ ჯიშებში, ანანასში, სტაფილოში და სხვა მცენარეულში. პოლიგალაქტურონაზების მოქმედების pH-ოპტიმუმი მერ-



სურ. 60. პექტინმეთილესთერაზის და პოლიგალაქტურონაზის მოქმედების სქემა პექტინზე.

ყეობს 3,5—5,5-მდე, ისევე როგორც პოლიგალაქტურონაზები, პექტინესთერაზებიც ძირითადად მიიღებიან ობის სოკოებიდან და ზოგიერთ სხვა მიკროორგანიზმებიდან. თუ მიკრობული წარმოშობის სხვადასხვა პექტინესთერაზების pH-ოპტიმუმი მჟავე არეში მერყეობს და უდრის 4,5—6,5, მცენარეული წარმოშობის პექტინესთერაზების მოქმედების ოპტიმუმი ახლოა ნეიტრალურთან. ასეთი მონაცემები იყო მიღებული ციტრუსების, ვაშლის, თამბაქოსა და სხვა მცენარეული პექტინესთერაზების შესწავლის დროს. აღმოჩნდა, რომ მცენარეული წარმოშობის პექტინესთერაზები აქტივირდებიან ზოგიერთი მარილებით.

უკანასკნელ ხანებში პექტოლიზურმა ფერმენტებმა ფართო

გამოყენება პოვეს სხვადასხვა სახის წვენების დამზადებისას, კერძოდ ვაშლისა და ყურძნის წვენების დამზადებისა და ღვინის წარმოების დროს. პექტოლიზური ფერმენტების გამოყენება ხილის წვენების წარმოებაში აადვილებს გამჭვირვალე წვენების მიღებას. კანადასა და აშშ-ში გავრცელებულია ვაშლის წვენების ფერმენტული დანეშავება კონცენტრატების მისაღებად. პექტოლიზური ფერმენტებით ვაშლის წვენის დამუშავება აუცილებელია იმ შემთხვევაში, როდესაც კონცენტრატები დიდი ხნით ინახება.

პექტოლიზური ფერმენტები გამოიყენება ყურძნის წვენის გაზოხავლის გაზრდისათვის. განსაკუთრებით ფართო გამოყენება პოვეს პექტოლიზური ბუნების მქონე ფერმენტებმა ხილისა და კენკროვან მცენარეთა სიტროების დამზადების დროს. ხილისა და კენკროვანების წვენებს ალკოჰოლური დუღილის დაწყებამდე ამუშავებენ პექტოლიზური ფერმენტებით, რის შედეგადაც ისინი გამჭვირვალენი ხდებიან, უფრო სწრაფად განიცდიან დუღილს და მიღებული პროდუქტები გაცილებით უკეთესი ხარისხისაა. პექტოლიზური ფერმენტების გამოყენება აუცილებელია როდესაც წვენები, ექსტრაქტები ან კონცენტრატები იხმარება ლიქიორების წარმოებისათვის. თუ მასალაში არსებული პექტინი ფერმენტულად წინასწარ არ დაიშალა, შესაძლებელია პექტინმა მზა მასალაში გამოიწვიოს სიმღვრივე. ქვემოთ მოყვანილია პექტოლიზური ფერმენტების განსაზღვრის რამდენიმე მეთოდი.

1. პექტოლიზური აქტივობის განსაზღვრის ვისკოზიმეტრული მეთოდი:

ამ მეთოდით პექტოლიზური აქტივობის განსაზღვრისათვის საჭიროა ოსტვალდის ვისკოზიმეტრი დიამეტრით (0,8 მმ). ვისკოზიმეტრის „წყლის რაცხვი“ 30°C -ის პირობებში უნდა მერყეობდეს $30-40$ -ის ფარგლებში. სუბსტრატად იხმარება 1%-იანი ვაშლის პექტინის ხსნარი, რომელიც შეიცავს პექტინს 70% და მეთოქსილურ კგუფებს 5%-ის რაოდენობით.

ანალიზის მსვლელობა:

მშრალ ვისკოზიმეტრში, რომელიც მოთავსებულია წყლის აბაზანაში 30°C -ის პირობებში, შეაქვთ 10 მლ პექტინის ხსნარი. დაახლოებით 5 წთ-ის შემდეგ უმატებენ 1-დან 5 მლ-მდე ფერმენტულ ხსნარს, ისეთნაირად, რომ სარეაქციო ნარევის საერთო მოცულობა ყოველთვის უდრიდეს 15 მლ, ე. ი. თუ შეაქვთ 1 მლ ფერმენტული ხსნარი უმატებენ 4 მლ გამოხდილ წყალს და ა. შ. ფერმენტის სარეაქციო ნარევი შეტანისთანავე, ე. ი. პექტოლიზა

პროცესის დაწყებისთანავე ნიშნავენ წამმზომს და აწარმოებენ სარეაქციო ხსნარის არევის. 10 წთ-ის შემდეგ ზომავენ სარეაქციო ხსნარის სიბლანტეს ხსნარის ჩამოდინების სიჩქარის მიხედვით. საკონტროლო ხსნარს ამზადებენ ზუსტად ისევე, როგორც საცდელს, იმ განსხვავებით, რომ ფერმენტული ხსნარის ნაცვლად შეაქვთ გამოსდილი წყალი. საკონტროლო განსაზღვრა ტარდება იმავე ვისკონიმეტრზე. რომელზედაც ტარდება საცდელი, ან სხვა აპარატზე, იმ პირობათ, რომ ეს უქანაჟნელი განსხვავდება გამოყენებულა ვისკონიმეტრისაგან წყლის რიცხვის მაჩვენებლით, არა უშეტეს 0,5 წმ-ისა.

პექტინის ჰაღროლიზის ხარისხს, რომელიც ისაზღვრება სიბლანტის შემცირებით საზღვრავენ შემდეგი ფორმულით:

$$B = \frac{l_k - l}{l_k - l_g} \cdot 100.$$

სადაც B —სიბლანტის შემცირების ხარისხია %-ში, l_k — საკონტროლო ხსნარის გამოდინების დრო წმ-ში, l —საცდელი ხსნარის გამოდინების დრო წამებში, l_g —წყლის გამოდინების დრო წმ-ში.

B -სიბლანტის შემცირების ხარისხი უნდა მერყეობდეს 20—40%-ის ფარგლებში, ე. ი. სარეაქციო ხსნარში შესატანი ფერმენტის კონცენტრაცია ისეთნაირად უნდა შეიარჩეს, რომ მიღებული მონაცემი ამ საზღვრებში თავსდებოდეს.

2. პექტოლიზური აქტივობის განსაზღვრის ინტერფერომეტრული მეთოდი.

ეს მეთოდი გათვალისწინებულია პექტინის გახლეჩის მიხედვით პექტოლიზური ფერმენტების — პექტინესთერაზასა და პოლიგალაქტურონაზას საერთო აქტივობის განსაზღვრისათვის.

პექტოლიზური ფერმენტების აქტივობის ერთეულად მიღებულია. ფერმენტის ის რაოდენობა, რომელიც იწვევს 1 გ პექტინის ჰიდროლიზს 1 საათის განმავლობაში ისეთ პროდუქტებამდე, რომლებიც არ ილექებიან გოგირდმევა თუთიით, როდესაც სარეაქციო ხსნარის $pH=4,0$.

სუბსტრატის დამზადება:

სუბსტრატის დასამზადებლად ხმარობენ ქარხლის პექტინს, რომელიც შეიცავს პექტინს არა ნაკლებ 70%-ისა და გააჩნია მეოქსილირების ხარისხი $\approx 35\%$.

პექტინის წონა აიღება ისეთი ანგარიშით, რომ 200 მლ ხსნარი შეიცავდეს 2,0 გ სუფთა პექტინს, ამ მიზნისათვის პექტინი მინის წყირით გადააქვთ 300 მლ კონუსურ კოლბაში, სადაც წინასწარ შეტანილია 130 მლ წყალი. 10 წუთის განუწყვეტელი არევის შემდეგ ხსნარს ტოვებენ 3 საათით ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ ხსნარში არევიტ შეაქვთ ამონიაკი იმ ანგარიშით, რომ სარეაქციო ხსნარის pH გაუტოლდეს 4,0. მიღებული ხსნარი გადააქვთ საზომ კოლბაში და გამოხდილი წყლიტ ავსებენ 200 მლ-მდე, ხანგრძლივი მორევის შემდეგ ფილტრავენ ორ ფენა დოლბანდში. მიღებული ხსნარი შეიძლება გამოყენებული იქნას 4 დღე-ღამის განმავლობაში.

ა ნ ა ლ ი ზ ი ს მ ს ვ ლ ე ლ ო ბ ა :

2,0 სმ დიამეტრისა და 18,0 სმ სიმაღლის სინჯარაში გადააქვთ 20 მლ სუბსტრატის ხსნარი და ათავსებენ ულტრათერმოსტატში 30°C-ის პირობებში 10 წუთით. ამის შემდეგ უმატებენ 10 მლ საანალიზო ფერმენტულ ხსნარს, ურევენ და კვლავ თერმოსტატში ათავსებენ 1 საათის განმავლობაში. რის შემდეგაც სინჯარები გამოაქვთ თერმოსტატიდან და უმატებენ 2,0 მლ 15%-იან გოგირდ-ჰაჰვა თუთიას ფერმენტის ინაქტივაციისათვის და მაღალმოლეკულური პექტინის პროდუქტების დასაღეჰად. ამის შემდეგ სინჯარებს ხანგრძლივად ურევენ და ფილტრავენ ჰაღალდის ფილტრში სრული გამჰყარვალე ხსნარის მიღებაჰდე. ამგვარად მიღებული ფერმენტის ანალიზი წარმოებს ინტერფერომეტრზე. ერთდროულად წარმოებს საკონტროლო ხსნარების ღამზადება. ამ მიზნით სინჯარებში შეაქვთ 2,0 მლ 15%-იანი $ZnSO_4$. 10 მლ საანალიზო ფერმენტული ხსნარი და 20 მლ სუბსტრატი. სინჯარების შემადგენლობას ხანგრძლივად ურევენ და ფილტრავენ. შემდეგ ინტერფერომეტრზე სინჯავენ ინტერფერენციული ხაზების გადაადგილებას. მეთოდის სიზუსტისათვის ფერმენტული ხსნარები უნდა განზავდეს ისე, რომ ზელსაწყოს ჩვენებები მერყეობდეს 400-დან 1200-მდე.

პექტოლიზური აქტივობას საზღვრავენ შემდეგი ფორმულიტ:

$$\text{პექტოლიზური აქტ.} = \frac{0,6425 \cdot m - 19,62}{n \cdot 1000} = \text{პირ. ერთ/გ}$$

სადაც m —ზელსაწყოს ჩვენებაა, n —ფერმენტული პრეპარატის რაოდენობა, რომელიც შეიცავს საანალიზო ფერმენტული ხსნარის 10 მლ. 0,6425; 19, 62; და 1000 მუდმივი კოეფიციენტებია, რომლე-

ბიც მიიღებიან ექსპერიმენტული მონაცემების მათემატიკური და-
გუშავებით.

3. პექტინესთერაზული აქტივობის განსაზღვრა

პექტინესთერაზული აქტივობა გამოხატავს ფერმენტის უნარს
მოახდინოს პექტინის მოლეკულაში რთული ეთერული ბმების ჰიდ-
როლიზი, მეთილის სპირტისა და კარბოქსილის თავისუფალი ჯგუ-
ფების წარმოქმნით.

პექტინესთერაზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენ-
ტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც აწარმოებს 30°C და შესაბამისა
 pH -ის პირობებში, პექტინის მოლეკულაში 1 მიკროექვივალენტა
რთული ეთერული ბმის ჰიდროლიზს 1 წუთის განმავლობაში.

მეთოდი დამყარებულია პექტინის ხსნარის ჰიდროლიზის დროს
ფერმენტის მიერ თავისუფალი კარბოქსილების ჯგუფების რაო-
დენობრივ განსაზღვრაზე.

ა ნ ა ლ ი ზ ი ს მ ს ე ლ ე ლ ო ბ ა :

50 მლ-იან ქიმიურ ჭიქაში ათავსებენ 20 მლ 1 %-იან პექტინის
ხსნარს, აფარებენ შუშებს და შეაქვთ ულტრათერმოსტატში 30°C -ის
პირობებში. 15 წუთის შემდეგ ორ ჭიქაში უმატებენ 10 მლ საანა-
ლიზო ფერმენტულ ხსნარს, მომდევნო ორში კი 10 მლ გაცხელე-
ბულ ინაქტივირებულ იმავე რაოდენობის ფერმენტულ ხსნარს.
სარეაქციო ნარევის მოცულობა უნდა უდრიდეს 30 მლ. 1 სთ-ის
შემდეგ საანალიზო ჭიქას იღებენ თერმოსტატიდან და სწრაფად
ტიტრავენ პოტენციომეტრით მიკრობიურეტიდან 0,1 N NaOH სა-
შუალებით $\text{pH}=7,5$ -მდე.

პექტინესთერაზულ აქტივობას შემდეგი ფორმულით ანგარიშო-
ბენ:

$$\text{პექტინესთ. აქტ.} = \frac{100 \cdot a \cdot 100}{t \cdot 6 \cdot x}$$

სადაც a არის 0,1 N NaOH რაოდენობა, დახარჯული გატიტ-
ვრაზე. 100 ჰიდროლიზებული რთული ეთერული ბმების მიკროექ-
ვივალენტების რიცხვი, შეესაბამება 1 მლ 0,1 N NaOH-ს.

100—პექტინის ეთერიფიკაციის ხარისხია, რომლის მიხედვი-
თაც ინგარიშება ფერმენტული აქტივობა, t —ჰიდროლიზის დრო
წუთებში, 6 — საანალიზოდ აღებული ფერმენტული პრეპარატის
რაოდენობა, x —სუბსტრატად აღებული პექტინის ეთერიფიკაციის
ხარისხი.

თუ საანალიზო და საკონტროლო ცდების გასატიტრად დახარჯული ტუტის სხვაობა ნაკლებია 0,5 მლ, მაშინ ცდას იმეორებენ ფერმენტის კონცენტრაციის გაზრდით და პირიქით, თუ ჰიდროლიზის % 20-ს აღემატება, აწარმოებენ საანალიზოდ აღებული ფერმენტული ხსნარების უფრო მეტ განზავებას.

პოლიგალაქტურონაზული აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი:

პოლიგალაქტურონაზული აქტივობა გამოიხატება პექტინის ნივთიერების α-1,4 D-გალაქტურონიდაზული ჰიდროლიზით პოლიდა მონოგალაქტურონის მჟავების წარმოშობით.

პოლიგალაქტურონიდაზული აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც იწვევს 30°C-ზე შესაბამისი pII-ის პირობებში და 1 წუთის განმავლობაში 1 მიკროექვივალენტი გლიკოზიდური ზმების ჰიდროლიზს პექტინის მჟავაში.

ანალიზის მსვლელობა:

10 მლ 1%-იანი პექტინის მჟავა შეაქვთ 100 მლ-იან კოლბაში და ათავსებენ 30°C-ის პირობებში 10 წუთით. ამის შემდეგ უმატებენ 1,0—5,0 ფერმენტულ ხსნარს და გამოხდილ წყალს იმ პირობით, რომ სარეაქციო ნარევის ჯამი შეადგენდეს 15,0 მლ. განსაზღვრული დროის (60 წთ) შემდეგ ამ კოლბაში ემატება 1,8 მლ 1 M Na_2CO_3 და 10 მლ 0,1 M იოდის ხსნარი, ამ ნარევის გულმოდგინეთ ურევენ და აყოვნებენ სიბნელეში კიდევ 20 წუთის განმავლობაში. ამის შემდეგ უმატებენ 2,0 მლ 2 M გოგირდის მჟავას და ტიტრებენ იოდის ჭარბ რაოდენობას 0,05 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -ით სახამებლის თანაობისას. გატიტრების შედეგებს სახავენ 0,1 N ხსნარის მლ-ში. ერთდროულად ისაზღვრება საკონტროლო ცდაში ყველა აღებული რეაქტივების ანალოგიური რაოდენობებით, მხოლოდ ფერმენტული ხსნარი შეაქვთ სოდის დამატების შემდეგ, იოდის ხსნარის დამატების წინ.

პოლიგალაქტურონიდაზული აქტივობის განსაზღვრისათვის გამოიყენება შემდეგი ფორმულა, რომელიც გამოთვლილია აღდექადური ჯგუფების ნამატიდან გამომდინარე:

$$\text{პოლიგალ. აქტ.} = \frac{51,3 \cdot a}{t \cdot 6}$$

სადაც 51,3—აღდექიდების ჯგუფების მიკროექვივალენტების ის რაოდენობაა, რომელიც შეესაბამება 1 მლ 0,1 N იოდის ხსნარს

(ან $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -ის). $a=0.1N$ იოდის ხსნარი, რომელიც დაიხარჯება პექტოლიზის დროს წარმოქმნილი ალდეჰიდების ჯგუფების გასატიტრად. (a გამოითვლება საცდელი და საკონტროლო ცდების გატიტრანზე დახარჯულ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -ის ხსნარების სხვაობიდან, მგ). t — პექტოლიზის დრო წუთებში, 6 — პრეპარატის რაოდენობა საანალიზო ცდაში.

$0.1 N$ იოდის ხსნარის დამზადება:

25.0 გ ქიმიურად სუფთა კალუმის იოდს ხსნიან გამოხდილი წყლის მინიმალურ რაოდენობაში და იქვე შეაქვთ 12.7 გ ქიმიურად სუფთა იოდი. იოდის სრული გახსნის შემდეგ წყლის მოცულობას ავსებენ 1 ლიტრამდე.

სუბსტრატის დამზადება:

პექტინის მკვავაში შეაქვთ გამოხდილი წყალი იმ ანგარიშით, რომ საბოლოოდ მიიღონ 1.0% -იანი ხსნარი და ურევენ მინის წკირით. შემდეგ ბიურეტიდან უმატებენ $1 N \text{ NaOH}$ -ს იმ პირობით, რომ $\text{pH } 4.0$ -ის ტოლი გახდეს. შემდეგ ავსებენ წყლით და ფილტრავენ ორ ფენა დოლბანდში. მიღებული ხსნარი ვარგისია ერთი დღე.

ცელულაზა (ფა. 3. 2. 1. 4, β -1,4-გლუკან-გლუკანოჰიდროლაზა)

ეს ფერმენტი აწარმოებს β -1,4 გლუკანური ტიპის ბმების ჰიდროლიზს ცელულოზაში. ქიმიურად ცელულოზა წარმოადგენს გლუკოზისაგან შემდგარ პოლიმერს, სადაც გლუკოზის ნაშთები ერთმანეთთან დაკავშირებული არიან β -1,4 გლუკანური ბმებით. მაგალთად ბამბის ბოჭკოს ცელულოზის პოლიმერიზაციის ხარისხი უდრის დაახლოებით 10000 , მერქნისა კი 1000 არ აღემატება.

ჩვეულებრივ პირობებში ცელულოზა სწრაფად იშლება ნიადაგის აერობული მიკროორგანიზმებით, განსაკუთრებით მერქნის დამშლელი სოკოებით. მიკროორგანიზმებიდან მიღებული ფერმენტები ექსტრაქტების სახით, შედარებით დაბალი სიჩქარით აწარმოებენ ცელულოზას ჰიდროლიზს.

ცელულოზის ფერმენტული დაშლა შეიძლება შემდეგი სქემით იყოს წარმოდგენილი:

C_1 ფერმენტი უხსნადი ხაზუკანი C_x ფერმენტი ხსნადი დაბალ-
ნატიური ცელულოზა — გლუკოზისაგან შემდგარი ჯაჭვები — მოლეკულური პროდუქტები

ცელულოზის ნატიურ ფორმაზე მომქმედ ფერმენტებს ეწოდებათ C_1 ტიპის ფერმენტები, ხოლო ამ ფერმენტების მიერ მოდიფი-

ცირებულ ცელულოზასე (კარბოქსიმეთილცელულოზა, ცელოდექს-ტრინები) მოქმედ ფერმენტებს Cx ტიპის ფერმენტები.

უკანასკნელ ხანს პრაქტიკული დარგების საეციალისტების დიდ ყურადღებას იპყრობს ცელულოზის ფერმენტული დაშლა. ეს იმათ აიხსნება, რომ ცელულოზა წარმოადგენს უმადლესი მცენარეების ძირითად სტრუქტურულ მასალას და ამიტომ ყველაზე გავრცელებული ნივთიერებაა დედამიწაზე.

მერქნის, ქაღალდის, ბამბისა და სელის ბოჭკოს მასალებას მთავარი კომპონენტი — ცელულოზა იაფი და სასარგებლო ბუნებრივი ნაერთია. მცენარეული წარმოშობის ცელულოზა ნიადაგში მოხვედრის შემდეგ განიცდის დაშლას ჭანჭვის საბოლოო პროდუქტებად — წყალად და ნახშირორჟანგად. ეს უკანასკნელი კი წარმოადგენს ნახშირბადოვან ციკლში მონაწილე CO₂-ის ძირითად ნაწილს. ამ პროცესს დიდი ბიოლოგიური მნიშვნელობა აქვს.

მეორეს მხრივ მიკროორგანიზმების უნარი დაშალონ ცელულოზური მასალების ნაგებობანი, დიდ ზიანს აყენებს სახალხო მეურნეობას. სწორედ ის მიკროორგანიზმები. რომელთაც შესწევთ უნარი მოახდინონ მცენარეული და მერქნის ცელულოზის დაშლა, შეიძლება გამოყენებული იქნენ ფერმენტ ცელულოზას მისაღებად. ამ ფერმენტის გამოყენების არაჩვეულებრივად ფართო მასშტაბებზე და ღირდმა ეკონომიურმა ეფექტმა გამოიწვია მსოფლიოს ბევრ ქვეყანაში ცელულაზების მიმართ დიდი ინტერესი.

ცელულაზები აღმოჩენილია უხერხემლო ცხოველთა კუჭის წვეწვში ლოკოინა *Helix pomatia*-ში, ხოლო ნიადაგში ცელულოზას შემცველი ნივთიერებების დაშლა წარმოებს ობის სოკოებით, ანაერობული და აერობული ბაქტერიებით და აქტინომიცეტებით. დღეისათვის ცელულაზების ძირითადი საწარმოო დანაშნულების პროდუცენტებად ითვლებიან ობის სოკოები კერძოდ *Aspergillus*-ის, *Penicillium*-ის, *Trichoderma*-ს გვარის წარმომადგენლები.

ცელულაზა გამოიყენება სახალხო მეურნეობის სხვადასხვა დარგში. ასე მაგალითად ცელულაზის საწეულებით წარმოებს მცენარეული უჯრედის კედლის დაშლა, რის შედეგადაც თავისუფლება ისეთი მნიშვნელოვანი ნივთიერებები. როგორიცაა ცილები, ნახშირწყლები, ტანინები, ზოგიერთი სამკურნალო ნივთიერებები, ხილის წვენები. ავარ-ავარი და სხვა ნაერთები, რომლებიც ლოკალიზებულნი არიან უჯრედში. სოფლის მეურნეობაში ცელულაზას იყენებენ მცენარეული საკვების დასილოსების დროს ადვილად შესათვისებელი ნახშირწყლების ფორმების წარმოსაქმნელად. რის

შედგადაც სწრაფად ვითარდება რძემჟავა დუღილის ბაქტერიები, რომლებიც საშუალებას არ აძლევენ ღვობის ბაქტერიების განვითარებას. განსაკუთრებით პერსპექტიულია ცელულაზის პრეპარატების გამოყენება მეცხოველეობაში ცუდად შესათვისებელი საკვების ეფექტურობის ასამაღლებლად.

ბ-გლუკოზიდაზის (ცელობიოზა) აქტივობის განსაზღვრა

ცელობიოზის აქტივობის ერთეულად მიღებულია ამ ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც 0.08% ცელობიოზის ხსნარში წარმოქმნის 1,0 მგ გლუკოზას 30°C-ის პირობებში 30 წთ-ის განმავლობაში. ცელულაზის აქტივობის განსაზღვრისათვის სუბსტრატებად შეიძლება გამოვიყენოთ ცელულოზა ან ისეთი ბ-გლუკოზაიდები, როგორიცაა სალიცინი და პ-ნიტროფენილ-ბ-D-გლუკოზიდი.

განსაკუთრებით კარგი შედეგები მიიღება მაშინ, როდესაც სუბსტრატებად იხმარება ნიტროფენილ-ბ-D-გლუკოზიდი. ამ გლუკოზიდე ბ-გლუკოზიდაზის მოქმედებისას წარმოიქმნება პ-ნიტროფენილი და ამ ნაერთის შეფერვის ინტენსივობის მიხედვით მსჯელობენ ბ-გლუკოზიდაზის აქტივობაზე.

რეაქციის მსვლელობა:

I. 3 მლ $1,67 \cdot 10^{-3}$ M პ-ნიტროფენილ-ბ-D-გლუკოზიდი, 1,0 მლ 0.1 M ციტრატ-ფოსფატის ბუფერი (pH 5,0) და 1 მლ ფერმენტის ხსნარი 20 წთ-ის განმავლობაში ინკუბირდებიან 28°C-ის პირობებში. შემდეგ უმატებენ 2,0 მლ 7,5%-იან KH_2PO_4 -ს და საზღვრავენ სპექტროფოტომეტრზე 400 ნმ ტალღის სიგრძეზე ოპტიკურ სიწკვრივეს. საკალიბრო მრუდზე ნახულობენ პ-ნიტროფენილ-ბ-D-გლუკოზიდის რაოდენობას.

II. როდესაც სუბსტრატად ცელობიოზის ხსნარს ხმარობენ, სა-რეაქციო ხსნარი შემდეგი შედგენილობისაა: 4,5 მლ ფერმენტული ხსნარი, 5,0 მლ სუბსტრატის ხსნარი და 10,0 მლ 0,5 M ფოსფატის ბუფერი (pH=5,5). რეაქცია მიმდინარეობს 1 საათის განმავლობაში და მიღებული გლუკოზის რაოდენობა ისაზღვრება სომოჯის მეთოდით ინკუბაციამდე და ინკუბაციის შემდეგ.

III. აქტივობის განსაზღვრა ბამბის ბოჭკოს დამშაქვრელი უნარით (C_1 აქტივობა).

C_1 აქტივობის განსაზღვრისათვის გამოიყენება ხოლიველის მეთოდი ზოგიერთი მოდიფიკაციებით.

საინკუბაციო ნარევი შედგება 2,0 მგ ბამბის ბოჭკოსა და 3,0

მლ 0,5 M აცეტატის ბუფერისაგან (pH 5,0). ეს უკანასკნელი შეიცავს 3,0 მგ ფერმენტულ ცილას და 0,05M ნატრიუმის აზიდს (32 მგ — 100 მლ ბუფერულ ხსნარში). სინჯარები საინკუბაციო ნარევით თავსდება თერმოსტატში 40°C-ზე 2-დან 20 დღემდე. საინკუბაციო პერიოდის გავლის შემდეგ მოკლე ბოჭკოები გადააქვთ სხვა სინჯარაში, ხოლო დარჩენილი გრძელი ბოჭკოები ირეცხება ორი მოცულობა გამოხდილი წყლით. ეს ხსნარი ემატება მოკლე ბოჭკოების შემცველ სუსპენზიას. მიღებული ნარევი ფილტრება № 3 მინის ფილტრში და ფილტრატი ემატება საზომ კოლბაში იმ ხსნარს, რომელიც შეიცავს ხსნად შაქრებს. ამის შემდეგ მოკლე ბოჭკოები ირეცხება 0,5 მლ წყლით და ფილტრატი გადაიტანება იმავე კოლბაში. მოკლე და გრძელი ბოჭკოების შემცველ სინჯარებში ემატება 1,8 მლ წყალი და 4,0 მლ $K_2Cr_2O_7$ -ის ხსნარი. ეს ხსნარი შემდეგნაირად მზადდება: 5,0 გ $K_2Cr_2O_7$ იხსნება 20 მლ წყალში, ზავდება ერთ ლიტრამდე 98%-იანი გოგირდის მჟავით. კალიუმ-ბიქრომატის ხსნარი გოგირდმჟავაში დიდხანს ინახება. სინჯარებს ახურავენ საცობებს და 1,5 საათის განმავლობაში ათავსებენ მალულარი წყლის აბაზანაში. დუღილის დამთავრების შემდეგ სინჯარებში ხსნარს ფილტრავენ მინის ფილტრის საშუალებით საზომ კურკელში. სინჯარას და ფილტრს რეცხენ გამოხდილი წყლით, გაფილტრული ხსნარის საერთო რაოდენობა 16 მლ-მდე აიყვანება, შემდეგ ურევენ. მიღებული ხსნარის შეფერვის ინტენსივობას ზომავენ ფოტოელექტროკოლორიმეტრით იისფერ შექვილტრზე (400—450 ნმ) კონტროლის წინააღმდეგ, რომელიც შემდეგნაირად მზადდება: 1,8 მლ წყალს ემატება 4,0 მლ რეაქტივი $K_2Cr_2O_7$, თავსდება 1 საათით წყლის აბაზანაზე, ივსება 15,8 მლ წყლით და შემდეგ ემატება 0,4 მლ $Na_2S_2O_3$ -ის რეაქტივს (ეს რეაქტივი შემდეგნაირად მზადდება: 4 მგ $Na_2S_2O_3 \cdot 7H_2O$ იხსნება 20 მლ წყალში და ინახება 5°C ტემპერატურის პირობებში დახურულ კურკელში).

მოკლე ბოჭკოებიდან წარმოქმნილი შაქრების რაოდენობა ისაზღვრება საკალიბრო მრუდის საშუალებით, რომელიც აგებულია გლუკოზის ცნობილ ხსნარებზე და გამოხატავს დამოკიდებულებას შეფერვის ინტენსივობასა და ხსნარში გლუკოზის რაოდენობას შორის მგ-ში. 0,9 კოეფიციენტზე გამრავლების შემდეგ გვაძლევს მგ ცელულოზის რაოდენობას დაშლილს მოკლე ბოჭკოებამდე. ფილტრატს, რომელიც დარჩა მოკლე და გრძელი ბოჭკოების მოშორების შემდეგ და შეიცავს შაქრებს ავსებენ 6,0 მლ-მდე და საზღვრავენ მასში რედუცირებულ შაქრებს.

ფერმენტული ანალიზის დროს წარმოებს ორი საკონტროლო განსაზღვრა:

1. რედუცირებული ნივთიერებების შემცველობაზე ფერმენტულ პრეპარატში და II. რედუცირებული ნივთიერებებისა და მოკლე ბოჭკოების შემცველობაზე სუბსტრატში. პირველ შემთხვევაში ამზადებენ შემდეგ სარეაქციო ნარევეს: 3,0 მგ ფერმენტული აქტივობის მქონე ცილა იხსნება 3,0 მლ ბუფერულ ხსნარში (pH 5,5) Na აზიდის დამატებით, მეორეში 2,0 მგ ბამბის ბოჭკო იხსნება 3,0 მლ იმავე ბუფერულ ხსნარში. პირველ და მეორე საკონტროლო ნარევეს ათავსებენ თერმოსტატში 40°C პირობებში საანალიზო ნარევებთან ერთად. შემდეგ პირველ საკონტროლო ნარევეში სარეაქციო ხსნარის მოცულობა მიყავთ 6,0 მლ-მდე და ამ ხსნარში საზღვრავენ რედუცირებულ შაქრებს სომოჯის მეთოდით. მეორე საკონტროლო ნარევის ანალიზს აწარმოებენ ისევე, როგორც პირველს მინის ფილტრის გამოყენებით. შაქრების გამოთვლის დროს, საერთო შაქრების რაოდენობას, რომელიც მიღებული იქნა ბამბის ბოჭკოებზე ფერმენტის მოქმედებით, პირველ და მეორე საკონტროლო ცდებში შაქრების რაოდენობის ჯამს აკლებენ. მოკლე ბოჭკოების რაოდენობის განსაზღვრისას, მეორე საკონტროლო ცდის დროს მიღებულ მოკლე ბოჭკოების რაოდენობას აკლებენ ამ მოკლე ბოჭკოების რაოდენობას, რომელიც მიღებული იყო საცდელი განსაზღვრის დროს და ამგვარად აღირიცხება ფერმენტის მოქმედების შედეგად მიღებული მოკლე ბოჭკოების რაოდენობა.

Cx ფერმენტის აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტის აქტივობის განსაზღვრისათვის ხმარობენ კარბოქსიმეთილ ცელულოზას, (კმც), ჩანაცვლების ხარისხით 65,3 და პოლიმერიზაციის ხარისხით 347. ამ სახის კმც კარგად იხსნება წყალში და განიცდის ჰიდროლიზს Cx ფერმენტით. ფერმენტის აქტივობის განსაზღვრისათვის იყენებენ ოსტვალდის ვისკოზიმეტრს. ვისკოზიმეტრში შეაქვთ 5,0 მლ 0,3%-იანი კმც ხსნარი და 1,0 მლ ფერმენტული ხსნარი, რომელიც განზავებულია 0,5 M აცეტატის ბუფერში pH 5,6. ცდის ჩატარების წინ ვისკოზიმეტრისა და საანალიზო ხსნარების ტემპერატურა დაყავთ 40°C-მდე და შემდეგ ატარებენ ანალიზს. ორი წუთის შუალედებით საზღვრავენ ინკუბირებული ხსნარების გამოდინების სიჩქარეს, ხოლო შემდეგ შეფარდებითი სიბლანტის უკუსიდიდეს შემდეგი ფორმულით

$$1/\eta = T_0(T - T_0).$$

სადაც T_0 არის 6,0 მლ წყლის გამოდინების დრო, T არის

სარეაქციო ხსნარის გამოდინების დრო, η -სიბლანტის მაჩვენებელი. $1/\eta$ -ამ სიდიდის გაზრდის სიჩქარე დროის ერთეულში არის ფერმენტის კონცენტრაციის ხაზოვანი ფუნქცია.

თუ აბსცისთა ღერძზე ზომავენ ფერმენტის რაოდენობას მგ-ში, რომელიც შეტანილია სარეაქციო ნარევეში, ხოლო ორდინატთა

ღერძზე $d \frac{1}{\eta_{\text{ს.ა}}} / dt$ რეზენ სწორ ხაზს, რომელიც გრაფიკულად გამოხატავს ამ ხაზოვან ფუნქციას, შემდგომში ამ მრუდით შეიძლება ვისარგებლოთ ფერმენტის კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის საკვლევ ხსნარში.

ფერმენტის აქტივობის ერთეულად მიღებულია სიბლანტის უკუსიდიდის ნმატი ($1/\eta$) დროის ერთეულში (1 წთ).

ლიტერატურა

1. Квеситадзе Г. И., Биосинтез α -амилазы. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва, 1969.
2. Куликова А. К. β -галактозидаза *Fabospora fragilis*. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва, 1972.
3. Матвеева Р. А., Лапук Я. И., Степанов В. М., Изв. АН СССР, серия химическая, 3, 501, 1964.
4. Методы определения активности гидролитических ферментов, Москва, 1971.
5. Мосолов. Протеолитические ферменты, Изд-во «Наука», Москва, 1971.
6. Петрова И. С., Зуева Л. С., Прикладная биохимия и микробиология, 4, 286, 1968.
7. Рассулин Ю. А., Каверзнева Е. А., Биохимия, 33, 857, 1968.
8. Рид Дж. Ферменты в пищевой промышленности, Изд-во «Пищевая промышленность», Москва, 1971.
9. Родионова Н. А., Тлупова Н. А. и др., Прикладная биохимия и микробиология, 2, 197.
10. Родионова Н. А. и др., Прикладная биохимия и микробиология, 1966.
11. Унифицированные методы определения активностей ферментативных препаратов производственного назначения, Киев, 1967.
12. Фениксова Р. В., Амилолитические ферменты грибов из рода *Aspergillus*. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, 1956.
13. Ферментативное расщепление целлюлозы, Изд-во «Наука», Москва, 1967.
14. Шаламберидзе Н. Г., Целлюлаза гриба *Trichoderma viride* 18, выделенного из почвы Грузии. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Тбилиси, 1972.

ცხრილები ზომიერითი გუფერული ხსნარების მოსამზადებლად

გლიცინ—HCl (0.05 M). pH 2.2—3.6

გლიცინი, მოლ. მასა=75.07

0.2 M=15.01 გ/1000 მლ

pH	0.2 M გლიცინი, მლ	0.2 M HCl, მლ	H ₂ O, მლ
2.2	50	44,0	200-მდე
2.4	50	32,4	200-მდე
2.6	50	24,2	200-მდე
2.8	50	16,8	200-მდე
3.0	50	11,4	200-მდე
3.2	50	8,2	200-მდე
3.4	50	6,4	200-მდე
3.6	50	6,0	200-მდე

ციტრატის ბუფერი (0.1M). pH 3.0—6.2

ლიმონის მჟავა ·H₂O, მოლ. მასა=210.14

0.1 M=21.01 გ/1000 მლ

სამჩანაცვლებელი ლიმონმჟავა ნატრიუმი. 2 H₂O,

მოლ. მასა=234.12 0.1 M=23.41 გ/1000 მლ

pH	0.1 M ლიმონის მჟა- ვა, მლ	0.1 M სამჩანაცვლებელი ლიმონმჟავა ნატრი- უმი, მლ
3,0	16,4	3,6
3,2	15,5	4,5
3,4	14,6	5,4
3,6	13,7	6,3
3,8	12,7	7,3
4,0	11,8	8,2
4,2	10,8	9,2
4,4	9,9	10,1
4,6	8,9	11,1
4,8	8,0	12,0
5,0	7,0	13,0
5,2	6,1	13,9
5,4	5,1	14,9
5,6	4,2	15,8
5,8	3,2	16,8
6,0	2,3	17,7
6,2	1,6	18,4

აცეტატის ბუფერი (0,2M). pH 3,6—5,8
 ძმარმეაჲ ნატრიუმი-3H₂O, მოლ. მასა=136,03
 0,2 M=27,22 გ/1000 მლ

pH 18° C	0,2 M ძმარმეაჲ ნა- ტრიუმი, მლ	0,2 M ძმარმეაჲ, მლ
3,6	0,75	9,25
3,8	1,20	8,80
4,0	1,80	8,20
4,2	2,65	7,35
4,4	3,70	6,30
4,6	4,90	5,10
4,8	5,90	4,10
5,0	7,00	3,00
5,2	7,90	2,10
5,4	8,60	1,40
5,6	9,10	0,90
5,8	9,40	0,60

სუქცინატის ბუფერი (0,05 M). pH 3,8—6,0
 ქაოლის მეაჲ, მოლ. მასა=118,03
 0,2 M=23,62 გ/1000 მლ

pH	0,2 M ქარვის მეაჲ, მლ	0,2 M NaOH. მლ	H ₂ O. მლ
3,8	25	7,5	100-მლ
4,0	25	10,0	100-მლ
4,2	25	13,3	100-მლ
4,4	25	16,7	100-მლ
4,6	25	20,0	100-მლ
4,8	25	23,5	100-მლ
5,0	25	26,7	100-მლ
5,2	25	30,3	100-მლ
5,4	25	34,2	100-მლ
5,6	25	37,5	100-მლ
5,8	25	40,7	100-მლ
6,0	25	43,5	100-მლ

ნატრიუმის ფოსფატის ბუფერი (0,1 M), pH 5,8—8,0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, მოლ. მასა=178,05 (0,2 M=35,61 გ/1000 მლ)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, მოლ. მასა=358,22 (0,2 M=71,64 გ/1000 მლ)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, მოლ. მასა=138,00 (0,2 M=27,60 გ/1000 მლ)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, მოლ. მასა=156,03 (0,2 M=31,21 გ/1000 მლ)

pH	0,2 M Na_2HPO_4 , მლ	0,2 M NaH_2PO_4 , მლ	H_2O , მლ
5,8	8,0	92,0	200-მდე
6,0	12,3	87,7	200-მდე
6,2	18,5	81,6	200-მდე
6,4	26,5	73,5	200-მდე
6,6	37,5	62,5	200-მდე
6,8	41,0	51,0	200-მდე
7,0	61,0	39,0	200-მდე
7,2	72,0	28,0	200-მდე
7,4	81,0	19,0	200-მდე
7,6	87,0	13,0	200-მდე
7,8	91,5	8,5	200-მდე
8,0	94,7	5,3	200-მდე

K,Na ფოსფატის ბუფერი (1/15 M), pH 4,94—8,67

KH_2PO_4 , მოლ. მასა=136,09 (1/15 M=9,073 გ/1000 მლ)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, მოლ. მასა=178,05 (1/15 M=11,867 გ/1000 მლ)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, მოლ. მასა=358,22 (1/15 M=23,880 გ/1000 მლ)

pH	1/15 M Na_2HPO_4 , მლ	1/15 M KH_2PO_4 , მლ
4,94	0,10	9,90
5,29	0,25	9,75
5,53	0,50	9,50
5,91	1,00	9,00
6,24	2,00	8,00
6,47	3,00	7,00
6,64	4,00	6,00
6,81	5,00	5,00
6,98	6,00	4,00
7,17	7,00	3,00
7,38	8,00	2,00
7,73	9,00	1,00
8,04	9,50	0,50
8,34	9,75	0,25
8,67	9,90	0,10

იმიდაზოლის ბუფერი (0,05 M), pH 6,2—7,8

იმიდაზოლი, მოლ. მასა=68,08

0,2 M=13,62 გ/1000 მლ

pH 25°C	0,2 M იმიდაზოლი, მლ	0,1 M HCl, მლ	H ₂ O, მლ
6,2	25	42,9	100-მლ
6,4	25	39,8	100-მლ
6,6	25	35,5	100-მლ
6,8	25	30,4	100-მლ
7,0	25	24,3	100-მლ
7,2	25	18,6	100-მლ
7,4	25	13,6	100-მლ
7,6	25	9,3	100-მლ
7,8	25	6,0	100-მლ

დიეთილბარბიტურატის (ვერონალის) ბუფერი, pH 6,8—9,6

ნატრიუმის დიეთილბარბიტურატი, მოლ. მასა=206,2

0,04 M=8,25 გ/1000 მლ

pH 18°C	0,04 M ნატრიუმის დიეთილბარბიტურატი, მლ	0,2 M HCl, მლ
6,8	100	18,4
7,0	100	17,8
7,2	100	16,7
7,4	100	15,3
7,6	100	13,4
7,8	100	11,47
8,0	100	9,39
8,2	100	7,21
8,4	100	5,21
8,6	100	3,82
8,8	100	2,52
9,0	100	1,65
9,2	100	1,13
9,4	100	0,70
9,6	100	0,35

ტრიეთანოლამინის ბუფერი (0,005 M), pH 7,1—8,6
 ტრიეთანოლამინი, მოლ-მასა=149,2
 0,01 M=1,49 გ/1000 მლ

pH 25°C	0,01 M ტრიეთანოლ- ამინი, მლ	0,01 M HCl, მლ	H ₂ O, მლ
7,10	10	8,13	20-მლე
7,35	10	7,11	20-მლე
7,57	10	6,10	20-მლე
7,76	10	5,08	20-მლე
7,94	10	4,06	20-მლე
8,13	10	3,05	20-მლე
8,37	10	2,03	20-მლე
8,62	10	1,02	20-მლე

მარილმჟავა ტრიეთანოლამინ—NaOH-ის ბუფერი (0,05 M)
 pH 6,8—8,6

მარილმჟავა ტრიეთანოლამინი, მოლ-მასა=185,7
 0,1 M=18,57 გ/1000 მლ

pH	0,1 M მარილმჟავა ტრიეთანოლა- მინი, მლ	0,1 M NaOH, მლ	H ₂ O, მლ
6,8	10	1,20	20-მლე
7,0	10	1,80	20-მლე
7,2	10	2,43	20-მლე
7,4	10	3,16	20-მლე
7,6	10	4,01	20-მლე
7,8	10	5,20	20-მლე
8,0	10	6,30	20-მლე
8,2	10	7,20	20-მლე
8,4	10	8,00	20-მლე
8,6	10	9,20	20-მლე

ტრის-(ჰიდროქსიმეთილ)-ამინომეთან—HCl ბუფერი

(0,05 M) pH 7,2—9,1

ტრის-(ჰიდროქსიმეთილ)-ამინომეთანი, მოლ.მასა=121,14

0,2 M=24,23 გ/1000 მლ

pH		0,2 M ტრისი, მლ	0,1 HCl, მლ	H ₂ O, მლ
23°C	37°C			
9,10	8,95	25	5,0	100-მლ
8,92	8,78	25	7,5	100-მლ
8,74	8,60	25	10,0	100-მლ
8,62	8,48	25	12,5	100-მლ
8,50	8,37	25	15,0	100-მლ
8,40	8,27	25	17,5	100-მლ
8,32	8,18	25	20,0	100-მლ
8,23	8,10	25	22,5	100-მლ
8,14	8,00	25	25,0	100-მლ
8,05	7,90	25	27,5	100-მლ
7,96	7,82	25	30,0	100-მლ
7,87	7,73	25	32,5	100-მლ
7,77	7,63	25	35,0	100-მლ
7,66	7,52	25	37,0	100-მლ
7,54	7,40	25	40,0	100-მლ
7,36	7,22	25	42,5	100-მლ
7,20	7,05	25	45,0	100-მლ

ბორატის ბუფერი (0,2 M), pH 7,4—9,0

Na₂B₄O₇·10H₂O, მოლ.მასა=381,43

0,05 M Na₂B₄O₇·10H₂O=19,07 გ/1000 მლ

ბორის მჟავა, მოლ.მასა=61,84

0,2 M=12,37 გ/1000 მლ

ბორის რაოდენობის მიხედვით 0,05 M Na₂B₄O₇·10H₂O

შეესაბამება 0,2 M ბორის მჟავას

pH	0,05 M Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O, მლ	0,2 M ბორის მჟავა, მლ
7,4	1,0	9,0
7,6	1,5	8,5
7,8	2,0	8,0
8,0	3,0	7,0
8,2	3,5	6,5
8,4	4,5	5,5
8,7	6,0	4,0
9,0	8,0	2,0

დიეტანოლამინის ბუფერი (0.05 M). pH 8.0—10.0
 დიეტანოლამინი, მოლ·მასა=105.1
 0.2 M=21.02 გ/1000 მლ

pH 25°C	0.2 M დიეტანოლა- მინი, მლ	0.1 M HCl. მლ	H ₂ O, მლ
10,0	25	3,6	100-მდე
9,7	25	6,9	100-მდე
9,5	25	11,1	100-მდე
9,3	25	15,6	100-მდე
9,1	25	20,4	100-მდე
8,9	25	27,1	100-მდე
8,7	25	32,7	100-მდე
8,5	25	37,7	100-მდე
8,3	25	42,0	100-მდე
8,0	25	45,9	100-მდე

გლიცინის ბუფერი (0.05 M). pH 8.6—10.6
 გლიცინი, მოლ·მასა=75,07; 0.2 M=15.01 გ/1000 მლ

pH	0.2 M გლიცინი, მლ	0.2 M NaOH. მლ	H ₂ O, მლ
8,6	50	4,0	200-მდე
8,8	50	6,0	200-მდე
9,0	50	8,8	200-მდე
9,2	50	12,0	200-მდე
9,4	50	16,8	200-მდე
9,6	50	22,4	200-მდე
9,8	50	27,2	200-მდე
10,0	50	32,0	200-მდე
10,4	50	38,6	200-მდე
10,6	50	45,5	200-მდე

ბიკარბონატის ბუფერი (0,1 M). pH 9,2—10,8
 ეს ბუფერი არ გამოიყენება სარეაქციო არეში Ca და
 Mg იონების არსებობისას
 ნატრიუმის კარბონატი ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), მოლ.მასა=286,2

0,1 M=28,62 გ/1000 მლ

ნატრიუმის ბიკარბონატი (NaHCO_3), მოლ.მასა=84,0

0,1 M=8,40 გ/1000 მლ

pH		0,1 M ნატრიუმის კარ- ბონატი, მლ	0,1 M ნატრიუმის ბიკარბო- ნატი, მლ
20°C	37°C		
9,16	8,77	1	9
9,40	9,12	2	8
9,51	9,40	3	7
9,78	9,50	4	6
9,90	9,72	5	5
10,14	9,90	6	4
10,28	10,08	7	3
10,53	10,28	8	2
10,83	10,57	9	1

ს ა რ ჩ ე ვ ი

ავტორების აგან	5
შესავალი (გ. ტყემალაძე)	7
თავი I ფერმენტების აღნაგობა (გ. ტყემალაძე, გ. კვესიტაძე)	11
პირველადი სტრუქტურა	11
მეორადი სტრუქტურა	12
მესამეული სტრუქტურა	13
მეოთხეული სტრუქტურა	15
აქტიური ცენტრი	18
ლიტერატურა	21
თავი II. ფერმენტების კოფერმენტები და კოფაქტორები (გ. ტყემალაძე)	22
ნად-ი და ნადფ-ი	22
ნუკლეოზიდფოსფატები	24
კოფერმენტი A	26
გლუტათიონი	27
ლიპოის მჟავა	28
უბიქინონები	28
პირიდოქსალფოსფატი	29
თიამინპიროფოსფატი	30
ბიოტინი	31
ტეტრაჰიდროფოლიუმის მჟავა	32
ციტოქრომები	32
ფლავინური კოფერმენტები	34
კობამიდური კოფერმენტები	37
ციკლური ადენილის მჟავა	38
მეტალები — ფერმენტთა კოფაქტორები	39
ლიტერატურა	42
თავი III. ფერმენტების სპეციფიკურობა და მოქმედების მექანიზმები (გ. ტყემალაძე)	43
მოქმედების სპეციფიკურობა	43
მოქმედების მექანიზმები	46
ლიტერატურა	51
თავი IV. ფერმენტების კლასიფიკაცია და ნომენკლატურა (გ. ტყემალაძე)	52
ლიტერატურა	59

თ ა ვ ი V. ფერმენტების მოქმედების კინეტიკა (გ. ტყეშელაშვილი)	60
რეაქციის სიჩქარე, მოლეკულურობა და რიგი	60
ნახევრადგარდაქმნის პერიოდი	65
რეაქციის რიგის დადგენის ექსპერიმენტული გზები	65
აქტივაციის ენერგია	69
დაახლოებისა და ორიენტაციის ეფექტი	74
სტაციონარული და არასტაციონარული კინეტიკა	76
მიხაელის-მენტენის განტოლება	77
ბრიგს-ჰოლდენის განტოლება	79
კონკურენტული ინჰიბირების კინეტიკა	87
არაკონკურენტული ინჰიბირების კინეტიკა	92
თანაფარდობა I_{50} და K_i შორის	94
ფერმენტული რეაქციების ინჰიბირება სუბსტრატითა და რეაქციის პროდუქტებით	97
pH-ის გავლენა	99
იონური ძალის გავლენა	100
ტემპერატურის გავლენა	101
წყნევის გავლენა	102
კინეტიკური პარამეტრების K_m , V_{max} და K_i გრაფიკული განსაზღვრის მაგალითები	102
ლიტერატურა	115
თ ა ვ ი VI. ფერმენტების ბიოსინთეზი (გ. კვესიტაძე)	116
ფერმენტების ბიოსინთეზის საერთო სქემა	116
ფერმენტების ინდუცირებული სინთეზი	121
ლიტერატურა	126
თ ა ვ ი VII. ალოსტერიული ფერმენტების მოქმედების რეგულაცია და კინეტიკა (გ. ტყეშელაშვილი)	127
ფერმენტული პროცესების რეგულაცია უკუკავშირის პრინციპით	127
ალოსტერიული ფერმენტები	130
კოოპერატიული კინეტიკა	132
კოოპერატიულობის დადგენა	136
კოოპერატიულობის კოეფიციენტის— n_H -ის გრაფიკული განსაზღვრის მაგალითი	142
ლიტერატურა	144
თ ა ვ ი VIII. ფერმენტების ლოკალიზაცია (გ. ტყეშელაშვილი)	146
დიფერენციალური ცენტრიფუგირება	147
გრადიენტული ცენტრიფუგირება	148
მარკერული ფერმენტები	149
ლიტერატურა	150
თ ა ვ ი IX. ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა (გ. ტყეშელაშვილი)	151
სპექტროფოტომეტრული მეთოდი	152
მანომეტრული მეთოდი	155
კოლორიმეტრული მეთოდი	155
პოლარიმეტრული მეთოდი	155
ვისკოზიმეტრული მეთოდი	156

ქრომატოგრაფიის მეთოდი	155
ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა	156
ლიტერატურა	158
თ ა ვ ი X. ფერმენტების გამოყოფის, გაწმენდისა და დახასიათების მეთოდები (გ. ტყემალაძე)	159
ფერმენტებთან მუშაობის ძირითადი პრინციპები	159
ფერმენტების ექსტრაქცია	160
შემკვლევა	162
თერმული დამუშავება	163
ფრაქციონირება ორგანული გამხსნელებით	163
ფრაქციონირება არაორგანული მარილებით	164
ადსორბციული ქრომატოგრაფია	167
იონცვლადი ქრომატოგრაფია	171
აფინური ქრომატოგრაფია (გ. კვესიტაძე) ;	175
დისკ-ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გულში	177
იზოელექტრული ფოკუსირება	185
გელ-ქრომატოგრაფია	186
ცილის N-და C-ბოლო ამინომჟავების განსაზღვრა	197
კრისტალიზაცია	200
ფერმენტული პრეპარატების სისუფთავის კრიტერიუმები	201
ლიტერატურა	204
თ ა ვ ი XI. იზობილიზებული ფერმენტები (გ. კვესიტაძე)	205
ლიტერატურა	213
თ ა ვ ი XII. ცილის რაოდენობის განსაზღვრა (გ. ტყემალაძე)	214
მეთოდი ბიურეტის რეაქტივის გამოყენებით	214
ლოურის და თანავეტორების მეთოდი	215
ვარბურგისა და კრისტიანის მეთოდი	216
კელდალის მეთოდი	218
ამიდოშავით შეღებვის მეთოდი	219
ლიტერატურა	221
თ ა ვ ი XIII. ოქსიდორედუქტაზების აქტივობის რაოდენობითი განსაზღვრა (გ. ტყემალაძე)	222
მალატდეჰიდროგენაზა	222
გლუტამატდეჰიდროგენაზა	227
ლაქტატდეჰიდროგენაზა	230
სუქცინატდეჰიდროგენაზა	232
ციტოქრომოქსიდაზა	234
კატალაზა	236
ო-დიფენოლქსიდაზა (გ. კვესიტაძე)	237
პეროქსიდაზა (გ. კვესიტაძე)	239
ლიტერატურა	240
თ ა ვ ი XIV. ჰიდროლაზების აქტივობის რაოდენობითი განსაზღვრა (გ. კვესიტაძე)	241
ამილაზები	241
ა-ამილაზა	242

გლუკოამილაზა		249
β-გალაქტოზიდაზა		253
ინვერტაზა, β-ფრუქტოფერანოზიდაზა		258
პროტეოლიზური ფერმენტები		262
ელასტაზა		264
ტრიპსინი		265
ლეიცინამინოპეპტიდაზა		267
კარბოქსიპეპტიდაზა		270
პროტეაზის პრეპარატების აქტივობის განსაზღვრის სტანდარტული მეთოდი		273
პექტოლიზური ფერმენტები		275
β-გლუკოზიდაზის (ცელობიოზა) აქტივობის განსაზღვრა		284
C _x -ფერმენტის აქტივობის განსაზღვრა		286
ლიტერატურა		287
დანართი. ცხრილები ზოგიერთი ბუფერული ხსნარის მოსამზადებლად		288
